



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

REBECA FUZINATTO DALL'AGNOL

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE ALFA E BETA-RIZÓBIOS
PROVENIENTES DE SOLOS DOS CERRADOS E DA MATA
ATLÂNTICA**

Londrina
2016

REBECA FUZINATTO DALL'AGNOL

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE ALFA E BETA-RIZÓBIOS
PROVENIENTES DE SOLOS DOS CERRADOS E DA MATA
ATLÂNTICA**

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

Orientador: Dr^a. Mariangela Hungria.

Londrina
2016

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

Dall'Agnol, Rebeca Fuzinato .

TAXONOMIA E FILOGENIA DE ALFA E BETA-RIZÓBIOS PROVENIENTES DE SOLOS DOS CERRADOS E DA MATA ATLÂNTICA / Rebeca Fuzinato Dall'Agnol. - Londrina, 2016.

221 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria .

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. fixação biológica de nitrogênio - Tese. 2. simbiose - Tese. 3. caracterização genética
- Tese. I. Hungria , Mariangela . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

REBECA FUZINATTO DALL'AGNOL

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE ALFA E BETA-RIZÓBIOS
PROVENIENTES DE SOLOS DOS CERRADOS E DA MATA
ATLÂNTICA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra Mariangela Hungria
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa-Soja

Dra Jesiane Stefania da Silva Batista
Universidade Estadual de Ponta Grossa -
UEPG

Dra Jakeline Renata Marçon Delamuta
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa-Soja

Dr. Fabio Bueno dos Reis Junior
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa-Cerrados

Dra Dáfila dos Santos Lima Fagotti
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa-Soja

Londrina, 03 de outubro de 2016.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, especialmente aos meus pais e irmãos, pelo incentivo, apoio e confiança, e por sempre estarem ao meu lado, me encorajando nos momentos difíceis e celebrando os bons momentos.

A minha orientadora, Dr^a Mariangela Hungria, que representa um dos meus maiores exemplos, pois além de me enriquecer com seus conhecimentos, sempre batalhou por mim e por cada um de seus orientados, contribuindo imensamente para o desenvolvimento profissional e pessoal de cada um. Sou muito grata por sua amizade, carinho, paciência, apoio e excelente orientação.

Aos membros da banca, Dr. Fábio Bueno dos Reis Junior, Dr^a Jesiane Stefania Batista da Silva, Dr^a Dáfila dos Santos Lima Fagotti e Dr^a Jakeline Renata Marçon Delamuta, pela disponibilidade em participar deste momento importante de minha vida e por agregar conhecimentos valiosos a este trabalho.

Aos pesquisadores Dr. Lionel Moulin e Dr. Gilles Béna, que me aceitaram em seu laboratório (*Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéenes*, LSTM) e me orientaram durante todo o período sanduíche na França. Obrigada pela paciência, apoio e contribuição aos estudos realizados neste trabalho.

A todos os colegas, funcionários e pesquisadores do LSTM, que me ajudaram a realizar os experimentos e fizeram deste ano um dos mais marcantes de meu doutorado. Guardo muitas lembranças boas deste período em Montpellier.

A Embrapa Soja, por ceder a estrutura e os materiais necessários à realização deste trabalho, e a todos os funcionários, que colaboraram para o desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Aos colegas, funcionários e pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Soja, pela amizade e companheirismo, pela troca de experiências, pelos inúmeros auxílios nos experimentos e por fazerem da minha rotina de trabalho momentos muito prazerosos e divertidos. São amizades que levo para a vida toda.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e a todos os seus professores e funcionários, pela oportunidade concedida, conhecimentos transmitidos, disponibilidade e apoio à realização deste trabalho.

Aos colegas do Doutorado em Biotecnologia, pela amizade e companheirismo.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e no exterior.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

DALL'AGNOL, Rebeca Fuzinato. **Taxonomia e filogenia de alfa e beta-rizóbios provenientes de solos dos Cerrados e da Mata Atlântica**. 2016. 221 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Os rizóbios representam um grupo notório de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) pela sua habilidade em disponibilizar N às leguminosas, reduzindo o uso de fertilizantes nitrogenados. Dessa forma, estudos que visem identificar, caracterizar e avaliar aspectos ligados à eficiência simbiótica de rizóbios são de grande importância. O objetivo deste trabalho foi caracterizar taxonômica e filogeneticamente estirpes de rizóbios provenientes dos Cerrados e da Mata Atlântica, dois biomas importantes ecologicamente e economicamente para o país. Foram realizados três estudos, para os quais foram feitas análises de caracterização molecular e análises filogenéticas. No Estudo 1, foi realizada uma análise polifásica em quatro estirpes de *Rhizobium*, que apresentaram características diferenciadas em estudos anteriores. Os resultados obtidos confirmaram que este grupo de estirpes representava uma nova espécie, a qual foi denominada *Rhizobium paranaense*, e a PRF 35^T foi definida como estirpe tipo para esta espécie. No Estudo 2 foi feita uma caracterização genética de 181 isolados obtidos em solos não-perturbados dos Cerrados, utilizando-se o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) como planta-isca. Neste estudo, a espécie *Paraburkholderia nodosa* foi predominante e duas estirpes apresentaram alta taxa de fixação de N₂. No Estudo 3, 427 estirpes provenientes de solos da Mata Atlântica foram isoladas e caracterizadas utilizando-se *Mimosa pudica* e *Phaseolus vulgaris* como plantas-isca. O gênero *Paraburkholderia* foi predominante na maioria das amostras, sendo que seis possíveis novas espécies foram identificadas. A análise canônica foi significativa para o pH do solo, indicando que o mesmo influenciou na diversidade de bactérias nessas amostras. Os três estudos elucidaram que ainda existe muito a ser descoberto em relação à diversidade de rizóbios nos trópicos, sendo que a caracterização destes microrganismos contribui não apenas para identificar novas estirpes, mas também para explorar suas propriedades biotecnológicas.

Palavras-chave: Simbiose. Fixação biológica de nitrogênio. Filogenia.

DALL'AGNOL, Rebeca Fuzinato. **Taxonomy and phylogeny of alpha and beta-rhizobia from Cerrados and Mata Atlântica soils.** 2016. 221 p. Thesis (Doctoral Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Rhizobia represent a remarkable group of symbiotic nitrogen-fixing bacteria (NFB) due to their ability of providing N for leguminous plants, reducing the use of nitrogen-fertilizers. In this way, studies that intend to identify, characterize and evaluate aspects related to the symbioses legume-rhizobia are of great importance. The objective of this study was to characterize taxonomically and phylogenetically rhizobial strains that were isolated from the Cerrado and the Mata Atlântica soils, two important biomes for the economy and ecology of Brazil. Three studies were conducted using molecular and phylogenetic analyses for bacteria characterization. In the first study, a polyphasic analysis was performed with four *Rhizobium* strains that presented different features in previous studies. The results confirmed that this group of strains represents a new species, which was nominated *Rhizobium paranaense*, and PRF 35^T was defined as the type strain for the species. In the second study, a genetic characterization was performed with 181 isolates from undisturbed soils of the Brazilian Cerrado, using common bean (*Phaseolus vulgaris*) as trap-host plant. In this study, the predominant species was *Paraburkholderia nodosa*, and two strains presented high rates of N₂ fixation. In the third study, 427 strains from the Mata Atlântica soils were isolated using *Mimosa pudica* and *Phaseolus vulgaris* as trap-host plants. *Paraburkholderia* was the predominant genus in most soil samples, and six potential new species were identified. The canonic analysis was significant for soil pH, indicating that it influenced bacterial diversity. The three studies highlighted that there is still much to be discovered about rhizobial diversity in the tropics, and the characterization of the rhizobia diversity can contribute not only for the identification of new species, but also to explore their biotechnological properties.

Keywords: Symbiosis. Biological nitrogen fixation. Phylogeny.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Determinação da tolerância de procariotos a determinados antibióticos através da medição dos halos de inibição.	21
Tabela 2 – <i>Primers</i> e condições de amplificação selecionados para os Estudos 1, 2 e 3 realizados neste trabalho.	24
Tabela 3 – <i>Primers</i> e condições de amplificação para o sequenciamento do 16S RNAr	27
Tabela 4 – Diferentes grupos microbianos e seus principais ácidos graxos utilizados como biomarcadores.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Os 25 <i>hotspots</i> definidos como prioritários para conservação da biodiversidade	35
Figura 2 – Extensão do Cerrado brasileiro.	36
Figura 3 – Domínio Mata Atlântica em sua extensão inicial (em amarelo) e atual (em verde)	42
Figura 4 – Redução do N ₂ pela nitrogenase	49
Figura 5 – Infecção de raiz de leguminosa por bactérias do gênero <i>Rhizobium</i>	51
Figura 6 – Filogenia de <i>Burkholderia</i> com base no gene 16S RNAr, mostrando os principais grupos do gênero – Complexo BCC, Grupo <i>pseudomallei</i> e espécies ambientais (PBE).....	60
Figura 7 – Etapas do sequenciamento pela plataforma Illumina.	75

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS ESTIRPES UTILIZADAS.....	15
3.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	16
3.2.1	Taxa (Manifestação) de Crescimento.....	17
3.2.2	Diâmetro das Colônias.....	17
3.2.3	Alteração do pH (reação ácida/básica).....	17
3.2.4	Forma, Borda, Superfície e Elevação das Colônias.....	17
3.2.5	Produção de Muco.....	18
3.2.6	Consistência da Massa de Crescimento.....	18
3.2.7	Detalhes Ópticos.....	18
3.2.8	Cromogênese.....	19
3.3	CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA.....	19
3.3.1	Utilização de Fontes de C.....	19
3.3.2	Tolerância a antibióticos.....	20
3.4	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....	21
3.4.1	Perfil de Ácidos Graxos.....	21
3.5	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FILOGENÉTICA.....	22
3.5.1	Extração de DNA.....	22
3.5.2	Análise do gene 16S RNAr.....	22
3.5.3	<i>Multilocus Sequence Analysis</i> (MLSA) e filogenia do gene de nodulação <i>nodC</i>	23
3.5.5	Análises de <i>fingerprinting</i> : BOX-PCR e RFLP-PCR.....	26
3.5.6	Sequenciamento dos Genes.....	26
3.5.7	Hibridação DNA-DNA.....	27

3.5.8	Sequenciamento do genoma e determinação da <i>Average Nucleotide Identity</i> (ANI)	28
3.5.9	Análise dos Resultados	28
3.6	ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE NODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE N ₂	29
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
4.1	DIVERSIDADE MICROBIANA NO SOLO	31
4.2	OS <i>HOTSPOTS</i> BRASILEIROS.....	34
4.2.1	O Bioma Cerrado.....	35
4.2.1.1	Tipos de solo	37
4.2.1.2	Vegetação.....	37
4.2.1.3	Clima.....	38
4.2.1.4	Ocupação Agrícola e Urbana.....	39
4.2.2	O Bioma Mata Atlântica	41
4.2.2.1	Tipos de solo	43
4.2.2.2	Vegetação.....	43
4.2.2.3	Clima.....	44
4.2.2.4	Ocupação Agrícola e Urbana.....	44
4.3	O PAPEL DO NITROGÊNIO	45
4.4	BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO	47
4.4.1	A Formação dos Nódulos	49
4.4.2	Os Genes <i>nod</i>	52
4.5	TAXONOMIA BACTERIANA	53
4.6	O GÊNERO <i>RHIZOBIUM</i>	54
4.6.1	Histórico taxonômico	56
4.7	O GÊNERO <i>BURKHOLDERIA/PARABURKHOLDERIA</i>	58
4.7.1	Histórico taxonômico	60
4.7.2	<i>Paraburkholderia</i> simbióticas	63
4.7	FERRAMENTAS EMPREGADAS NA ANÁLISE POLIFÁSICA	64
4.7.1	16 S RNAr e <i>Multilocus Sequence Analysis</i> (MLSA)	64
4.7.2	Técnicas de <i>fingerprinting</i> do DNA	66
4.7.2.1	BOX-PCR.....	67
4.7.2.2	Análise de polimorfismo por RFLP	68
4.7.3	Análise de Ácidos Graxos	68

4.7.4	Hibridação DNA-DNA (HDD)	71
4.7.5	Sequenciamento do genoma e determinação do <i>Average Nucleotide Identity</i> (ANI)	72
4.8	DESCRIÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES BACTERIANAS	76
4.9	RELEVÂNCIA DA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM ESTUDOS ENVOLVENDO RIZÓBIOS.....	78
5.	REFERÊNCIAS.....	80
6.	ESTUDO 1	106
7.	ESTUDO 2.....	126
8.	ESTUDO 3.....	156
9.	CONCLUSÃO GERAL.....	221

1. INTRODUÇÃO

O solo constitui um dos habitats microbiológicos mais vastos e diversos da biosfera, abrigando uma infinidade de espécies que desempenham papéis essenciais na manutenção do equilíbrio ecológico na natureza. A ciclagem de nutrientes presentes na matéria orgânica e os ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrogênio, entre outros) somente se mantêm funcionais graças à presença e atuação da microbiota pedológica (TREVORS, 1998; WALL; SCHMIDT *et al.*, 2011; SCHULZ *et al.*, 2013). Sendo assim, alterações que causem a perda de diversidade microbiológica, como o uso intensivo do solo, a aplicação exagerada de insumos agrícolas, entre outros fatores, acabam por alterar a estrutura e a fertilidade do solo e, conseqüentemente, a nutrição e o desenvolvimento das plantas (O'DONNELL *et al.*, 2001; YOUNG; CRAWFORD, 2004).

Duas regiões que foram intensamente exploradas pela agricultura e pecuária são os biomas Cerrados (KLINK; MOREIRA, 2002; CASTRO, 2012) e Mata Atlântica (LISBOA, 2009; SOS MATA ATLÂNTICA, 2015a). Levando em conta que tais biomas são considerados *hotspots* mundiais de biodiversidade (MYERS *et al.*, 2000; MMA, 2014) e, ao mesmo tempo, locais bastante utilizados pela agricultura nacional, é crescente a necessidade de se conhecer as espécies microbiológicas que os compõem, haja vista a importância que estes locais representam para a ecologia e a economia do país. Através da identificação e da caracterização destes microrganismos pode-se avaliar como as comunidades microbianas respondem às alterações e pressões ambientais, quais as funções específicas de certos grupos de microrganismos e como estes interagem entre si e com os vegetais.

Interações altamente benéficas entre plantas e microrganismos são de grande valia para aprimorar os rendimentos da agricultura sem impactar o meio ambiente, como a encontrada entre plantas leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007; SANTOS; REIS, 2008). A capacidade dessas bactérias em fixar o nitrogênio molecular (N₂), disponibilizando-o em formas acessíveis aos vegetais, representa um dos principais benefícios para a agricultura, já que este elemento é essencial na composição e funcionalidade das células vegetais, sendo sua disponibilidade fundamental ao desenvolvimento das plantas (MALAVOLTA, 2006; HUNGRIA; CAMPO, 2007).

BFN simbióticas são popularmente denominadas rizóbios e compreendem

espécies de alfa-proteobactérias dos gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Neorhizobium*, *Rhizobium*, '*Pararhizobium*', *Shinella* e *Sinorhizobium* (=Ensifer), e espécies de beta-proteobactérias dos gêneros *Paraburkholderia* e *Cupriavidus*. *Paraburkholderia* nodulantes têm se mostrado eficientes fixadoras de N₂, especialmente em espécies de *Mimosa* e *Piptadenia* (BONTEMPS *et al.*, 2010; BOURNAUD *et al.*, 2013). Nos últimos anos, muitas espécies de alfa e beta-rizóbios vêm sendo descritas, revelando o interesse crescente de diferentes grupos de pesquisa por estes microrganismos. Dessa maneira, estudos que visem à identificação de novas espécies de rizóbios são de grande valia para o entendimento da origem, evolução, comportamento simbiótico, competitividade, entre outros atributos que contribuem para a exploração de novas perspectivas nas associações planta-microrganismos, especialmente nas de interesse agrícola, florestal ou ambiental.

Para identificar e caracterizar corretamente um determinado isolado, inúmeras análises devem ser realizadas, de forma a garantir a verdadeira posição taxonômica das estirpes estudadas. Esse estudo integrado inclui testes fenotípicos (morfologia de colônia, resistência a diferentes antibióticos, utilização de fontes de carbono, entre outros), bioquímicos (perfis de ácidos graxos) genéticos (*fingerprinting* de DNA, hibridação DNA-DNA), e filogenéticos (filogenia dos genes 16S RNAr e de outros genes conservados do genoma - genes *housekeeping*), constituindo uma abordagem polifásica (ICSP, 1992). Para avaliar os aspectos relacionados à simbiose, em geral são feitas análises de filogenia dos genes *nod*, responsáveis pelos processos de nodulação, em especial o gene *nodC* (LAGUERRE *et al.*, 2001; BONTEMPS *et al.*, 2016).

Graças ao refinamento dos equipamentos e técnicas de biologia molecular, as quais permitem a execução das metodologias em menor tempo e com maior precisão, as pesquisas filogenéticas têm apresentado resultados bastante promissores no que diz respeito à descoberta de espécies cada vez mais eficientes, competitivas e com alto poder de nodulação em leguminosas, bem como novos genes de fixação do N₂,

Sendo assim, a realização de uma abordagem polifásica sobre estirpes de alfa e beta-rizóbios nodulantes de leguminosas é de grande interesse biotecnológico, aumentando o conhecimento acerca da enorme biodiversidade existente nos solos e fornecendo dados preciosos para estudos futuros envolvendo tais bactérias.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise polifásica em estirpes de *Rhizobium* simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), visando a descrição de uma nova espécie e caracterizar a diversidade taxonômica e filogenética de estirpes de *Paraburkholderia* capturadas por *P. vulgaris* e *Mimosa pudica* a partir de solos do Cerrado e da Mata Atlântica, bem como avaliar sua nodulação e eficiência de fixação de N₂.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar fenotipicamente as estirpes de *Rhizobium* em relação à utilização de diferentes fontes de carbono e tolerância a antibióticos, dentre outros parâmetros fisiológicos (Estudo 1);
- b) Utilizar a técnica de BOX-PCR (Estudos 1, 2 e 3) e RFLP-PCR (Estudo 2) para avaliar a diversidade genética entre as estirpes;
- c) Aplicar a metodologia de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) para determinar a posição taxonômica das estirpes (Estudos 1, 2 e 3);
- d) Inferir propriedades simbióticas das estirpes por meio da filogenia do gene simbiótico *nodC* (Estudos 2 e 3);
- e) Avaliar a capacidade nodulífera e a eficiência de fixação do nitrogênio das estirpes em *Phaseolus vulgaris* (Estudo 2);
- f) Avaliar, de forma integrada, todas as características analisadas (Estudos 1, 2 e 3).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS ESTIRPES UTILIZADAS

Para o Estudo 1, foram utilizadas quatro estirpes de *Rhizobium* simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), as quais eram originalmente classificadas como *R. tropici* e que, em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, apresentaram fortes indícios de que poderiam representar novas espécies (CHUEIRE *et al.*, 2003; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009). As estirpes são provenientes de três diferentes estados, sendo uma de Planaltina, GO, denominada H 52 (MOSTASSO *et al.*, 2002; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009), a qual foi isolada e fornecida pelo Dr. Milton A. T. Vargas (Embrapa Cerrados, Planaltina, DF); outras duas de Pitanga, PR, correspondente às PRF 35 e PRF 54, (HUNGRIA *et al.* 2000; CHUEIRE *et al.*, 2003; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009), as quais foram isoladas e fornecidos pela Dra. Diva S. Andrade (Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR, Londrina, PR); e a última de Dourados, MS, denominada CPAO 1135 (PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007), a qual foi isolada e fornecida pelo Dr. Fábio M. Mercante (Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS).

Para o Estudo 2, foram utilizadas 45 estirpes, selecionadas após caracterização e avaliação de 181 estirpes provenientes de uma área preservada de 700 ha, relativa à Reserva Ecológica da Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina, DF, no coração do Cerrado brasileiro, cujas coordenadas são 15° 35' 30" S/ 47° 42' 30" W. A coleta foi realizada em solos da fitofisionomia "Cerradão", que corresponde a uma área de 37 ha, utilizando-se feijoeiro (*P. vulgaris* L.) como planta-isca. O fornecimento de tais estirpes foi realizado pela Dra. Iêda C. Mendes (Embrapa Cerrados, Planaltina, DF). O isolamento foi realizado através do cultivo de plantas de feijoeiro (cultivar Pérola) em 50 vasos contendo cerca de 2kg das amostras de solo coletadas (amostras mistas). As sementes foram esterilizadas em álcool por 1 min, seguida de seis lavagens sucessivas em H₂O estéril, e deixadas mais 3 min em hipoclorito de sódio a 10%, e submetidas a mais uma etapa de lavagem, antes de serem distribuídas nos vasos (duas sementes por vaso). O experimento foi realizado em casa de vegetação (28 - 30° C/ dia e 23 - 25° C/noite) e durante todo o crescimento as plantas receberam solução nutritiva sem N. Após 30

dias, os nódulos foram coletados (10 nódulos por planta), esterilizados em hipoclorito de cálcio a 3%, seguido de seis lavagens em água destilada estéril, e em seguida macerados, para liberação das bactérias, as quais foram crescidas em meio YM sólido (extrato de levedura e manitol, VINCENT, 1970) a 28°C.

Para o Estudo 3 foram utilizadas 84 estirpes, selecionadas após caracterização e avaliação de 427 isolados de seis diferentes solos provenientes do estado do Rio de Janeiro, região coberta pelo bioma Mata Atlântica, utilizando-se *Mimosa pudica* e *P. vulgaris* como plantas-isca. Os solos foram coletados pelo Dr. Sergio Mianna Faria (Embrapa Agrobiologia) e selecionados segundo diferentes pHs, e dados prévios de diversidade, para uma nova coleta e caracterização. Os isolamentos foram realizados no *Laboratoire de Symbioses Tropicales et Méditerranéenes* (LSTM), Montpellier, França, de forma semelhante ao realizado para o Estudo 2, diferindo apenas nas amostras de solo, as quais não foram mistas. Para cada solo foram feitas seis replicatas e as mesmas foram crescidas em tubos Gibson contendo Attapulgite comercial como substrato inerte e cerca de 4-5 g de solo. O experimento foi realizado em casa de vegetação (*M. pudica*: 27° C/dia; 23° C/noite; fotoperíodo: 16h/8h; 80% de umidade relativa; *P. vulgaris*: 22/dia; 18 °C /noite; fotoperíodo: 16h/8h; umidade relativa: 60–70%), durante 30 dias e as plantas receberam apenas água destilada durante este período. Foram coletados oito nódulos por planta e os mesmos foram esterilizados conforme descrito para o Estudo 2. Cada nódulo foi isolado separadamente, resultando em uma estirpe por nódulo.

Todas as bactérias foram cultivadas em meio de cultura YM sólido a 28°C e estocadas em glicerol a 30%, a - 4°C para estocagens curtas, a - 80°C e - 150°C e liofilizadas para estocagens de longo prazo, conforme descrito por Menna *et al.* (2006).

3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A caracterização morfofisiológica das colônias (Estudos 1 e 2) foi realizada conforme Vincent (1970) e Somasegaran e Hoben (1985), com algumas adaptações (ajuste de valores na classificação da taxa de crescimento, produção de muco e cromogênese, a fim de minimizar erros de interpretação). As análises incluíram a

avaliação da taxa de crescimento (rápida, intermediária, lenta ou muito lenta) em meio YMA contendo vermelho Congo (VC); da morfologia das colônias em relação à forma, bordas, superfície, produção de muco, elevação, consistência e detalhes ópticos; da mudança de coloração (reação ácido/básico) em YMA contendo o indicador azul de bromotimol (ABT); e da cromogênese da cultura em meio YMA contendo ABT e VC.

3.2.1 Taxa (Manifestação) de Crescimento

As estirpes foram crescidas a 28°C em placas contendo meio YMA + VC e avaliadas quanto à taxa de crescimento. São necessárias pelo menos três colônias isoladas para o registro da manifestação. A classificação da taxa de crescimento foi: rápida (até 3 dias), intermediária (4 a 5 dias), lenta (6 a 9 dias) ou muito lenta (superior a 10 dias).

3.2.2 Diâmetro das Colônias

O diâmetro das colônias foi medido três dias após a manifestação de crescimento das colônias isoladas, com um paquímetro, sob estereomicroscópio com luz incidente superior. O valor do diâmetro corresponde à média, em milímetros, das três colônias analisadas.

3.2.3 Alteração do pH (reação ácida/básica)

As estirpes foram crescidas em placas contendo meio YMA sólido com indicador ABT. Na presença do indicador, meios ácidos apresentam cor amarela, meios alcalinos apresentam cor azul e meios neutros permanecem com a coloração original obtida na preparação do meio (verde). Conforme a mudança registrada, as estirpes foram classificadas como apresentando reações de acidificação, alcalinização ou não alteração do pH do meio de cultura.

3.2.4 Forma, Borda, Superfície e Elevação das Colônias

A forma das colônias foi observada sob estereomicroscópio, com luz incidente superior e classificada como circular, oval (elíptica) ou irregular. Da mesma maneira, as colônias foram observadas e classificadas em relação à borda (lisa, ondulada ou filamentosa) e superfície (lisa ou rugosa).

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

3.2.5 Produção de Muco

As estirpes foram medidas três dias após a manifestação de crescimento para a verificação da produção de muco, a qual é classificada com base no tamanho da colônia: pouca produção (colônias apresentam diâmetro $\leq 1,9$ mm), produção moderada (colônias apresentarem diâmetro entre 2 a 3,9 mm) e produção abundante (colônias apresentam diâmetro ≥ 4 mm).

3.2.6 Consistência da Massa de Crescimento

A consistência das colônias foi analisada encostando-se uma alça de platina, previamente flambada e resfriada, sobre uma colônia isolada. Seu aspecto foi observado sob estereomicroscópio, com luz incidente superior e as colônias foram classificadas em aquosas (desmancham-se totalmente quando tocadas pela alça), secas (possuem pouca quantidade de muco), gomosas (podem ser arrastadas sobre o meio de cultura sem se desmanchar, deixando um pequeno rastro), e viscosas (possuem aspecto elástico e quando tocadas pela alça formam um fio bastante elástico entre a alça e a cultura).

3.2.7 Detalhes Ópticos

As estirpes foram analisadas segundo seus detalhes ópticos, utilizando-se o fundo branco de um estereomicroscópio, com luz incidente superior. A classificação é feita com base na opacidade ou transparência que a massa da colônia em

crescimento apresenta, quando um risco de caneta preta (retroprojeter) é feito no fundo da placa. Se o risco aparece sob a massa celular, as colônias são classificadas como transparentes; se o risco encontra-se pouco visível ou totalmente coberto pela massa celular, as colônias são classificadas como opacas.

3.2.8 Cromogênese

a) Meio YMA contendo Azul de bromotimol (ABT)

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

b) Meio YMA contendo vermelho Congo (VC)

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

3.3 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA

3.3.1 Utilização de Fontes de C

Estirpes do Estudo 1 e estirpes de referência foram crescidas em duplicata em meio YMA líquido e incubadas sob agitação a 100 rpm, por 72 horas. Após atingido o crescimento, cada cultura foi centrifugada a 6.000 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensão em 5 mL de solução salina a 0,85%, centrifugado sob as mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 2 mL de água Milli-Q para ressuspender o *pellet* e a solução foi transferida para um tubo de ensaio estéril, onde a concentração das células foi ajustada para, aproximadamente, 10^9 células mL⁻¹, utilizando-se a escala de McFarland como padrão.

Para ajustar a concentração ao nível desejado, foi feita uma transferência da

solução ressuspensa para um tubo de ensaio contendo 5 mL de água Milli-Q, através de um conta-gotas. Uma vez atingido o ajuste, o inóculo foi transferido, pelo mesmo conta-gotas, a um frasco de vidro com 10 mL de meio de cultura modificado (YM sem manitol, extrato de levedura reduzido ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) e adição de indicador azul de bromotimol) e testado em placas de API 50CH kit (BioMérieux), com 49 fontes de carbono. As placas foram incubadas em BOD por 72 h a 28°C .

A quantidade de inóculo que foi transferido do tubo de ensaio à placa de API corresponde a 2 vezes o número de gotas utilizadas para se ajustar à concentração de células para $10^9 \text{ células mL}^{-1}$.

3.3.2 Tolerância a antibióticos

As estirpes (Estudo 1) foram avaliadas quanto à resistência a determinados antibióticos pelo método de Disco-Difusão (BAUER; KIRBY, 1966). O método avalia a resistência da bactéria ao antimicrobiano pela medida direta do diâmetro do halo de inibição que se forma ao redor do disco. As culturas foram crescidas em meio YM líquido durante dois a três dias, sob agitação constante de 100 rpm. Após atingido o crescimento, 100 μL do pré-inóculo foram transferidos para uma placa de Petri contendo YMA e dois discos de um mesmo antibiótico foram adicionados. Cada disco fica a uma distância de, aproximadamente, 2 cm um do outro, permitindo, assim, a medição correta do halo quando o mesmo for formado. Após cerca de 3 dias de crescimento, o halo de inibição (quando presente) foi medido com um paquímetro e as bactérias foram classificadas em sensível, moderadamente resistente ou resistente, de acordo com o padrão demonstrado na Tabela 1. O diâmetro do halo de inibição final foi calculado pela média entre os halos formados nos dois discos da placa.

Os antibióticos e suas concentrações correspondem a: ácido nalidíxico (30 μg), ampicilina (10 μg), clorafenicol (30 μg), cefuroxima (30 μg), eritromicina (15 μg), estreptomicina (10 μg), neomicina (30 μg), penicilina g (10 u) e tetraciclina (30 μg).

Tabela 1 – Determinação da tolerância de procariotos a determinados antibióticos através da medição dos halos de inibição (BAUER; KIRBY, 1966).

ANTIBIÓTICOS OU QUIMIOTERÁPICOS	SÍMBOLO	POTÊNCIA DO DISCO	DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS		
			Resistente	Moderadamente resistente	Sensível
Ampicilina (enterococos, germes Gram negativos)	AP	10 µg	≤ 11	12 – 13	≥ 14
Clorafenicol	CO	30 µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18
Eritromicina	EI	15 µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18
Estreptomicina	ET	10 µg	≤ 11	12 – 14	≥ 15
Nalidixico, ácido	NA	30 µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19
Neomicina	NO	30 µg	≤ 12	13 – 16	≥ 17
Penicilina G (interpretação não aplicável a estafilococos)	PN	10 U	≤ 11	12 – 21	≥ 22
Cefuroxima (cefalosporinas)	CF	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Tetraciclina	TT	30 µg	≤ 14	15 – 18	≥ 19

3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

3.4.1 Perfil de Ácidos Graxos

A obtenção dos perfis de ácidos graxos realizados no Estudo 1 foi feita submetendo-se as amostras ao sistema MIDI (SASSER, 1990), utilizando-se como referência a biblioteca TSBA6. As estirpes foram crescidas por 5 dias a 28°C em placas contendo meio YMA. As análises foram realizadas em Agilent GC modelo 6850 com coluna Ultra 2 (25 m de comprimento, ID 0,2 mm, filme f 0,33 µm), detector FID, carregador de gás: hidrogênio (30 mL min⁻¹) gás “make-up”: nitrogênio (30 mL min⁻¹), injetor automático series 7683 (liner 19251-60540), injeção de 2 µL, corrida de 25 min. Temperatura do injetor: 250°C; temperatura do detector: 300°C. Programação: temperatura inicial de 170°C, acrescida de 5°C min⁻¹ até atingir 260°C, onde foi mantida por 18 min e, em seguida, acrescida de 40°C min⁻¹ até atingir 310°C, onde foi mantida por 1,5 min.

3.5 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E FILOGENÉTICA

3.5.1 Extração de DNA

O DNA genômico das estirpes foi extraído pelo kit DNeasy Blood & Tissue (Quiagen), conforme instruções do fabricante (Estudos 1 e 2) e submetido à eletroforese em gel de agarose 1 % para verificação da concentração através da intensidade da banda. Amostras de DNA que apresentaram bandas muito intensas no gel foram diluídas para aplicação nas etapas subsequentes.

No Estudo 3, o DNA foi extraído pela metodologia da Proteinase K, descrito por Wilson (1987). Colônias puras de cada isolado foram crescidas em 10 mL de YM, cetrifugadas por 5 min a 12.000 rpm e os *pellets* foram lavados duas vezes e ressuspendidos em água Milli-Q. A suspensão bacteriana final (100 µL) foi ajustada para uma DO₍₆₂₀₎ = 2 e um volume equivalente de Tris-HCl a 10mM, pH 8.3 foi adicionado, seguido por 20 µL de proteinase K (1 mg mL⁻¹) e deixada incubar por 2h a 55°C. Após incubação as amostras foram fervidas durante 15 min para desnaturar a proteinase K e mantida a temperatura ambiente por 10 min para renaturação do DNA. O estoque foi armazenado a -20°C.

3.5.2 Análise do gene 16S RNAr

Todas as estirpes foram submetidas à PCR e sequenciamento parcial (cerca de 1300 pb) do gene ribossomal 16S RNAr, conforme descrito por Menna *et al.* (2006). Para a amplificação, nos Estudos 1 e 2 foram utilizados os *primers* fD1 e rD1 (WEISBURG *et al.*, 1991), e FGPS1509 e FGPS6 no Estudo 3 (NORMAND *et al.*, 1992). A reação foi conduzida conforme Menna *et al.* (2006), em termociclador (MJ Research Inc. PTC 200). Os *primers* e as condições de amplificação são apresentados na Tabela 2.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com o kit *PureLink* (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da concentração, tal como feito após extração do DNA. Neste caso, as amostras que apresentaram bandas fracas (devido à perda de parte do material durante a

purificação) foram submetidas a concentrador à vácuo (*Concentrador Plus*, Eppendorf).

Devido à grande extensão do 16S RNAr, foram utilizados cinco *primers* para o sequenciamento Y1, Y2, 362f, 786f e 1203, cujas sequências podem ser visualizadas na Tabela 3. As etapas e condições de sequenciamento foram as mesmas para todas as reações e estão detalhadas no item 3.5.6.

3.5.3 *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e filogenia do gene de nodulação *nodC*

Os genes *housekeeping* utilizados no Estudo 1 foram selecionados com base em estudos anteriores (GAUNT *et al.*, 2001; MARTENS *et al.*, 2008, RIBEIRO *et al.*, 2009; DALL'AGNOL *et al.*, 2013, RIBEIRO *et al.*, 2013). Dentre eles, *recA* (proteína de recombinação A), *gyrB* (DNA girase, subunidade beta) e *rpoA* (RNA polimerase, subunidade alfa) constituem marcadores taxonômicos que têm apresentado bons resultados em análises de MLSA. Os genes *housekeeping* *recA*, *gyrB*, *rpoA*, *gltB* (glutamina sintase), *phaC* (3-cetoacil-ACP-redutase) e *trpB* (triptofano sintase) (SPILKER *et al.*, 2009) utilizados nos Estudos 2 e 3 foram amplificados de forma semelhante entre si, com algumas adaptações, de acordo com o gene em análise, que podem apresentar diferenças no número de ciclos, concentração de reagentes e/ou temperatura de anelamento.

O gene de nodulação *nodC*, escolhido para os Estudos 2 e 3 com base em estudos anteriores (BONTEMPS *et al.*, 2010; BOURNAUD *et al.*, 2013) representa o marcador simbiótico mais utilizado para estudos de diversidade e evolução envolvendo genes de nodulação. Os *primers* e os ciclos de amplificação estão representados na Tabela 2. Durante o desenvolvimento do Estudo 3 foram isoladas estirpes de *Cupriavidus* e *Mesorhizobium*. *Primers* específicos para a caracterização dessas estirpes encontram-se na Tabela 2. A purificação foi realizada como descrito para o gene 16S RNAr.

Tabela 2 – Primers e condições de amplificação selecionados para os Estudos 1, 2 e 3 realizados neste trabalho.

GENE	PRIMER	SEQUÊNCIA 5'-3'	CONDIÇÕES DA PCR	REFERÊNCIA
16S RNAr (<i>Rhizobium</i>)	fD1	5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'	2 min 95 °C, 30 x (15s 94°C, 45s 93°C, 45s 55°C, 2 min 72°C), 5 min 72°C	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
	rD1	5' - AAGGAGGTGATCCAGCC– 3'		
16S RNAr (<i>Paraburkholderia</i>)	FGPS1509	5' – GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG – 3'	5 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 56°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C	Normand <i>et al.</i> , 1992
	FGPS6	5' - AAGGAGGGGATCCAGCCGCA– 3'		
<i>recA</i> (<i>Paraburkholderia</i> / <i>Cupriavidus</i>)	recA-BurkF	5' –AGGACGA TTCA TGGAAAGAWAGC– 3'	2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C,45s 72°C), 5 min 72°C	Spilker <i>et al.</i> (2009)
	recA-BurkR	5' –GACGCACYGAYGMRTAGAACTT – 3'		
	recABurk1F	5' – GATCGARAAGCAGTTCGGCAA – 3'		
	recABurk1R	5' – TTGTCCTTGCCCTGRCCGAT – 3'		
<i>recA</i> (<i>Mesorhizobium</i>)	recA-Meso41F	5' –TTC GGCAAGGGMTCGRSATSATG– 3'	2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C,45s 72°C), 5 min 72°C	Vinusa <i>et al.</i> (2005)
	recA-Meso640R	5' –ACATSACRCCGATCTTCATGC– 3'		
	recA6f	5' – CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA – 3'		
	recA555r	5' – CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT – 3'		
<i>gyrB</i> (<i>Paraburkholderia</i>)	gyrB-BurkF	5' – ACCGGTCTGCAYCACCTCGT – 3'	2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C,1min 72°C), 5 min 72°C	Spilker <i>et al.</i> (2009)
	gyrB-BurkR	5' – YTCGTTGWARCTGTCGTTCCACTGC – 3'		
<i>gyrB</i> (<i>Rhizobium</i>)	gyrB343f	5' – TTCGACCAGAA YTCCTAYAAGG – 3'	5 min 95 °C, 5x (2 min 94 °C, 2 min 58 °C, 1 min, 72 °C), 28x (30s 94 °C, 1 min 58 °C, 1 min 72 °C), 5 min 72 °C	Martens <i>et al.</i> (2008)
	gyrB1043r	5'- AGCTTGCTCCTSGTCTGCG – 3'		
<i>gltB</i> (<i>Paraburkholderia</i>)	gltB-BurkF	5' – CTGCATCATGATGCGCAAAGTG – 3'	2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C,1min 72°C), 5 min 72°C	Spilker <i>et al.</i> (2009)
	gltB-BurkR	5' – CTTGCCGCGGAARTCGTTGG – 3'		
<i>phaC</i> (<i>Paraburkholderia</i>)	phaC-BurkF	5' – GCACSAGYATYTGCCAGCG – 3'	2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C,1min 72°C), 5 min 72°C	Spilker <i>et al.</i> (2009)
	phaC-BurkR	5' – CCATSTCSGTRCCRATGTAGCC– 3'		

<i>trpB</i> (<i>Paraburkholderia</i>)	trpB-BurkF	5' – CGCGYTTCCGGVATGGARTG – 3'	2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C, 1min 72°C), 5 min 72°C	Spilker <i>et al.</i> (2009)
	trpB-BurkR	5' – ACGTRTGCATGTCCTTGTCG – 3'		
<i>rpoA</i> (<i>Rhizobium</i>)	RRrpoAf	5'- GGAAA TCGCCATCAAGATGG -3'	2 min 95 °C, 35x (45 s 94 °C, 45 s 55 °C, 2 min 72 °C), 5 min 72 °C	Ribeiro <i>et al.</i> (2009)
	RRrpoAr	5'- ACGCTTGGCGAGATCTTC -3'		
<i>nodC</i> (<i>Burkholderia</i>)	nodCBurkPipF	5' –T(GA)AT(CT)GA(TC)ATGGAATACTGGC– 3'		Bournaud <i>et al.</i> (2013)
	nodCBurkPipR	5' –CAGCGGA(CT)AT(CA)GTCA TTGA– 3'		
<i>nodC</i> (<i>Cupriavidus</i>)	Cuptaiw -nodC468F	5' – TACTCAAGATGCGGGACAGA – 3'	5 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 55°C, 45 72°C), 7 min 72°C	Bontemps <i>et al.</i> (2010)
	Cuptaiw -nodC1231R	5' – CCGGAGATTCCGATGATGGA – 3'		
<i>nodC</i> (<i>Mesorhizobium</i>)	nodCMeso540F	5' –TGATYGAYATGGARTAYTGGCT– 3'		Sarita <i>et al.</i> (2005)
	nodCMeso1160R	5' –CGYGACARCCARTCGCTRTTG – 3'		

3.5.5 Análises de *fingerprinting*: BOX-PCR e RFLP-PCR

A reação de amplificação dos elementos *boxA* foi realizada utilizando-se o *primer* BOX-AIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC *et al.*, 1994; KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995), seguindo as modificações de Fernandes, Fernandes e Hungria (2003) e Kaschuk *et al.* (2006). A reação foi conduzida em um volume final de 25 μL , contendo 13,8 μL de água Milli-Q estéril; 5,0 μL de dNTPs, (estoque com 1,5 mmol L^{-1} de cada base); 2,5 μL de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,5 μL de MgCl_2 , (50 mmol L^{-1}); 1,0 μL de *primer* (50 $\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$); 1,0 μL de DNA (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) e 0,2 μL de Taq (5 U μL^{-1}). As amostras foram submetidas ao termociclador (MJ Research Inc. PTC 200) com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 7 min; 30 a 35 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação), 1 min a 53°C (anelamento) e 8 min a 65°C (extensão); etapa final de extensão a 65°C por 16 min; manutenção a 4°C (Hungria *et al.*, 2008).

As análises de RFLP-PCR (Estudo 2) foram feitas conforme descrito anteriormente (Germano *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2007): o DNA total foi amplificado com os *primers* fD1 e rD1 e 6 μL dos produtos de PCR foram digeridos com 10 U das endonucleases *Hpa*II (5'-C/CGG-3'; 3'-GGC/C-5'), *Rsa*I (5'-GT/AC-3'; 3'-CA/TG-5') e *Hae*III (5'-GG/CG-3'; 3'-CC/GG-5') (Invitrogen®) por 2h a 37 °C. A separação das bandas foi feita por eletroforese em gel de agarose a 3%. A amplificação ocorreu em termociclador (MJ Research Inc. PTC 200) iniciando a primeira etapa através da elevação da temperatura a 94°C por 7min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C e 8 min a 72°C e uma etapa final de alongação de 16 min a 65°C. As bandas foram separadas em gel de agarose a 1% após 3 horas de corrida a 120V.

3.5.6 Sequenciamento dos Genes

Para o sequenciamento, os produtos de PCR obtidos após purificação foram submetidos a uma nova amplificação, a qual consistiu na adição de 3 μL de DNA (15 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 1,3 μL de BigDye (compatível com o sequenciador ABI3500XL, Applied Biosystems), 1 μL de cada *primer* (3,2 pmol), 2,5 μL de tampão 10x (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4) e 12,2 μL de H_2O milli-Q estéril, totalizando um volume de 20 μL por reação, distribuídos em placas de 96 poços.

As condições da PCR foram as mesmas para todos os genes: as amostras

foram submetidas a um ciclo inicial de 96° C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 96° C por 15 s, 50° C por 15 s e 60° C por 4 min, em termociclador (MJ Research Inc. PTC 200).

Após amplificação, as amostras foram precipitadas conforme o método descrito por Menna *et al.* (2006), modificando-se apenas o tempo de centrifugação, que passou de 10 minutos para 20 minutos. Foram adicionados 2 µL de acetato de amônio estéril 7,5 M e 65 µL de etanol a 99,5% (temperatura ambiente) a todos os poços da placa. Após a adição dos reagentes, a placa foi selada, homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida em papel absorvente. Posteriormente, foram adicionados 150 µL de etanol 70% recém-preparado a cada poço da placa e a mesma foi novamente selada, homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 20 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a placa invertida em papel absorvente. Uma nova centrifugação foi feita em baixa rotação (300 rpm) por cerca de 25 s, para remover resíduos de sobrenadante. Por fim, a placa foi deixada em estufa a 37° C por cerca de 30 min para secar.

Após secagem completa, os *pellets* foram ressuspensos em 10 µL de formamida, aquecidos em termociclador à 95° C durante 5 min e resfriados por mais 2 min em gelo e submetidos ao sequenciamento em ABI 3500XL (Applied Biosystems).

Tabela 3 – Primers e condições de amplificação para o sequenciamento do 16S RNAr.

PRIMER	SEQUENCIA 5' - 3'	CONDIÇÕES DA PCR	REFERÊNCIAS
Y1	5' – TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC - 3'		WEISBURG <i>et al.</i> , (1991)
Y2	5'- CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT - 3'	1 min 96°C, 35 x (15s	YOUNG; DOWNER; EARDLY (1991)
1203f	5'- GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC - 3'	96°C, 15s 50°C, 4min 60°C)	MENNA <i>et al.</i> (2006)
362f	5'- CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG - 3'		MENNA <i>et al.</i> (2006)
786f	5'- CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG - 3'		MENNA <i>et al.</i> (2006)

3.5.7 Hibridação DNA-DNA

O genoma total das amostras do Estudo 1 foi submetido à hibridação DNA-

DNA com as estirpes-tipo que se agruparam mais próximas na árvore filogenética concatenada de MLSA. O DNA total de cada bactéria foi digerido com a endonuclease de restrição *EcoRI* (5' - G/AATTC - 3'; 3' - CTAA/G - 5'), de acordo com o método descrito por van Berkum, Beyene e Eardly (1996). Os fragmentos resultantes foram separados em gel de agarose a 0,7%. Em seguida, o DNA foi depurinado, desnaturado e transferido para membranas de Nytran, como descrito por Navarro *et al.* (1993), exceto na lavagem final, onde foi utilizada uma solução contendo 0,2x SSC e 0.1% de SDS por 1h a 65°C. DNA totais foram utilizados como sondas, submetidos à radiação com [³²P]dCTP utilizando-se um o *kit U.S. Biochemicals* (Cleveland, Ohio). Misturas reativas, as quais são recomendadas para DNA isolado de geis com baixo ponto de *melting* foram utilizadas neste procedimento, e a mistura foi incubada à 37°C por 3 h. As membranas foram radiografadas e cada tira foi cortada e submergida em 3 mL de tampão cintilante. Por fim, a radioatividade foi medida através de um centilómetro. A similaridade entre as fitas é expressa como a porcentagem de cintilância emitida pelo DNA em análise com aquela emitida pelo DNA da sonda.

3.5.8 Sequenciamento do genoma e determinação da *Average Nucleotide Identity* (ANI)

O genoma da *Rhizobium paranaense* PRF 35^T foi sequenciado no Genome Sequencer FLX 454 (Roche). O genoma de estirpes representativas do Estudo 2 (*Paraburkholderia nodosa* CNPSo 1341) e Estudo 3 (*Paraburkholderia* sp. ABIP 240 e ABIP 241) foram sequenciados no Illumina MiSeq (Solexa) utilizando-se o *kit* Nextera (Nextera DNA Library Preparation Kits) , de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizados 50 ng de DNA total, extraídos conforme descrito no item 4.5.1.

Para o cálculo da ANI, foram usadas as sequências dos genomas totais das estirpes em estudo com estirpes de referência usando JSpecies (RICHTER; ROSSELLÓ- MÓRA, 2009).

3.5.9 Análise dos Resultados

Os dendogramas para as análises de *fingerprinting* (BOX-PCR e RFLP-

PCR) foram construídos no Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 6.4 -Estudo 1, v. 7.6 – Estudos 2 e 3), aplicando-se o coeficiente de Jaccard e tolerância de 3%.

As sequências de bases nitrogenadas obtidas no sequenciamento foram corrigidas com o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 4.6 – Estudo 1, v. 7.0 – Estudo 2 e v. 7.6 - Estudo 3) e analisadas no programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 6.1, com modelo de distância Tamura Nei (TAMURA; NEI, 1993) e algoritmo Maximum Likelihood (FELSENSTEIN, 1981). O suporte estatístico para as árvores foi avaliado por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições (HEDGES, 1992).

A identidade nucleotídica entre as estirpes e as porcentagens das bases nitrogenadas nas sequências gênicas foram calculadas pelo programa Bioedit, versão 7.1.3.

Os genomas foram montados seguindo-se a *pipeline* A5-MiSeq, conforme descrito por Tritt *et al.*, (2012), com as modificações propostas por Coil, Jospin e Darling (2015).

A análise canônica realizada no Estudo 3 foi calculada com base na diversidade de bactérias e pH do solo, aplicando-se o teste de Monte Carlo a 5% ($p < 0,05$) e utilizando-se o programa Canoco para Windows 4.5 (BRAAK; SMILAUER, 1998).

3.6 ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE NODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE N₂

A eficiência de nodulação e fixação analisada no Estudo 2 foi realizada através do cultivo, em casa de vegetação, de plantas de feijoeiro inoculadas com espécies representativas de *P. nodosa* e posterior análise dos nódulos e nitrogênio total fixado na parte aérea.

O experimento consistiu em dez tratamentos, sendo: seis correspondentes a plantas inoculadas com espécies representativas de *P. nodosa*, selecionadas após análise filogenética pelo MLSA; dois correspondentes aos controles (plantas não inoculadas sem adição de N e plantas não-inoculadas adicionadas de 30 mg de N planta⁻¹ semana⁻¹); e dois correspondentes a plantas inoculadas com estirpes de *Rhizobium* recomendadas como inoculantes comerciais para o feijoeiro, *R. tropici* CIAT 899^T e *R. freirei* PRF 81^T. As estirpes foram crescidas em meio YM e a

concentração ajustada para 10^9 células mL^{-1} .

Sementes de feijão da variedade Pérola, utilizadas para este experimento, foram esterilizadas conforme descrito no item 3.1. Em seguida, foram transferidas em vasos de Leonard (VINCENT, 1970), contendo substrato inerte (areia e vermiculita 1:1 v/v). Em cada vaso foram adicionadas quatro sementes, as quais receberam 0,5 mL de inóculo. Cerca de seis dias após a emergência as plantas foram desbastadas, resultando em duas plantas por vaso. O experimento foi realizado em casa de vegetação ($28 - 30^\circ \text{C}$ / dia e $23 - 25^\circ \text{C}$ /noite) em blocos casualizados, com três replicatas. Ao longo do experimento as plantas receberam solução nutritiva sem N.

A coleta e contagem dos nódulos, bem como a coleta das raízes e da parte aérea foi realizada 30 dias após a emergência. O peso seco da parte aérea e dos nódulos foi obtido após secagem em estufa a 65°C durante 72h. O N total foi determinado através da digestão do N pelo método de Kjeldahl, seguido pela reação colorimétrica do azul de indofenol (FEIJE; ANGER, 1972).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 DIVERSIDADE MICROBIANA NO SOLO

O solo abriga uma infinidade de espécies de microrganismos, representando um dos habitats mais ricos e diversos da natureza (QUINCE; CURTIS; SLOAN, 2008). Esses microrganismos são importantes para a manutenção da estrutura física, química e biológica do solo (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998; DODD *et al.*, 2000; YAO; WILSON; CAMPBELL, 2000; O'DONNELL, 2001), uma vez que desempenham muitas das funções ligadas à ciclagem de nutrientes, como nos ciclos do carbono e do nitrogênio (MOLIN; MOLIN, 1997; TREVORS, 1998; WALL; VIRGINIA, 1999, SCHMIDT *et al.*, 2011; SCHULZ *et al.*, 2013), processos fundamentais para a sobrevivência dos seres vivos.

Apesar de muitas descobertas relacionadas aos grupos de microrganismos do solo e seus papéis ecológicos, ainda há muito a ser esclarecido. As estimativas de espécies por grama de solo giram em torno de 10^4 , sendo este número relativo apenas às espécies de bactérias, onde a maior parte – cerca de 95 a 99% - corresponde aos exemplares ainda não cultiváveis nos meios de cultura convencionais (SAIT; HUGENHOLTZ; JANSSEN, 2002; JOSEPH *et al.*, 2003; TORSVIK; ØVREÅS, 2002; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006, SIMON; DANIEL, 2011). As estimativas obtidas por metagenômica apontam números igualmente altos, cerca de 1000 Gpb de sequências de genomas microbianos por grama de solo (VOGEL *et al.*, 2009).

Uma das maiores dificuldades para se estudar determinados organismos está relacionada ao isolamento e cultivo daqueles que não são obtidos com os meios de cultura existentes (HILL *et al.*, 2000; HUGHES *et al.*, 2001; KIRK *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006). Rondon, Goodman e Handelsman (1999) e Rondon *et al.*, (2000) consideram que os 99% de espécies de bactérias não cultiváveis apresentem aspectos fenotípicos e genéticos distintos do 1% de espécies descritas. De fato, muitas espécies novas foram descritas e estudadas nos últimos anos, sendo que uma parte significativa delas possui aplicação nos setores ambiental, industrial e agrônomo. Sendo assim, estudos envolvendo a identificação, classificação e possíveis aplicações para estes novos microrganismos vêm ganhando interesse cada vez maior nas mais diversas áreas.

O principal desafio na padronização de um meio de cultura é representar a complexidade dos microecossistemas, os quais são influenciados por uma série de fatores abióticos e bióticos, variáveis relevantes à colonização, multiplicação e estabelecimento dos microrganismos (FRANKLI; MILLS, 2009). Fatores abióticos estão relacionados ao tipo de solo e clima regionais, os quais determinam a umidade (OR *et al.*, 2007), pH (LAUBER *et al.*, 2009; ROUSK *et al.*, 2010), composição mineral (MALAVOLTA, 2006) e salinidade (RAJANIEMI; ALLISON, 2009). Fatores bióticos estão relacionados aos metabólitos excretados por bactérias e fungos, como antibióticos e exopolissacarídeos (KARLOVSKY, 2008; KRUG *et al.*, 2008), moléculas sinalizadoras, cobertura vegetal (BERG; SMALLA, 2009), exsudatos liberados por plantas (KOWALCHUK *et al.*, 2002), atividades da fauna e microfauna (SINGH; NUNAN; MILLARD, 2009), entre outros.

Além disso, interferências externas como aplicação de fertilizantes e defensivos agrícolas são fatores altamente impactantes ao estabelecimento, dispersão, sobrevivência e predominância de certas espécies (LOCKE; ZABLOTOWICZ, 2004; GIRVAN *et al.*, 2004; FIERER *et al.*, 2012).

Muitos microrganismos de vida livre estão dispersos de forma diferenciada no solo (BELL, 2010). Algumas populações de bactérias são encontradas em agregados de diferentes diâmetros, constituindo regiões de alta diversidade, por serem favoráveis ao crescimento microbiano (KIRK *et al.*, 2004; GONOD; CHENU; SOULAS, 2003; GONOD; CHADOEUF; CHENU, 2006), sendo que os mesmos encontram-se distanciados nos mais diversos valores, geralmente em escalas de micrômetros ou centímetros, dependendo do tamanho do agregado (NUNAN *et al.*, 2002, 2003; BECKER *et al.*, 2006, VOS *et al.*, 2009). A biomassa bacteriana e a estrutura das populações também variam conforme o tamanho da partícula (SESSITSCH *et al.*, 2001), sendo que populações inicialmente idênticas, formadas por fissão binária, podem formar micro-colônias diferenciadas, decorrentes de mutações ocorridas durante essa formação (GRUNDMANN, 2004; KRAEMER; VELICER, 2011), aumentando ainda mais a variabilidade de bactérias no solo.

Outras populações encontram-se principalmente associadas às raízes de determinados vegetais, habitando a região da rizosfera, como bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) associativas, fungos ectomicorrízicos e bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR). A região da rizosfera constitui um ambiente extremamente favorável aos microrganismos, uma vez que exsudatos,

especialmente carboidratos liberados pelas plantas são aproveitados pelas bactérias e fungos como alimento. Estes, por sua vez, produzem compostos igualmente benéficos aos vegetais, como hormônios vegetais, exopolissacarídeos e antibióticos contra patógenos (CONN; LAZAROVITS; NOWAK, 1997; DROZDOWICZ, 1997). Ainda, populações de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (SIQUEIRA *et al.*, 1994; JANOS, 1996) e grupos endossimbióticos de BFN são encontrados dentro das células da raiz da planta hospedeira, devido à sua capacidade invadir a raiz do vegetal e estabelecer relações simbióticas intrínsecas e bastante específicas com determinadas espécies de plantas, uma conexão altamente benéfica para ambos os participantes (HUNGRIA *et al.*, 1994; GARRITY; HOLT, 2001; SANTOS; REIS, 2008). Estes últimos grupos vêm recebendo atenção crescente devido ao seu potencial agrônomo e agroflorestal, sendo algumas espécies já disponíveis comercialmente para utilização na forma de inoculante agrícola, sobretudo de bactérias fixadoras de nitrogênio.

Sabendo da importância desses microrganismos para a manutenção da integridade do solo, inúmeras pesquisas foram desenvolvidas no intuito de identificar, classificar e esclarecer as funções biológicas dos mesmos na natureza. No Brasil, os solos são bastante diversificados em relação à formação, estrutura, pH, aporte de nutrientes, entre outros fatores, implicando em uma enorme quantidade de espécies de microrganismos adaptados a estas diferentes condições. Ainda, as interações microrganismo-microrganismo e microrganismo-planta hospedeira são resultantes de anos de evolução/co-evolução adaptativa (RIBEIRO *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2013), podendo refletir como perturbações provocadas pela introdução de espécies exóticas, desmatamento e manejo intensivo do solo após a expansão da agricultura e pecuária alteram a estrutura e composição das comunidades microbianas.

Pesquisas envolvendo tais microrganismos também contribuem para aprimorar o cultivo das culturas agrícolas e florestais de maneira eficiente e ambientalmente sustentável. Segundo Russel (1973), solos destituídos de microrganismos são inférteis porque a liberação dos nutrientes contidos na matéria orgânica fica prejudicada, afetando o crescimento dos vegetais. A agropecuária, exploração de madeira e o ecoturismo são atividades econômicas importantes para a economia do país, indicando a necessidade de utilização consciente dos solos brasileiros (VARGAS, HUNGRIA, 1997)

Um dos locais mais intensamente explorados pela agropecuária é a região dos Cerrados (KLINK; MOREIRA, 2002), especialmente após a década de 1960/70, com a mudança da capital federal para o Planalto Central (VARGAS, HUNGRIA, 1997; COSTA, SANTOS, 2011). Essa transição proporcionou a expansão e modernização agrícola, bem como inovações tecnológicas como estradas, indústrias e outras infraestruturas que integraram o interior do Brasil à economia do país. No entanto, a utilização intensiva de máquinas e insumos agrícolas e o uso indiscriminado da terra para a produção em larga escala acabaram por impactar consideravelmente o solo da região (COSTA, SANTOS, 2011).

Outro local igualmente explorado foi o bioma Mata Atlântica. Por cobrir principalmente a área costeira do Brasil, região onde os primeiros europeus se instalaram e iniciaram os processos de exploração do pau-brasil, seguido da economia açucareira, cafeeira, entre outras culturas, este ecossistema vem sofrendo mais de 500 anos de desmatamento, uma situação alarmante tendo em vista a quantidade de espécies endêmicas que o mesmo alberga (DEAN, 1995; MORELLATO; HADDAD, 2000; RIBEIRO *et al.* 2011; EISENLOHR; OLIVEIRA-FILHO; PRADO, 2015).

Neste contexto, a caracterização de microrganismos nativos destas regiões merece atenção, haja vista a necessidade de recuperar o equilíbrio da biodiversidade, sobretudo em áreas frágeis - áreas que apresentam processos erosivos, células de areia, sulcos provocados por pisoteio de gado, empobrecimento de nutrientes, perda de patrimônio genético e biodiversidade, voçoroca formada por uso e ocupação desordenada (MARQUELLI, 2003; COSTA, SANTOS, 2011) – bem como garantir um melhor aproveitamento das terras agricultáveis.

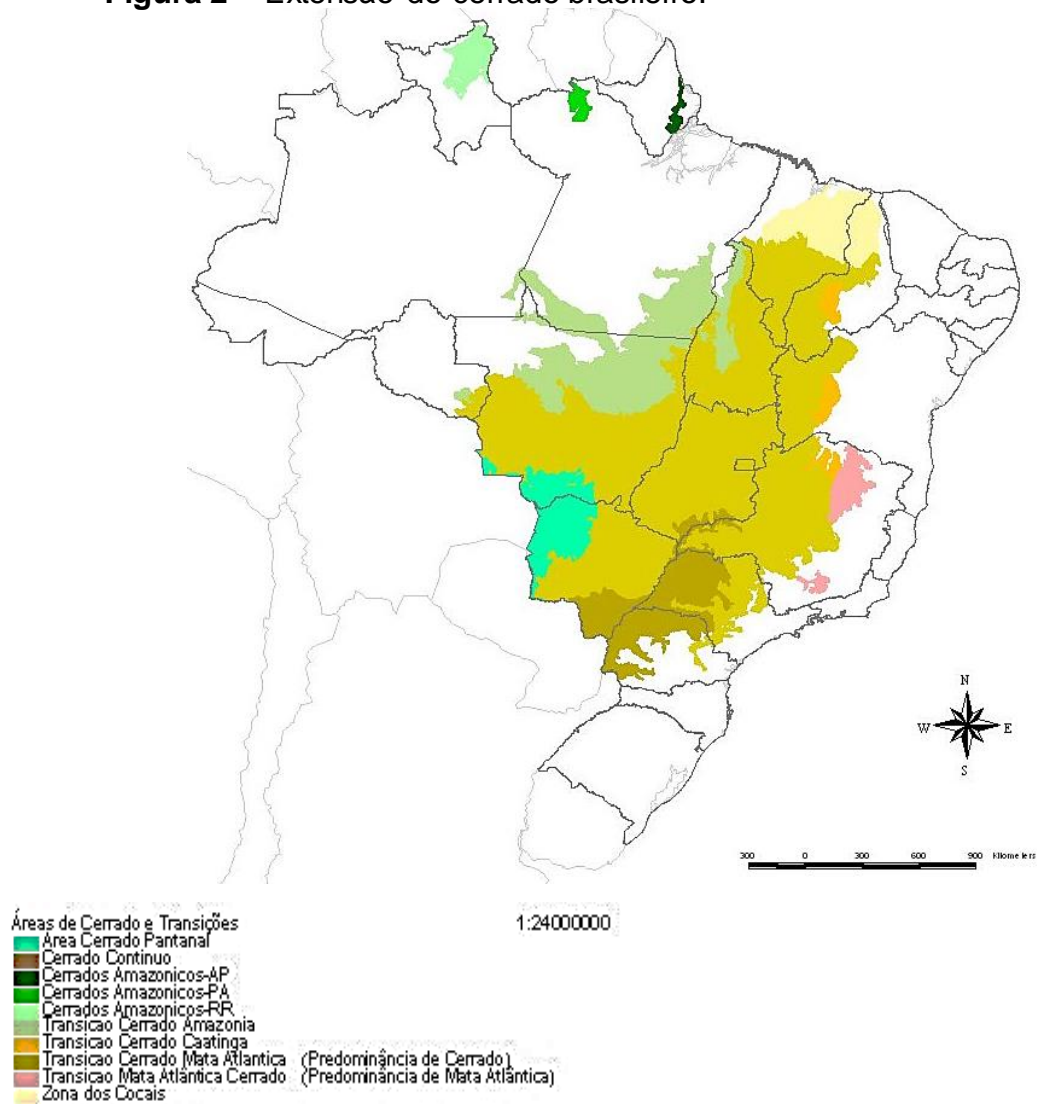
4.2 OS *HOTSPOTS* BRASILEIROS

Devido ao desmatamento desenfreado de matas nativas que ocorre por todo o planeta, muitas regiões têm recebido um alerta vermelho no que diz respeito às ameaças de extinção de plantas e animais endêmicos. O avanço da degradação ambiental é de tal tamanho que muitos cientistas se mobilizaram para definir áreas prioritárias para conservação, ou seja, áreas em que se dedicará maior atenção e investimento em preservação ambiental (MYERS *et al.*, 2000).

Para tanto, definiu-se como critério de seleção áreas que apresentassem alta

O termo Cerrado é utilizado para designar o conjunto de ecossistemas existentes no Brasil Central (EITEN, 1977; RIBEIRO; SANO; SILVA, 1981). A extensão total do bioma equivale, aproximadamente, a um quarto do território brasileiro, o segundo maior bioma do país, ficando atrás apenas da Amazônia. A região abriga um valioso patrimônio de recursos naturais, concentrando um terço da biodiversidade nacional e 5% da fauna e flora mundiais. A flora do cerrado é reconhecida como a savana mais rica do mundo (ABRAMOVAY, 1999; MYERS, *et al.*, 2000; CI-Brasil, 2014; MMA, 2014). A maior parte do território encontra-se no Planalto Central, cobrindo 155 milhões de hectares, e no Nordeste, cobrindo 38,8 milhões de hectares. O estado de Goiás é totalmente coberto por este bioma, evidenciando a importância do cerrado para a economia goiana.

Figura 2 – Extensão do cerrado brasileiro.



Fonte: UFG, 2015.

4.2.1.1 Tipos de solo

Os solos da região dos Cerrados originaram-se de camadas sedimentosas do Terciário, com predominância de areia, argila e silte, respectivamente. A maior parte da área, cerca de 46%, é constituída por latossolos, mas também são encontrados Neossolos Quartzarênicos (15,2%), Argissolos (15,1%), Cambissolos (3%), Neossolos Litólicos (7,3%), Plintossolos (9%), Gleissolos (2%), Nitossolos (1,7) entre outros (6,9%) (GOEDERT, 1987; OLIVEIRA, 2009).

Tipicamente, os solos do Cerrado são profundos, azonados, de coloração vermelha ou amarela, possuindo acidez, porosidade e saturação de alumínio elevadas e baixa concentração de nutrientes. O teor de matéria orgânica é geralmente baixo (3%) e de decomposição lenta, devido ao clima sazonal. Além disso, os solos dos cerrados são geralmente bem drenados e com pouca capacidade de retenção de água, o que os torna facilmente lixiviados (MALAVOLTA, 2006; GEOCERRADO, 2014).

4.2.1.2 Vegetação

De forma resumida, a vegetação do Cerrado é constituída por espécies vegetais arbustivas e arbóreas de pequeno porte, apresentando galhos retorcidos, cascas espessas, folhas coriáceas e raízes profundas (atingindo por vezes o lençol freático), bastantes características e habituadas às condições climáticas, edáficas e hídricas da região, distribuídas irregularmente pelo terreno formado por gramíneas rasteiras e ciperáceas (VARGAS; HUNGRIA, 1997). No entanto, devido à imensa diversidade de fitofisionomias, inclusões, áreas de transição, entre outros, as formações vegetais do cerrado possuem dois tipos de classificações. Segundo Ribeiro e Walter (1998) e Oliveira (2009), há cinco principais fitofisionomias: campo limpo, campo sujo, campo cerrado, cerrado propriamente dito (*strictu sensu*) e cerradão (floresta mesófila esclerófila), além de quatro principais inclusões - mata ciliar (mata pereniófila de galeria), mata seca (floresta mesófila estacional), veredas e campos rupestres (campos pedregosos de altitude). Já na classificação do IBGE (1989) e MMA (2016), as formações são constituídas por sete tipos centrais: formações florestais semidecíduais e decíduais (mata seca), savanas florestadas

(cerradão), savanas arborizadas (campo cerrado), savanas parque (cerrado propriamente dito), savanas gramíneo-lenhosas (campos), formações pioneiras (campos rupestres) e áreas de tensão ecológica (espaços geográficos situados na interface entre diversos ecossistemas sujeitos ou não às pressões antrópicas).

A falta de uniformidade, segundo Resende (2005), Spera *et al.* (2005) e Oliveira (2009) está relacionada às características edáficas e do relevo presentes em uma determinada extensão, ou seja, a vegetação está condicionada a fatores como acidez, fertilidade, capacidade de retenção de água, profundidade do solo, altura do lençol freático e posição da paisagem, além de queimadas constantes, as quais ocorrem espontaneamente ou provocadas pelo homem. Assim, no complexo vegetacional do cerrado pode-se encontrar desde campos até florestas, passando de uma formação campo cerrado para cerrado propriamente dito ou cerradão, alternadas com as inclusões já citadas anteriormente, sendo que a transição de uma formação para outra pode ser gradual ou abrupta.

4.2.1.3 Clima

O clima do Cerrado é caracterizado como Cwa (tropical sazonal, de inverno seco e brando e verão úmido e quente) de acordo com a classificação de Köppen. Nas serras e planaltos altos dos estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, onde as temperaturas sofrem sensíveis quedas, com ocorrência inclusive de geadas, o clima assume características de tropical de altitude (MARQUELLI, 2003).

Uma das características mais conhecidas em relação ao clima deste bioma é a forte sazonalidade, com duas estações do ano bem definidas, um período seco, que dura de abril a setembro e um período úmido, que ocorre de outubro a março. A precipitação anual varia de 800 a 2000 mm e as temperaturas são amenas ao longo do ano, sendo que a média varia de 16 a 27° C (VARGAS; HUNGRIA, 1997; KLINK; MACHADO, 2005; MENDES *et al.*, 2012).

A estacionalidade do clima, que concentra longos períodos de chuvas seguidos por secas prolongadas provocou uma adaptação bastante estratégica das plantas. Uma delas é o comprimento das raízes, as quais são capazes de alcançar água até dez metros de profundidade; outra é a germinação das sementes, que além de resistir às queimadas naturais (muitas inclusive, precisam do fogo para ativar o meristema secundário e permitir a germinação) e ocorrerem no início da

época das chuvas, ainda apresentam crescimento pronunciado nos primeiros estágios de desenvolvimento radicular (CASTRO-NEVES, 2007).

4.2.1.4 Ocupação Agrícola e Urbana

As primeiras expedições realizadas para se conhecer e explorar o interior do Brasil ocorreram durante o século XIX e início do século XX, quando vários profissionais, reunidos a mando do então Ministro da Agricultura, Comércio e Obras Públicas, Antônio Gonçalves de Faria, adentraram o Planalto Central com o intuito de estudar as condições da região e constatar se a mesma possuía características favoráveis à construção da Capital Federal (COSTA; SANTOS, 2011).

O que de fato atraiu os exploradores era a riqueza mineral e existência de ouro, pois a falta de conhecimento sobre os solos e a vegetação do Cerrado fez com que o interior do país fosse visto como um local inóspito e, portanto, impróprio para a agricultura (NETO, 1973; VARGAS; HUNGRIA, 1997; MAROUELLI, 2003; COSTA; SANTOS, 2011).

A transferência da Capital Federal para Brasília foi realizada no intuito de integrar o interior do Brasil à economia nacional. Os fazendeiros e pecuaristas interessados em ocupar as terras do Brasil central receberam incentivos e assistência técnica do Estado. Com a instalação da infraestrutura necessária a esta expansão, como rodovias e indústrias, a ocupação permanente da região foi favorecida e a agricultura modernizada (CASTRO, 2012).

A partir de então, os solos do Cerrado foram intensamente utilizados, especialmente para a produção de grãos, que respondiam bem à produção, e o relevo suave favorecia a mecanização. No entanto, o uso intensivo de máquinas agrícolas, fertilizantes, agrotóxicos, entre outros fatores acabaram por impactá-lo negativamente, abalando sua estrutura física, esgotando o aporte de nutrientes e prejudicando as comunidades microbianas ali existentes. As transformações na estrutura agrária foram tamanhas que, entre os anos de 1970 e 1975, o desmatamento médio do cerrado foi de 40.000 km² por ano (KLINK; MOREIRA, 2002; CASTRO, 2012).

Pesquisadores de diversas áreas chamaram atenção para a necessidade de se conhecer a real capacidade de uso da terra, visando estabelecer bases para o seu melhor aproveitamento com menor impacto ambiental. Dentre as avaliações estão levantamentos físicos (textura, permeabilidade, profundidade, declividade do terreno,

erosão existente e uso atual); químicos (reservatório de nutrientes, quantidade de matéria orgânica, condutividade, acidez, umidade, utilização atual de insumos agrícolas); e biológicos (microbiota e microfauna, vegetação existente, cultura produzida no local, etc), além de informações sobre o regime de plantio, clima e ecologia da região, como o regime pluviométrico, altura do lençol freático, entre outros (OLIVEIRA, 2009).

Assim, nos anos subsequentes, diversos programas de cunho agrônomico foram criados em parceria com empresas e universidades visando pesquisar maneiras de aumentar a fertilidade dos solos, a fim de se obter uma maior produtividade das lavouras com menor custo e menor impacto ambiental. Um solo é considerado fértil quando possui capacidade de suprir as plantas com nutrientes necessários ao seu crescimento (LEPSCH, 1991), e quando constitui um ambiente favorável ao desenvolvimento de várias formas de vida, como microrganismos e outros seres vivos (micro e mesofauna, por exemplo).

A adoção de práticas que minimizam a agressão e evitam o esgotamento do solo, como o plantio direto em detrimento do convencional, rotação de culturas e a integração entre lavoura, pecuária e floresta contribuem para a manutenção da fertilidade, especialmente por manter o equilíbrio das comunidades microbianas (SOUZA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2007), essenciais para disponibilizar os nutrientes e outros compostos favoráveis ao crescimento vegetal. Sendo assim, estudos acerca desses microrganismos são cada vez mais necessários, particularmente na região cujos solos apresentam conteúdo e composição de nutrientes muitas vezes abaixo do necessário para cultivos agrícolas (HUNGRIA; VARGAS, 2000; HUNGRIA; CAMPO, 2005, LEPSCH 2002; HARIDASAN, 2005, 2008).

Atualmente, a região dos Cerrados possui mais de 78,5 milhões de hectares destinados à agricultura e pecuária, sendo que, no total, são 139 milhões de hectares, (cerca de 48% do total de sua área) favoráveis para práticas de agropecuária (FUNDAÇÃO AGRISUS, 2015). Somente no período de 2011 a 2012 mais 7000 km² de área foram devastadas para tais fins. De 1976 a 2011 a área destinada a grãos e sementes oleaginosas aumentou 43,92%. No ano de 2015, o Brasil exportou por volta de 350 itens agropecuários a cerca de 180 mercados externos. (SGPA, 2014). Dentre os produtos de maior destaque no Brasil estão leguminosas como a soja, com uma área de cultivo de 28,8 a 29,5 milhões de hectares e o feijoeiro, com 1,17 e 1,21

milhões de hectares (ESTEVAM, 2014).

Tendo em vista a importância do bioma Cerrado para a economia do país, pesquisas que procurem aprimorar a produtividade sem prejudicar o equilíbrio natural do solo são cada vez mais requisitadas. Diversos grupos de pesquisas vêm estudando as interações entre plantas e microrganismos, objetivando esclarecer como ambos os organismos se adaptam às mudanças e às pressões ambientais, bem como encontrar maneiras de aplicar esse conhecimento nos setores agrônomo e ambiental, aumentando a eficiência na produção, diminuindo custos e evitando impactos ambientais indesejáveis.

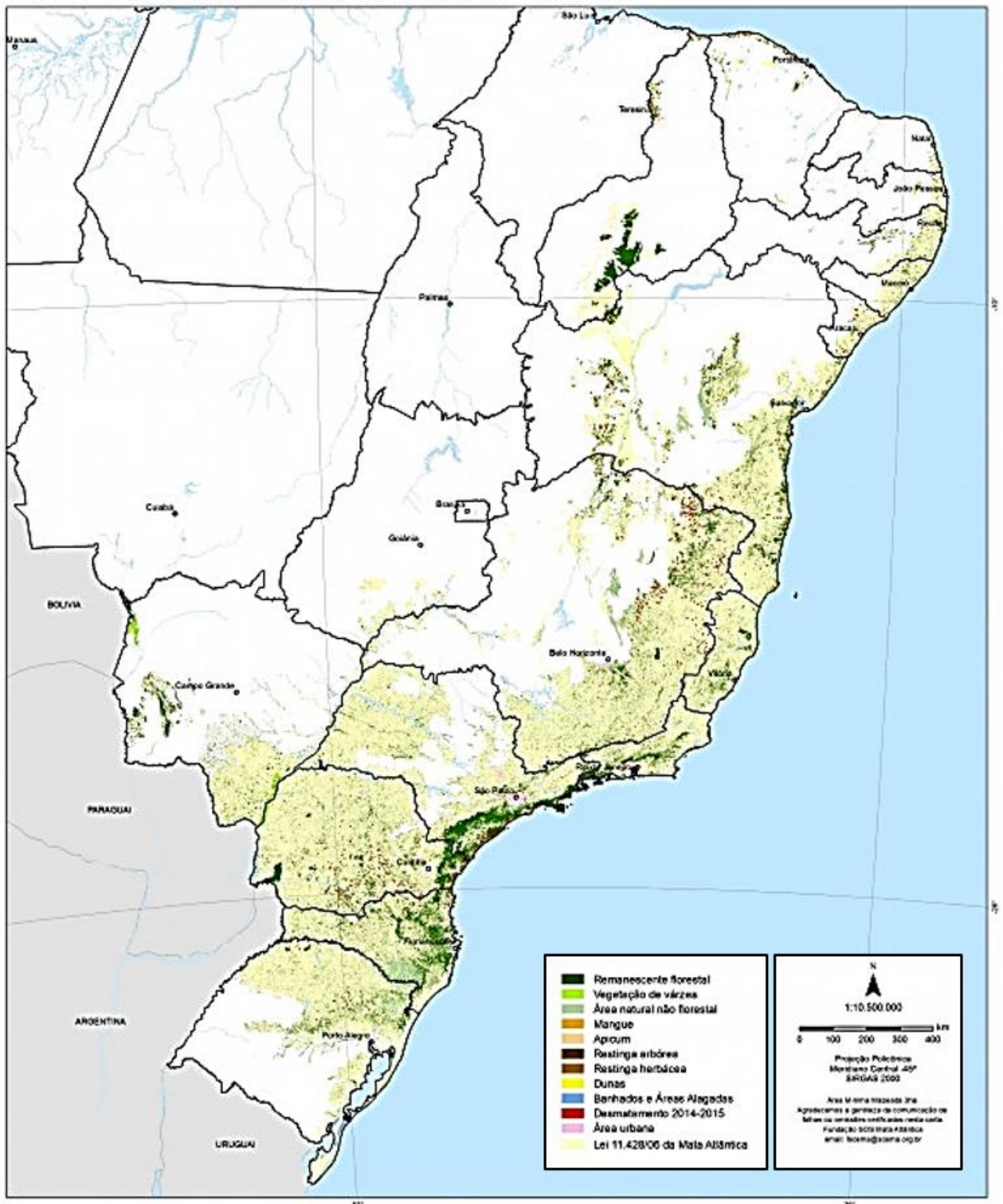
4.2.2 O Bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um dos biomas mais heterogêneos em composição de plantas e animais, abrigando uma biodiversidade significativa e muitas espécies endêmicas, algumas, inclusive, na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção (EISENLOHR; OLIVEIRA-FILHO; PRADO, 2015). É a segunda maior floresta chuvosa do continente americano: seu território original cobria cerca de 1,5 milhões de km², estendendo-se por toda a costa brasileira (92%) e ocupando o interior do sul e sudeste do Brasil, além de parte do Paraguai e Argentina (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2001; GALINDO-LEAL; CAMARA, 2003), apresentando variações de altitude (0-2900), solo, fitofisionomias vegetais e clima (MANTOVANI, 2003), o que contribui para a extensa diversidade encontrada neste bioma. Dos 26 estados brasileiros, 13 possuíam parte da sua área coberta pelo bioma, e três eram inteiramente cobertos pela floresta atlântica (Figura 3): Ceará (3%), Goiás (3%), Rio Grande do Norte (6%), Piauí (9%), Paraíba (12%), Pernambuco (18%), Mato Grosso do Sul (18%), Bahia (33%), Minas Gerais (46%), Rio Grande do Sul (48%), Alagoas (53%), Sergipe (54%), São Paulo (68%), Paraná (98%), Espírito Santo (100%), Rio de Janeiro (100%), Santa Catarina (100%).

Atualmente restam apenas 22% de seu território natural, sendo que pouco mais que 7% representados por fragmentos conservados. O restante são fragmentos em estágios diversos de regeneração (MMA, 2015) e, embora tenha sido largamente devastado, os remanescentes florestais ainda albergam mais de 80.000 espécies endêmicas de plantas vasculares e animais vertebrados (MYERS *et al.*, 2000).

Figura 3 – Domínio Mata Atlântica original e remanescentes florestais.

Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica 2014-2015



Fonte: SOS Mata Atlântica (2016).

4.2.2.1 Tipos de solo

Os solos da Mata Atlântica possuem natureza granítica e gnáissica, sendo pobres em minerais, uma vez que os mesmos estão incorporados nas plantas e pouca quantidade encontra-se disponível no solo. Boa parte dos minerais é fornecida pela grande quantidade de serapilheira, que é degradada por microrganismos presentes no solo, reciclando o aporte de nutrientes e mantendo a umidade (DONNELLY *et al.*, 1990; HU; VAN BRUGGEN, 1997).

Como a Mata Atlântica se estende desde o Nordeste até o Sul do Brasil (“tapete verde costeiro”) a quantidade de matéria orgânica e minerais varia bastante. Os mapeamentos pedológicos de vários estados brasileiros cobertos pela mata atlântica constataram os tipos Latossolo Vermelho-Amarelo, Latossolo Vermelho-Escuro, Latossolo Roxo, Latossolo Bruno, Terra Roxa Estruturada, Terra Bruna Estruturada, Podzólico Vermelho-Amarelo, Podzólico Bruno-Acinzentado, Rubrozem, Cambissolo, Areias Quartzosas, Solos Hidromórficos Gleizados indiscriminados, solos indiscriminados de mangue, solos orgânicos, solos aluviais, Solos Litólicos e afloramentos de rochas (EMBRAPA, 1984, 2013).

4.2.2.2 Vegetação

Devido à enorme extensão do bioma, passando por diferentes tipos de formações rochosas, pedológicas e climáticas, a vegetação da Mata Atlântica conta com fitofisionomias diversas, como floresta ombrófila densa, floresta ombrófila aberta, floresta ombrófila mista, floresta estacional decidual, floresta estacional semidecidual, mangues e restingas (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2015). Além disso, existem conjuntos florestais menores, mas bastante característicos, como a floresta de araucárias, encontradas nos estados da região sul (TABARELLI *et al.*, 2005), cuja árvore típica (*Araucaria angustifolia*) sofre ameaça de extinção (IUCN, 2015).

Estima-se que cerca de 20.000 espécies vegetais estão presentes na Mata Atlântica, o que corresponde a 35% das espécies existentes no Brasil e representa uma biodiversidade maior do que de alguns continentes, como a América do Norte (12.500 espécies) e a Europa (17.000 espécies) (MMA, 2015).

4.2.2.3 Clima

Assim como ocorre com os tipos de solo e vegetação, o clima na Mata Atlântica varia conforme a região, sendo equatorial ao norte e subtropical-úmido ao sul. De acordo com a classificação de Köppen-Geiger, o bioma passa por sete tipos de clima, sendo Af (equatorial), Am (monções), Aw (savana tropical), Cwb (subtropical oceânico de altitude), Cwa (subtropical úmido com invernos secos), Cfa (subtropical úmido com precipitações abundantes) e Cfb (temperado oceânico) (KOTTEK *et al.*, 2006; PEEL; FINLAYSON; MCMAHON, 2007).

As médias anuais de pluviosidade variam de 1000 mm a 4000 mm, sendo a Serra do Mar a região de maior pluviosidade, devido à barreira que a serra promove, aprisionando as nuvens de chuva que sopram do mar (RIBEIRO *et al.*, 2011)

4.2.2.4 Ocupação Agrícola e Urbana

A ocupação na Mata Atlântica foi uma das primeiras a ser realizada, visto que foi na costa brasileira que os primeiros europeus chegaram, em 1500, e iniciaram o processo de colonização. Com a chegada dos portugueses no que hoje corresponde ao nordeste do Brasil, o bioma começou a ser ocupado e explorado, primeiramente com o ciclo-econômico do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, árvore endêmica do país que hoje encontra-se ameaçada de extinção) e, depois, com as culturas de cana-de-açúcar, algodão e café. A exploração intensa e inadequada, seguida de processos intensos de urbanização e expansão agrícola resultou em uma devastadora redução da mata original, que foi reduzida à cerca de 8% de sua cobertura original (DEAN, 1995; MORELLATO; HADDAD, 2000; SCARANO, 2002; RIBEIRO *et al.* 2011; EISENLOHR; OLIVEIRA-FILHO; PRADO, 2015).

Atualmente, além de diversas áreas destinadas à agricultura e pecuária, os pólos urbanos representam um dos fatores mais impactante para o bioma. Segundo dados recentes da Fundação SOS Mata Atlântica, 3.429 municípios dos 5.570 existentes no Brasil encontram-se sob a área que inicialmente foi a Mata Atlântica, com aproximadamente 145 milhões de habitantes, o que dificulta a manutenção dos poucos remanescentes que restaram da mata original (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015a).

No total, foram mais de 500 anos de desmatamento, sem que houvesse uma

preocupação com a sustentabilidade desse ecossistema. Em períodos específicos da história brasileira, como na época da expansão cafeeira do século XIX e da ditadura militar de 1964 a 1985, a depredação foi intensificada em razão do apelo desenvolvimentista. Na ditadura militar, o auge foi atingido na década de 70, quando o governo incentivou a expansão agrícola de forma desenfreada e a construção de hidrelétricas, barragens, rodovias e usinas nucleares, além da implementação de grandes conglomerados industriais (LISBOA, 2009).

Devido à tamanha depredação deste ecossistema, muitas espécies de plantas e animais podem ter sido extintas antes mesmo que se tenha tomado conhecimento dos mesmos. Assim como ocorrido na ocupação do bioma Cerrado, muitos pesquisadores e cientistas criaram projetos visando a preservação e a exploração sustentável da Mata Atlântica, investindo em estudos detalhados sobre a fauna, flora, geologia, climatologia, entre outros aspectos que permitam identificar a composição, funcionalidade e grau de impacto ambiental que a Mata Atlântica vivencia. Nesse contexto, o conhecimento sobre os microrganismos presentes no solo e aqueles que estabelecem interações mutualísticas ou protooperativas com plantas são de extrema importância para a manutenção do ecossistema.

Dessa maneira, estudos que visem avaliar a diversidade microbiana presente nos solos de diferentes regiões da Mata Atlântica, assim como abordagens sobre os papéis desempenhados por esses microrganismos vêm a contribuir, significativamente, para futuros projetos de sustentabilidade do bioma, como por exemplo, recuperação de áreas degradadas, reflorestamento, agricultura/silvicultura de baixo impacto, entre outros aspectos benéficos ao desenvolvimento e manutenção do bioma.

4.3 O PAPEL DO NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é o macronutriente exigido em maior quantidade pelos vegetais, e constitui o quarto elemento mais abundante da matéria orgânica, representando de 8 a 16% de sua composição. Por ser essencial na estrutura e função de aminoácidos e proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, hormônios, clorofila, entre outros (MORGANTE, 2003), o N afeta diretamente a produtividade agrícola, tornando-se um fator limitante ao crescimento e desenvolvimento vegetal.

Na natureza, pode ser encontrado na forma inorgânica, como N molecular

(N₂), íons de nitrato (NO₃⁻) e amônia (NH₃), e na forma orgânica, incorporado em compostos nitrogenados. No solo, o reservatório de N é limitado, podendo esgotar-se rapidamente com cultivos intensivos, fato que é agravado por condições climáticas, como altas temperaturas e umidade, as quais levam a perdas na forma gasosa ou por lixiviação (MALAVOLTA, 2006; MELO; ALLEONI, 2009). Sendo assim, o aporte de N pode atingir valores críticos, uma vez que tais condições são predominantes em solos brasileiros.

Existem quatro fontes principais de N, porém, com diferentes disponibilidades para os vegetais. A maior parte encontra-se no solo, que contém as formas orgânicas (98%) e inorgânicas do elemento, como amônia (NH₃, a qual é convertida em íons amônio, NH₄⁺, em contato com H₂O), nitratos (NO₃⁻) e nitritos (NO₂⁻) (MORGANTE, 2003; ALFAIA, 2006), todos resultantes da decomposição da matéria orgânica. Outra fonte, menos abundante, é representada pelo N proveniente de processos não-biológicos, como combustão e vulcanismo, que o fornecem na forma de NH₃, e descargas elétricas, que oxidam o N₂ atmosférico em NO₃. Além disso, existem as fontes artificiais, constituídas por fertilizantes nitrogenados e o processo natural decorrente da fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) (BRILL, 1979; POSTGATE; HILL, 1979; POSTGATE, 1982; NEWTON, 2000; MALAVOLTA, 2006). A grande quantidade de dinitrogênio (N₂), que compõe 79% dos gases atmosféricos, não representa uma fonte acessível a eucariotos, os quais são incapazes de convertê-lo em formas assimiláveis por não possuírem o aparato necessário à redução da tripla ligação entre os dois átomos de N, uma das mais fortes já registradas na natureza (HUNGRIA *et al.*, 1994).

Somente os microrganismos conhecidos como fixadores de nitrogênio ou diazotróficos possuem a maquinaria necessária à conversão do N₂ em formas assimiláveis pelos vegetais (ZILLI *et al.*, 1998). Tal processo vem recebendo cada vez mais atenção, pois através da FBN pode-se suprir, total ou parcialmente, a demanda de N no solo, de forma eficiente e não-impactante ao meio ambiente (HUNGRIA; CAMPO, 2007).

Os fertilizantes nitrogenados, apesar de fornecerem N imediato a um solo carente deste elemento, possuem muitas desvantagens em relação à FBN. Além do custo elevado para sua produção – são obtidos por fixação industrial (processo de Haber-Bosch), que requer altas temperaturas (300 a 600°C), pressões (100 a 800 atm), hidrogênio derivado de petróleo (uma fonte não renovável, cotada em dólar e,

portanto, sujeita às variações cambiais) e catalisador com ferro – cerca de 20 a 50% dos fertilizantes nitrogenados são imobilizados nas substâncias húmicas (CASSMAN, 2003; ALFAIA, 2006, MELO; ALLEONI, 2009), uma boa parte é lixiviada, contaminando rios, lagos e lençóis freáticos (CASSMAN, 2003; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009) e outra parte é perdida na forma de gases, uma vez que espécies de *Nitrossomonas* e *Nitrobacter* (bactérias nitrificantes) convertem, respectivamente, o NH_4^+ em NO_2^- e NO_2^- em NO_3^- , que depois será transformado em N_2 por bactérias desnitrificantes. Estas bactérias também podem gerar óxidos nitrosos (NO, N_2O) os quais são nocivos ao ambiente por aumentarem o efeito estufa. Como os fertilizantes nitrogenados são fornecidos principalmente na forma amoniacal (NH_4^+), a probabilidade dessa perda é alta.

Outro agravante está relacionado ao fato de que apenas 50% do N que é disponibilizado via fertilizante é aproveitado pelas plantas, ou seja, praticamente metade da aplicação é perdida (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007). Kelley e Stevenson (1995) também haviam relatado que apenas 15% do N que é aplicado em uma cultura fica disponível para a cultura subsequente, denotando uma baixa eficiência no seu aproveitamento.

4.4 BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

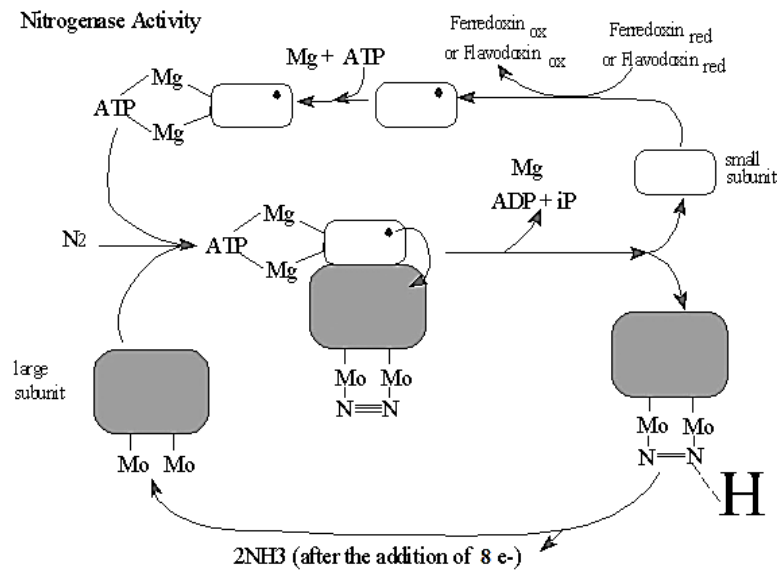
A FBN é realizada por bactérias nativas ou naturalizadas nos solos, denominadas de BFN e, também, como diazotróficas. Quanto à relação com espécies vegetais, tais bactérias podem ser de três tipos, as associativas, as quais associam-se às raízes (ou outras regiões) de plantas sem invadir suas células, as endofíticas, que se estabelecem no espaço intercelular, não provocando alterações estruturais, e as simbióticas, que invadem as células e provocam mudanças estruturais e funcionais acarretando na formação de novos órgãos na raiz, os nódulos (POSTGATE, 1982; MAGNANI, 2005). A formação dos nódulos ocorre, principalmente, com plantas da família Leguminosae (=Fabaceae) (HUNGRIA *et al.*, 1994; SANTOS; REIS, 2008), a maior família de plantas do planeta, com cerca de 18 mil espécies (MOULIN *et al.*, 2001).

Bactérias nodulantes são coletivamente denominadas de rizóbios, e abrangem um grupo de Alfa-Proteobactérias Gram-negativas dos gêneros *Allorhizobium* (de LAJUDIE *et al.*, 1998; MOUSAVI *et al.*, 2014), *Aminobacter*

(MAYNAUD *et al.* 2013), *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2006), *Devosia* (RIVAS *et al.*, 2003), *Mesorhizobium* (LARANJO, ALEXANDRE; OLIVEIRA, 2014), *Methylobacterium* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2005b, 2006), *Microvirga* (ARDLEY *et al.*, 2012), *Neorhizobium* (MOUSAVI *et al.*, 2014), *Ochrobactrum* (TRUJILLO *et al.*, 2005) '*Pararhizobium*' (MOUSAVI *et al.*, 2015), *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), (GARRITY; HOLT, 2001) e *Shinella* (LIN *et al.*, 2008); e de Beta-Proteobactérias dos gêneros *Paraburkholderia* (*Burkholderia*) e *Cupriavidus* (MOULIN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2001). A capacidade de beta-proteobactérias em formar nódulos em leguminosas foi descoberta anos mais tarde, por Moulin *et al.* (2001), que verificaram a capacidade de *Paraburkholderia* em nodular e fixar N₂, e por Chen *et al.* (2001), que isolou e identificou uma espécie nodulante de *Cupriavidus*, *C. taiwanensis*. A partir dessas publicações, espécies desta classe foram denominadas beta-rizóbios, para diferenciá-las dos já então conhecidos alfa-rizóbios.

Os nódulos são órgãos altamente especializados na FBN, consistindo, principalmente, em células da planta alteradas estruturalmente que abrigam os rizóbios com alterações morfofisiológicas. Esses rizóbios morfofisiologicamente adaptados para a FBN são chamados bacteroides e existem em grande quantidade dentro dos nódulos. Os bacteroides encontram-se dentro de estruturas compartimentalizadas por uma membrana, denominadas simbiossomas (MORGANTE, 2003; SANTOS; REIS, 2008).

A FBN é possível porque essas bactérias sintetizam uma enzima chamada dinitrogenase, capaz de transportar elétrons até a redução completa do N₂ em NH₃. Para tanto, são necessários oito elétrons, os quais passam por transferências sucessivas entre as subunidades proteicas da holoenzima, uma contendo ferro (denominada Fe-proteína) e a outra contendo ferro e molibdênio (denominada MoFe-proteína). Há, ainda, uma terceira molécula que auxilia no processo, a ferredoxina que, na sua forma reduzida, transfere elétrons para a dinitrogenase. De forma resumida, a transferência começa com a passagem dos elétrons da ferredoxina para a unidade Fe-proteína que, por sua vez, os doa para a MoFe-proteína. Esta última os acumula até concentrar oito elétrons (Figura 4). O processo todo requer alta quantidade de energia, gasto na forma de ATP (Adenosina Tri-Fosfato), como pode ser visto na reação $N_2 + 16 ATP + 8e^- + 8H^+ \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$ (MORGANTE, 2003; MALAVOLTA, 2006).

Figura 4 – Redução do N₂ pela nitrogenase

Fonte: COSTA, 2006.

4.4.1 A Formação dos Nódulos

Um processo complexo de alterações fisiológicas e morfológicas, que afeta tanto a planta hospedeira como a bactéria, ocorre durante a organogênese do nódulo. As mudanças refletem a intrincada simbiose entre planta e bactéria, uma relação de protocooperação, onde a planta fornece os carboidratos necessários ao desenvolvimento da bactéria enquanto esta utiliza a energia proveniente de compostos de carbono para reduzir N₂ a NH₃. Em seguida, prótons são incorporados à molécula de NH₃, transformando-a em íon amônio NH₄⁺ (Figura 4), o qual é rapidamente convertido em compostos orgânicos, para evitar a toxicidade causada por estes íons ao vegetal. Dessa maneira, os compostos obtidos através de tal conversão, como amidas e ureídos, abastecem e nutrem a planta hospedeira (HUNGRIA *et al.*, 1994).

Estima-se que 65% da captação de N no planeta provêm da FBN (HUNGRIA, CAMPOS, MENDES, 2007), enquanto que os fertilizantes nitrogenados contribuem com 24% e eventos de fixação não-biológica (raios, vulcanismo) com aproximadamente 10%.

A infecção inicia-se com a percepção de sinais químicos sintetizados pela planta hospedeira, que geralmente correspondem a flavonoides, moléculas fenólicas derivadas do 2-fenil-1,4-benzopirona responsáveis por atrair as bactérias para a

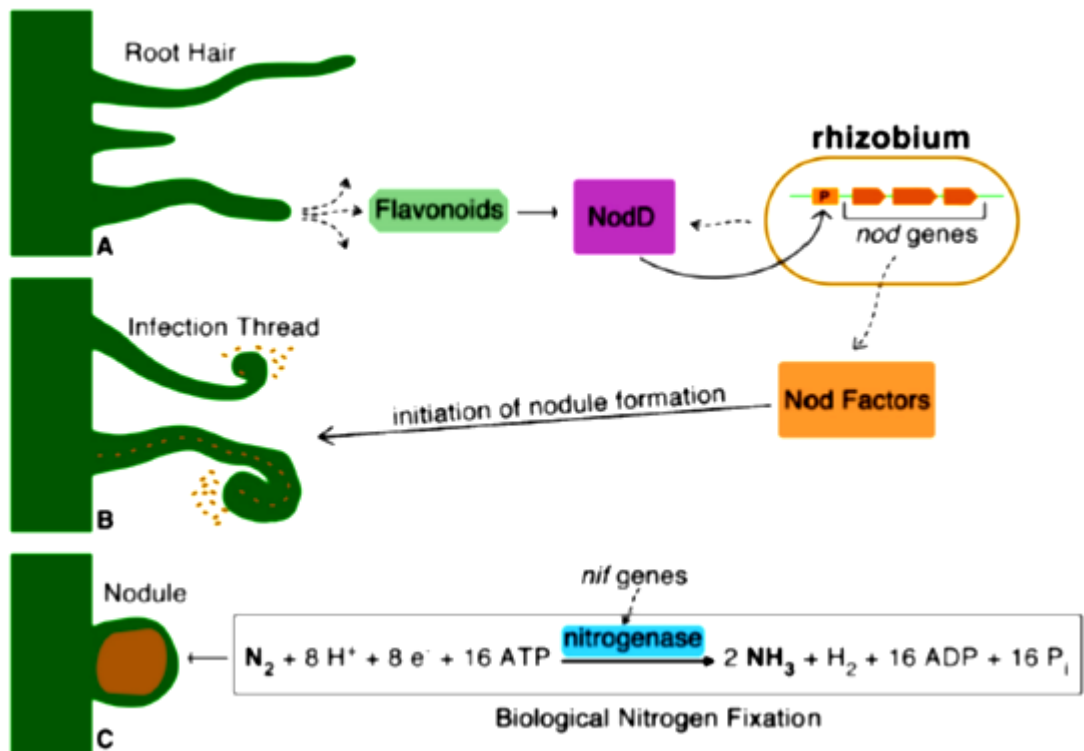
rizosfera por quimiotaxia positiva, e também por induzirem-nas a transcrever genes de nodulação - *nod*, *nol* e *noe*, os quais expressam-se através de fatores de nodulação, chamados fatores Nod (DROZDOWICZ, 1997; MORGANTE, 2003; SANTOS; REIS, 2008). Os fatores Nod são lipo-quitino-oligossacarídeos, geralmente indispensáveis para o reconhecimento entre bactéria e planta hospedeira, e pela indução de uma intensa divisão celular no córtex da raiz (Figura 5).

Após responderem aos sinais quimiotáticos e atingirem a rizosfera, as bactérias se multiplicam, colonizando os pelos radiculares. Depois da adesão ao pelo radicular, inicia-se uma deformação dos mesmos, que sofrem uma curvatura em resposta aos fatores Nod (Figura 5). Em seguida, ocorre uma degradação pontual da parede celular do pelo, o qual sofre uma invaginação, formando um canal denominado cordão de infecção, por onde a bactéria invade a célula (HUNGRIA *et al.*, 1994; MORGANTE, 2003, JONES *et al.*, 2007; SANTOS; REIS, 2008).

Uma vez formado o cordão de infecção, o subsequente crescimento do mesmo se processa, provavelmente, segundo o mesmo mecanismo requerido para extensão do pelo radicular (GAGE, 2004). O cordão cresce em direção às células no córtex da raiz que estão se dividindo, região conhecida como nódulo primário e, assim que o atinge, se ramifica para invadir várias células radiculares. Pequenos grupos de bactérias, envoltas por uma membrana derivada do plasmalema, são liberadas no citoplasma das células do nódulo primário, onde se estabelecem, se multiplicam, aumentam em tamanho e sofrem as alterações bioquímicas que as tornam especializadas em fixação de N₂. Estas estruturas – membrana no interior do citoplasma albergando diversas células bacterianas capazes de fixar N₂ – são designadas bacteroides (MORGANTE, 2003; JONES *et al.*, 2007).

As etapas envolvidas na formação do nódulo podem ser visualizadas através do esquema representado na Figura 5.

Figura 5 – Infecção de raiz de leguminosa por bactérias do gênero *Rhizobium*



Fonte: LARANJO, ALEXANDRE; OLIVEIRA, 2014.

A eficiência da FBN varia entre as diferentes espécies e seus hospedeiros. Há espécies extremamente competitivas, que se estabelecem rapidamente na raiz do vegetal, porém não fixam N_2 eficazmente, ao passo que existem espécies bastante promissoras no processo de FBN, mas que não vencem a competição com outros microrganismos habitantes da rizosfera, possuindo um baixo estabelecimento da simbiose. Exemplos dessas interações podem ser observados em espécies de *P. vulgaris* (feijoeiro), o qual é bastante promíscuo em relação à nodulação (VARGAS; HUNGRIA, 1997). Espécies bacterianas como *Rhizobium tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), *R. leucaenae* (RIBEIRO *et al.*, 2012) e *R. freirei* (DALL'AGNOL *et al.*, 2013) são bastante eficientes nos trópicos, em solos ácidos, tanto na fixação de N_2 em feijoeiro, quanto na infecção e nodulação. Por esse motivo, estirpes pertencentes a essas espécies são preferencialmente utilizadas como inoculantes no Brasil. Estirpes de *Paraburkholderia* apresentam alta competitividade em relação às alfa-proteobactérias em espécies de *Mimosa* spp. (ELLIOTT *et al.*, 2009) e, também, podem ser encontradas em nódulos de feijoeiro (TALBI *et al.*, 2010).

Devido à alta contribuição da FBN no suprimento de N para os vegetais, é

notável a importância do papel ecológico desempenhado por bactérias diazotróficas. Além disso, a aplicação dessas bactérias na forma de inoculantes agrícolas pode reduzir drasticamente os gastos com fertilizantes nitrogenados, como no caso da cultura de soja (*Glycine max*) no Brasil, a qual tem uma economia estimada em 15 bilhões de dólares/ano (HUNGRIA; MENDES, 2015).

4.4.2 Os Genes *nod*

O estabelecimento da simbiose entre bactéria e planta hospedeira pode ocorrer se as bactérias portam genes necessários ao processo de FBN, identificados como genes *nif* e *fix*, e ao processo de nodulação, identificados como genes *nod*, *nol* e *noe* (HUNGRIA; STACEY, 1997; MORGANTE, 2003; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009). As proteínas NodD são as principais envolvidas na regulação da nodulação (PERRET *et al.*, 2000), pois formam um complexo com os flavonoides exsudados pelas plantas e interagem com uma região promotora conservada na maioria dos genes *nod* no genoma da bactéria, chamados *nod boxes*, culminando com a transcrição desses genes e posterior tradução em proteínas que sintetizam e secretam os lipo-quito-oligossacarídeos, ou fatores de nodulação (Fator Nod) (BROUGHTON *et al.*, 2006). São esses fatores que permitem à bactéria penetrar nas raízes das leguminosas, mas outros compostos também podem auxiliá-las na infecção, como carboidratos, proteínas e polissacarídeos presentes na superfície celular do simbionte. Em relação a estes últimos, acredita-se que estejam envolvidos na iniciação do cordão de infecção, invasão do nódulo, e especificidade hospedeira, mas pouco se sabe sobre como é feita a regulação das mudanças na superfície celular durante a infecção e etapas subsequentes do desenvolvimento do nódulo (BROUGHTON *et al.*, 2006).

Segundo Freiberg *et al.* (1997), um controle mais refinado da transcrição dos genes *nod* está possivelmente relacionado a variações nas sequências de regiões conservadas dos promotores desses genes e varia de estirpe para estirpe, mas é quase sempre mediada pelo NodD. A estrutura central do fator Nod é sintetizada por uma N-acetil glucosaminiltransferase, enzima produzida pelo gene *nodC*, por uma deacetilase, produzida pelo gene *nodB* e por uma aciltransferase, produzida pelo gene *nodA* (SANTOS; REIS, 2008).

Em espécies de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (*M. amorphae* e

M. huakuii), os genes *nod* estão localizados em elementos genômicos potencialmente transferíveis (plasmídeos ou megapasmídeos) e em *M. loti* e espécies de *Bradyrhizobium* (*B. japonicum*, *B. elkanii* e *B. diazoefficiens*) encontram-se em regiões cromossomais potencialmente transferíveis (ilhas simbióticas) (WANG; MARTÍNEZ-ROMERO, 2000; SANTOS; REIS, 2008). Curiosamente, um estudo filogenético dos genes *nodA* e *nodB* de *Burkholderia* sp. mostrou um agrupamento próximo a outros rizóbios, sugerindo que a presença desses genes em alfa e beta-proteobactérias possivelmente ocorreu por transferência genética horizontal há 70 milhões de anos, após o surgimento de plantas leguminosas no planeta (MOULIN *et al.*, 2001).

4.5 TAXONOMIA BACTERIANA

A taxonomia (ou sistemática) bacteriana consiste na ciência que classifica, identifica e nomeia os microrganismos de acordo com as regras internacionais estabelecidas pelo “*International Code of Nomenclature of Bacteria*” (SNEATH, 1992; VANDAMME *et al.*, 1996). Os níveis de classificação começam com o Domínio, representados por *Archaea* e *Bacteria*, seguidos pelos Filos, Classes, Ordens, Famílias, Gêneros, Espécies e Subespécies (GARRITY; HOLT, 2001).

Uma classificação adequada de um determinado microrganismo deve seguir processos rigorosos, evitando dúvidas ou equívocos durante o desenvolvimento de uma pesquisa científica, durante a obtenção e manipulação de um produto originário de microrganismos ou durante a utilização do procarionte para fins biotecnológicos.

Diversas ferramentas são utilizadas a fim de se atingir um consenso taxonômico dos microrganismos em estudo. A integração de dados fenotípicos, genotípicos e filogenéticos garante uma melhor definição da verdadeira posição taxonômica de uma estirpe ou de um grupo de estirpes. Esse estudo integrado é denominado análise polifásica, e tem contribuído muito para a identificação de novas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, descritas nos últimos anos.

Informações fenotípicas, como análises morfofisiológicas, sorologia, perfil de ácidos graxos celulares e exopolissacarídeos (EPS), padrões enzimáticos, entre outros (GILLIS, *et al.*, 1995; VANDAMME *et al.*, 1996) funcionam como dados complementares às informações genéticas e filogenéticas, e devem ser utilizados para sustentar os mesmos. Apesar da incapacidade de se inferir dados do genoma

pelas características fenotípicas, uma vez que a expressão do gene pode variar com o ambiente e a técnica, dados fenotípicos podem contribuir para a rápida identificação de um gênero ou um grupo determinado de espécies.

As informações genotípicas, como análises de ácidos nucleicos (DNA e RNA) por meio de diversas técnicas que visem à obtenção de perfis gênicos, são mais informativas e confiáveis. Como exemplo, têm-se os perfis de BOX-PCR, padrões de restrição (RFLP), porcentagem de G+C, sequenciamento de genes, entre outras (VANDAMME *et al.*, 1996; STACKEBRANDT *et al.*, 2002), cujas aplicações variam com o objetivo do estudo e com o nível taxonômico pretendido. Classificações em nível de gênero ou espécie podem, muitas vezes, ser obtidas por apenas uma ou poucas técnicas. No entanto, se o intuito é descrever uma nova espécie, são necessárias informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas e, normalmente, mais de uma técnica é aplicada para cada informação.

Atualmente, há um enorme volume de dados de sequências genéticas e proteicas de diferentes microrganismos organizadas em bancos de dados virtuais, podendo ser acessadas e utilizadas a qualquer momento, em qualquer país. Essa revolução biotecnológica surgiu principalmente a partir dos anos 70, após a invenção da metodologia de sequenciamento por Sanger, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e da hibridação DNA-DNA, as quais foram se aperfeiçoando e se tornando ferramentas ainda mais velozes, precisas e confiáveis. Assim, análises de sequências nucleicas da molécula de DNA vêm ganhando cada vez mais notoriedade, especialmente na ciência taxonômica (KLENK; GOKER, 2010).

4.6 O GÊNERO *RHIZOBIUM*

Rhizobium é um dos gêneros de bactérias nodulantes e fixadoras de N₂ que mais se expandiu em número de espécies nos últimos anos. Dentre os 15 gêneros de alfa-rizóbios (*Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Neorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Phylobacterium*, '*Pararhizobium*', *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), *Shinella*), *Rhizobium* é o que conta com o maior número de espécies descritas e um dos primeiros a serem descobertos.

Em 2016, o número de espécies descritas para o gênero *Rhizobium* foi de 95 (LPSN, 2016), sendo a maioria isolada de nódulos de leguminosas. Devido às suas

propriedades biotecnológicas, em especial sua habilidade em fixar nitrogênio de forma eficiente em muitas espécies vegetais, muitos grupos de pesquisa têm se interessado pelas espécies deste gênero, fazendo com que o número de estudos relativos às suas propriedades, funções, ecologia, diversidade, entre outros aspectos aumentasse substancialmente. Em 2015-2016 foram descritas 16 novas espécies de *Rhizobium*, e muitas estão em processo de descrição, ou aguardando publicação.

Na presente classificação taxonômica, o gênero *Rhizobium* encontra-se dentro do Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rhizobiales, Família Rhizobiaceae (GARRITY; HOLT, 2001; LPSN, 2016; STRAININFO, 2016). Dentro de Rhizobiaceae fazem parte outros sete gêneros de bactérias simbióticas, como já citado anteriormente: *Allorhizobium* (uma espécie), *Azorhizobium* (três espécies), *Mesorhizobium* (36 espécies), *Neorhizobium* (três espécies), '*Pararhizobium*' (quatro espécies), *Sinorhizobium* (= *Ensifer*) (11 espécies), *Shinella* (seis espécies) (LPSN, 2016). *Bradyrhizobium* (35 espécies), outro importante gênero de rizóbios, pertence à família Bradyrhizobiaceae (LPSN, 2016; IJSEM, 2016). *Ochrobactrum* (17 espécies) pertence à família Brucellaceae. Já *Methylobacterium* (51 espécies) e *Microvirga* (nove espécies), pertencem à família Methylobacteriaceae (GARRITY *et al.*, 2005b, 2006), enquanto *Aminobacter* (seis espécies) e *Phyllobacterium* (11 espécies) fazem parte da família Phyllobacteriaceae.

Algumas classificações continuam imprecisas dentro da família Rhizobiaceae. O gênero *Agrobacterium* (11 espécies), por exemplo, é considerado por Young, Downer e Eardly (2001) e Young (2003) como próximo o suficiente de *Rhizobium* a ponto de ser incluído no mesmo gênero, e por Farrand; van Berkum e Oger, (2003) como pertencente a um gênero distinto, devido à ocorrência de diferenças significativas que apresentam entre si.

Outra nomenclatura polêmica é a do gênero *Sinorhizobium*, cuja publicação ocorreu em 1988, sendo que o gênero *Ensifer*, que agrupa as mesmas espécies de *Sinorhizobium*, ocorreu em 1982 e, portanto, possui prioridade na data de publicação (YOUNG, 2010). A transferência de todos os microrganismos classificados como *Sinorhizobium* para *Ensifer* foi proposta por Martens *et al.* (2007) e Young (2003) mas a questão ainda é controversa.

4.6.1 Histórico taxonômico

O gênero *Rhizobium* foi descrito em 1886 por Kirchner para representar o grupo de bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio em leguminosas. A descrição foi feita com base em características fenotípicas, já que caracterizações mais detalhadas eram limitadas pelas técnicas disponíveis na época. No caso do feijoeiro (*P. vulgaris*), a primeira espécie a ser identificada foi denominada *R. phaseoli* (FRED; BALDWIN; MCCOY, 1932), sendo esta classificação baseada no conceito de inoculação cruzada, ou seja, acreditava-se que cada espécie *Rhizobium* era específica para uma determinada espécie de leguminosa, fazendo com que as estirpes fossem classificadas e nominadas de acordo com suas plantas hospedeiras (JORDAN; ALLEN, 1974). Posteriormente esta espécie foi reclassificada com *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (JORDAN, 1984). [O termo biovar (biótipo variante) era utilizado para designar grupos de estirpes que se distinguiam de outras estirpes da mesma espécie por suas características simbióticas, como a alta afinidade por uma determinada planta hospedeira. Em 2011, Rogel, Ormeno-Orrillo e Martínez-Romero propuseram o termo “simbiovar” para grupos de estirpes de rizóbios pertencentes a um mesmo táxon que apresentavam propriedades simbióticas particulares (variantes simbióticas)].

Este conceito de inoculação cruzada logo foi descartado, uma vez que espécies referidas como “promíscuas” podem estabelecer simbiose com diferentes espécies de BFN, como é o caso do feijoeiro. Sendo assim, muitas estirpes de espécies diferentes que eram nomeadas como *R. leguminosarum* foram sendo reclassificadas em novas espécies.

Outro caráter fenotípico que foi utilizado, juntamente com diversas características bioquímicas, para a definição e reclassificação das espécies no gênero *Rhizobium* foi o crescimento bacteriano. Foi notado que determinadas espécies apresentavam crescimento rápido (cerca de três dias) enquanto outras levavam praticamente o dobro do tempo para se desenvolver (cerca de sete dias) (JORDAN; ALLEN, 1974; BUCHANAN, 1980). Bactérias pertencentes a este último grupo foram realocadas em um novo gênero, denominado *Bradyrhizobium* (*brady* = lento) (JORDAN, 1982, 1984).

Com o estabelecimento de novas metodologias, com ênfase em métodos moleculares, aplicados à taxonomia bacteriana, conceitos puramente fenotípicos

foram perdendo validade. Alguns trabalhos verificaram, por exemplo, que espécies diferentes de bactérias podem estabelecer simbiose com uma mesma planta, assim como diferentes espécies de plantas podem ser noduladas por uma mesma espécie bacteriana. Tanto plantas como bactérias que apresentam esta condição são chamadas de “promíscuas”, a exemplo do feijoeiro (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991; VARGAS; HUNGRIA, 1997; MICHIELS *et al.*, 1998; MÓRON *et al.*, 2005; STOCCO *et al.*, 2008; CARDOSO; HUNGRIA; ANDRADE, 2012).

Graças aos avanços obtidos na área de biologia molecular e bioinformática, como PCR, sequenciamento, entre outros, características genéticas e bioquímicas foram sendo utilizadas na detecção e classificação dos organismos. Equipamentos e softwares cada vez mais sensíveis à leitura e interpretação das moléculas permitiram avaliar, com maior precisão, as relações evolutivas entre microrganismos altamente relacionados, marcando uma nova era na área da taxonomia procariótica. Algumas estirpes que foram erroneamente classificadas como pertencentes a uma determinada espécie de *Rhizobium* hoje estão sendo reclassificadas, e, conseqüentemente, determinadas características que antes eram dúbias estão sendo desvendadas, clareando nosso entendimento acerca destes microrganismos.

Exemplos de reclassificações importantes foram as ocorridas com as espécies *R. leucaenae*, *R. freirei* e *R. paranaense*, todas nomeadas anteriormente como pertencentes à espécie *R. tropici*. Foi através de análises fenotípicas, genotípicas e filogenéticas que desvendaram-se as diferenças existentes entre essas estirpes. Em 1991, Martínez-Romero e colaboradores haviam observado diferenças fenotípicas e genotípicas entre estirpes de *R. tropici* e classificaram-nas como *R. tropici* grupo A e grupo B. Hungria *et al.* (2000) e Hungria, Campo e Mendes (2003) confirmaram essas diferenças, pautadas em análises filogenéticas, onde via-se claramente a formação de um *cluster* para o grupo A e outro para o grupo B. Além disso, Ribeiro *et al.* (2009) identificaram, através de estudos de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*, que consiste na análise de diversos genes *housekeeping*), que um terceiro grupo era formado entre as estirpes do grupo A e B, e uma das estirpes, denominada PRF 81, encontrava-se isolada na árvore filogenética, fato que já havia sido verificado por Stocco *et al.* (2008).

Ribeiro e colaboradores (2012) reclassificaram as estirpes do grupo A em *R. leucaenae*, através de uma análise polifásica feita com as estirpes candidatas. Posteriormente, a estirpe PRF 81 foi reclassificada na espécie *R. freirei* por

Dall'Agnol *et al.* (2013), também através de uma análise polifásica. No ano seguinte, esses mesmos autores reclassificaram as estirpes que se agrupavam entre os grupos A (*R. leucaenae*) e B (*R. tropici*) em uma nova espécie, denominada *R. paranaense* (DALL'AGNOL *et al.*, 2014). Essa reclassificação fez parte deste trabalho e será apresentada com mais detalhes no item “Estudo 1”.

4.7 O GÊNERO *BURKHOLDERIA/PARABURKHOLDERIA*

O gênero *Burkholderia* abrange mais de 90 espécies de bactérias (LPSN, 2016) que habitam diversos ecossistemas. É um dos gêneros mais cosmopolitas, podendo ser encontrado em ambientes como água doce e salgada, no solo, na rizosfera de plantas e no interior de nódulos de leguminosas, sendo que, nesses últimos dois casos, diversas bactérias podem interagir benéficamente com as plantas hospedeiras. Contudo, outras espécies podem atuar como patógenos oportunistas de homens e plantas, como as espécies do complexo *B. cepacia* (BCC) e o grupo *B. pseudomallei* (COENYE *et al.*, 2001; CHENG; CURRIE 2005; NIERMAN *et al.* 2004; MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008; VIAL *et al.*, 2011). Devido à importância médica, essas espécies foram largamente estudadas e investigadas em relação à virulência, distribuição no ambiente, espectro de hospedeiros, entre outros aspectos.

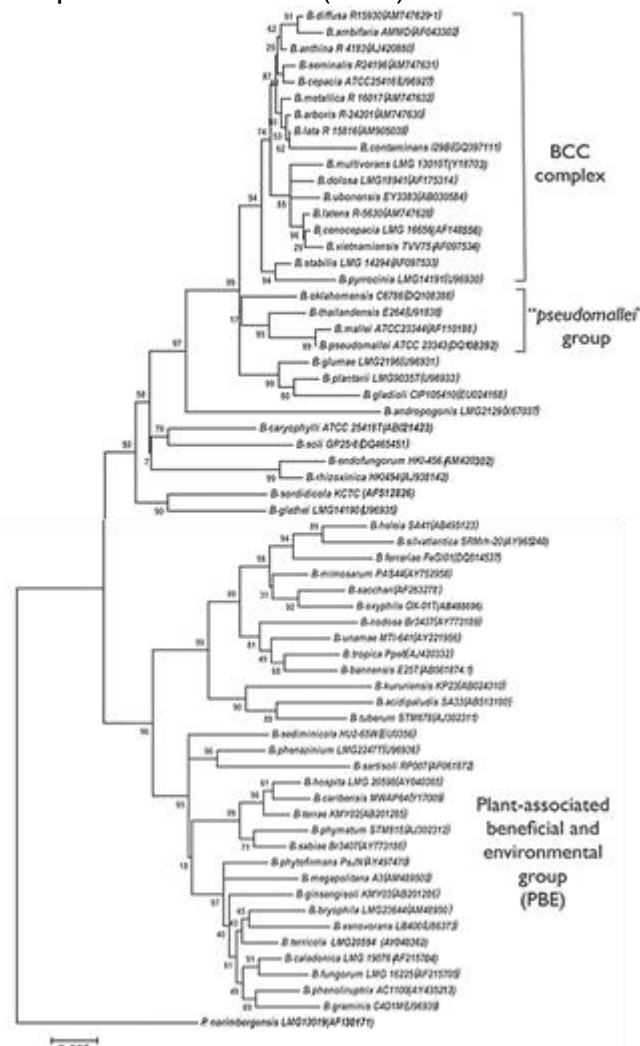
O complexo BCC, atualmente com 18 espécies, é um dos mais conhecidos por causar infecções no trato respiratório de indivíduos com imunidade comprometida, normalmente pacientes portadores de fibrose cística (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008). O grupo *B. pseudomallei* conta com apenas quatro espécies, duas delas bastante conhecidas por serem agentes causadores da melioidose em humanos (*B. pseudomallei*) (CHENG; CURRIE 2005) e mal de mormo em equinos (*B. mallei*) (NIERMAN *et al.* 2004). As outras espécies, *B. oklahomensis* e *B. thailandensis*, estão normalmente associadas a estas duas enfermidades, porém, causam infecções mais leves (BRETT; DESHAZER; WOODS, 1977; MCCORMICK *et al.*, 1977).

A variedade de interações entre *Burkholderia* e seus hospedeiros é complexa, diversa e muitas vezes contraditória. Algumas espécies parecem interagir estritamente com um tipo de hospedeiro, enquanto outras possuem uma enorme abrangência, sendo que a interação pode ser de natureza patogênica, endofítica ou

simbiótica (COENYE *et al.* 2001). Entre as espécies fitopatogênicas, por exemplo - *B. gladioli*, *B. glumae* (NANDAKUMAR *et al.*, 2009), *B. plantarii* (AZEGAMI *et al.*, 1987) e *B. andropogonis* (LI; de BOER, 2005) – encontram-se espécies que também podem causar doenças em humanos.

Diversas espécies de *Burkholderia* são benéficas ao meio ambiente, albergando espécies associativas, endofíticas e simbióticas. A Figura 6 mostra a árvore filogenética de um estudo realizado por Suárez-Moreno e colaboradores (2011), construída com base no gene 16S RNAr, contendo as espécies conhecidas de *Burkholderia* e *Pandoraea norimber* LMG 13019 como grupo externo. Nota-se a formação de dois clados distintos, um contendo espécies do complexo BCC (*Burkholderia cepacia* complex), do grupo “pseudomallei” e patógenos de plantas, e outro contendo espécies não patogênicas associadas a plantas ou ao meio ambiente.

Figura 6 – Filogenia de *Burkholderia* com base no gene 16S RNAr, mostrando os principais grupos do gênero – Complexo BCC, Grupo *pseudomallei* e espécies ambientais (PBE).



Fonte: Suárez-Moreno (2011).

4.7.1 Histórico taxonômico

A descrição do gênero *Burkholderia* ocorreu em 1992 por Yabuuchi e colaboradores, com o intuito de reclassificar sete espécies de *Pseudomonas* (*B. cepacia*, *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. gladioli*, *B. caryophylli*, *B. pickettii* e *B. solanacearum*) que eram agrupadas separadamente das outras espécies do gênero em análises filogenéticas do gene 16S RNAr, denominadas Grupo II (KARPATI; JONASSON, 1996; SHELLY *et al.*, 2000). Posteriormente, muitas outras espécies foram descritas e incluídas no gênero. No entanto, devido à grande versatilidade entre as espécies do gênero, foi possível identificar, desde os primeiros estudos filogenéticos, sub-linhagens que separavam espécies ambientais (habitantes de

água, solo, rizosfera, endofíticas e simbiontes) de espécies patogênicas, embora essas posições filogenéticas não fossem claras (GOVAN; VANDAMME, 1998; ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001; CABALLERO-MELLADO *et al.* 2004). Baseando ainda na filogenia do 16S RNAr, o agrupamento contendo espécies ambientais foi denominado Grupo A e o de espécies patogênicas foi denominado Grupo B.

Em seguida, análises mais refinadas, utilizando a técnica de MLSA confirmaram esses mesmos grupos, como observado nos trabalhos de Vandamme *et al.* (2000), utilizando o gene *recA*, e Tayeb *et al.* (2008), onde foram utilizadas sequências dos genes *gyrB* e *rpoB*. Mais recentemente, estudos de MLSA feitos com diversos genes *housekeeping* e um número maior de espécies de *Burkholderia*, incluindo espécies recém-descritas, tornaram evidente essa separação (GYANESHWAR *et al.* 2011; SUÀREZ-MORENO *et al.*, 2011; ESTRADA DE LOS SANTOS *et al.*, 2013, SAWANA *et al.*, 2014; ZULETA *et al.*, 2014) levantando debates sobre a possibilidade de uma divisão do gênero. Gyaneshwar *et al.* (2011) propuseram o nome *Caballeronia* para o Grupo A, que foi igualmente sustentado por Zuleta *et al.* (2014). No mesmo período Sawana *et al.* (2014) realizaram uma abordagem filogenética com base em proteínas conservadas do cromossomo e obtiveram basicamente os mesmos *clusters* encontrados em estudos anteriores (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2013), no entanto, o nome proposto para o Grupo A foi *Paraburkholderia*.

Em 2015 e 2016, ambos os nomes foram validados e espécies agrupadas no clado ambiental foram transferidas para o gênero *Paraburkholderia*. Além disso, algumas espécies de *Burkholderia* e *Paraburkholderia* que apresentavam características distintas foram acomodadas no gênero *Caballeronia* (OREN; GARRITY, 2015; DOBRITSA; SAMADPOUR, 2016)

A transferência de *Burkholderia* benéficas ao meio ambiente para novos gêneros foi uma questão delicada. Muitos autores consideram estudos com grandes populações inconsistentes, a exemplo dos estudos com amplas populações de rizóbios (Woomer *et al.*, 1990; Yao *et al.*, 2002; Vinuesa, 2005), requerendo uma abordagem mais abrangente, onde, além das evidências moleculares, haja evidências relativas à presença ou ausência de fatores de virulência, distribuição biogeográfica, interações planta-hospedeiro, entre outros fatores que justificassem a divisão do gênero.

Tendo isso em vista, estudos recentes foram realizados de maneira a verificar a probabilidade das espécies ambientais, alocadas no novo gênero *Paraburkholderia*, de causarem patogenicidade. Angus e colaboradores (2014) utilizaram ferramentas de bioinformática para localizar fatores de virulência em muitas espécies representativas de *Burkholderia*, tanto patogênicas de mamíferos e plantas, como oportunistas, ambientais e simbióticas. Eles constataram que as espécies patogênicas possuíam proteínas ligadas à virulência, denominadas T3SS-3 e T6SS-5, e que tais proteínas eram ausentes nas espécies ambientais. Estes mesmos autores realizaram um teste de inoculação em *Caenorhabditis elegans* e confirmaram que as espécies simbióticas eram incapazes de causar patologias no nematóide, além de serem sensíveis à maioria dos antibióticos testados. Outro estudo realizado por Chen *et al.* (2014) verificaram, através de uma abordagem transcriptômica, que *Burkholderia* ambientais que apresentavam sequências gênicas codificadoras de proteínas patogênicas não possuíam genes e/ou reguladores necessários à invasão celular, como o *bsaN*. Além disso, Alavi *et al.* (2014) averiguaram que *Burkholderia stricto sensu* eram capazes de crescer a 37°C (temperatura necessária para infecção em humanos), o que não ocorria com as bactérias do clado ambiental (*Paraburkholderia*). Mesmo assim, a utilização de espécies de *Paraburkholderia* com intuítos agrônomicos ou biotecnológicos ainda precisa de cautela, sendo necessárias caracterizações completas a fim de certificar sua segurança, antes de prosseguir com aplicações, como por exemplo, abordagens taxonômicas precisas, propriedades morfofisiológicas, testes de patogenicidade em modelos de infecção certificados, entre outros (ALAVI *et al.* 2014; EBERL; VANDAMME, 2016).

Atualmente, o gênero *Paraburkholderia* encontra-se dentro do Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Betaproteobacteria, Ordem Burkholderiales, Família Burkholderiaceae (GARRITY *et al.*, 2005a; SAWANA *et al.*, 2014; OREN; GARRITY, 2015). Dentro de Burkholderiaceae encontra-se outro gênero - *Cupriavidus* (15 espécies), que apresenta duas espécies capazes de formar nódulos em leguminosas, *C. tvaianensis* e *C. necator* (LPSN, 2016; CHEN *et al.*, 2001; da SILVA *et al.*, 2012).

4.7.2 *Paraburkholderia* simbióticas

Uma abordagem inovadora foi realizada por Santos *et al.* (2001) e Moulin *et al.* (2001), os quais publicaram trabalhos marcantes em relação ao gênero *Puraburkholderia* no mesmo ano. O primeiro grupo identificou muitas espécies fixadoras de N₂, enquanto o segundo verificou que algumas espécies eram capazes de nodular leguminosas, uma característica bastante curiosa, uma vez que tal habilidade havia sido verificada somente entre espécies de alfa-proteobactérias. A presença dos genes de fixação e nodulação, tais como *nifH*, *nodA*, *nodB* e *nodC* também foi verificada (MOULIN *et al.* 2001; GYANESHWAR *et al.* 2011), refletindo o potencial desse gênero para aplicações biotecnológicas na agricultura e meio ambiente.

Atualmente, existem treze espécies de *Paraburkholderia* que efetivamente causam a formação de nódulos em raízes de leguminosas: *P. tuberum*, *P. phymatum* (VANDAMME *et al.*, 2002), *P. phenoliruptrix* (COENYE *et al.*, 2004), *P. mimosarum* (CHEN *et al.*, 2006), *P. nodosa* (CHEN *et al.*, 2007), *P. sabiae* (CHEN *et al.*, 2008), *P. symbiotica* (SHEU *et al.*, 2012), *P. rhynchosiae*, *P. sprentiae* (de MEYER *et al.*, 2013), *P. diazotrophica* (SHEU *et al.*, 2013), *P. dilworthii* (de MEYER *et al.*, 2014), *P. caballeronis* (MARTINEZ-AGUILAR *et al.*, 2014) e *P. aspalathi* (MAVENGERE; ELLIS; LE ROUX, 2014). Os principais gêneros de plantas hospedeiras dessas *Paraburkholderia* são espécies de *Mimosa* e *Piptadenia* (BONTEMPS *et al.*, 2010; dos REIS *et al.*, 2010; BOURNAUD *et al.*, 2013), mas também podem formar nódulos em *Macroptilium* (ANGUS *et al.* 2013), *Cyclopia*, *Aspalathus* (ELLIOTT *et al.*, 2007) e feijoeiro (FERREIRA *et al.*, 2012).

No Brasil, entre 1998 e 2000 nosso grupo de pesquisa isolou diversas estirpes de rizóbios na região dos Cerrados, uma das regiões mais importantes para a produção de grãos no país. A coleta foi realizada usando como planta-isca *P. vulgaris*, nas áreas preservadas e de agricultura anual ou sazonal. Espécies nodulantes de *Paraburkholderia* foram encontradas predominantemente nas áreas não-perturbadas, demonstrando a importância dessas bactérias na microbiota original dos Cerrados (dados não publicados).

Mais recentemente, outra grande coleta foi realizada por Bournaud *et al.* (2013) em diversos locais do estado do Rio de Janeiro (Bioma Mata Atlântica), com o objetivo de avaliar a diversidade e afinidade de *Paraburkholderia* em plantas da

tribo Mimoseae. Os solos foram coletados aos pés de arbóreas do “grupo *Piptadenia*” (JOBSON; LUCKOW, 2007) e gêneros associados. Nesta abordagem, esses autores verificaram que espécies de *Paraburkholderia* eram os simbioses preferidos desses vegetais e que a diversidade de espécies era maior do que a encontrada em outros biomas brasileiros, como o Cerrado (BONTEMPS *et al.* 2010; dos REIS *et al.*, 2010) e a Caatinga (dos REIS *et al.* 2010). Duas novas espécies foram descritas após essa coleta, *P. symbiotica* e *P. diazotrophica* (SHEU *et al.*, 2012, 2013), demonstrando o quanto ainda pode ser explorado nesta região.

Sendo assim, é conveniente a realização de estudos mais aprofundados de *Paraburkholderia* nodulantes isoladas de solos brasileiros, a fim de se selecionar estirpes com potencial biotecnológico para futuras aplicações. Abordagens completas (fenotípicas, moleculares e filogenéticas) fornecem informações valiosas acerca dos microrganismos em estudo e permitem ao pesquisador inferir características sobre o ambiente e as pressões que esses procariontos sofrem com as mudanças ambientais.

4.7 FERRAMENTAS EMPREGADAS NA ANÁLISE POLIFÁSICA

4.7.1 16S RNAr e Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

O 16S RNAr é um dos genes mais utilizados em estudos taxonômicos devido à sua alta conservação e papel metabólico-chave, justificando a sua escolha como marcador filogenético universal de procariontes. Os principais motivos desta escolha estão pautados na ideia de que uma alta conservação nas sequências nucleicas do 16S RNAr permitiria avaliar as taxas evolutivas ocorridas entre os microrganismos com base nas alterações dessas sequências e, por integrar estruturas essenciais à síntese proteica (os ribossomos), tais sequências estariam presentes em todos os organismos em estudo, ou seja, um gene universal. Além disso, acreditava-se que eventos de transferência horizontal seriam raros nesses genes (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990; HARRIS *et al.*, 2003). Vandamme *et al.* (1996) comentam que sequências apresentando menos de 97% de similaridade com a espécie-tipo podem representar uma nova espécie, no entanto, a alta conservação do 16S RNAr pode resultar em porcentagens altas entre espécies diferentes, mas bastante relacionadas evolutivamente. Dessa forma, análises com

base unicamente no 16S RNAr não são precisas o suficiente para permitir o discernimento em nível de espécie. Além disso, eventos de transferência horizontal e recombinação genética, podem ocorrer e distorcer a análise, resultando em sequências mosaicas que dificultam a avaliação dos dados (VAN BERKUM *et al.*, 2003; GEVERS *et al.*, 2005; VINUESA *et al.*, 2005; MARTENS *et al.*, 2007).

Tendo em vista que os genes ribossomais fornecem dados limitados para inferir relações filogenéticas entre espécies de um mesmo gênero, outra metodologia vem sendo utilizada para definir com maior clareza a posição filogenética e as informações evolutivas entre microrganismos, a qual é denominada *Multilocus Sequence Analysis*, MLSA. Essa metodologia propõe uma análise conjunta de múltiplos genes (*loci*), relacionados com o metabolismo basal das bactérias (genes *housekeeping*) sendo, portanto, bastante conservados e presentes em quase todas as espécies de procariotos, porém, com taxas de divergência nas sequências mais rápidas que o 16S RNAr, permitindo a avaliação taxonômica e evolutiva entre os organismos em estudo, inclusive entre espécies bastante próximas (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; GEVERS *et al.*, 2005; MARTENS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009).

Uma vez que os genes são analisados conjuntamente (concatenados) os efeitos de recombinação genética ou transferência horizontal que também podem ocorrer nessas sequências seriam “tamponados” e não prejudicariam a análise final. No MLSA são utilizadas estirpes representativas de um gênero que são submetidas, juntamente com as bactérias em análise, a avaliações filogenéticas com base nas diferenças encontradas entre as sequências de seus genes *housekeeping*, os quais devem estar presentes em todos os microrganismos estudados. Os principais requisitos para a aplicação dessa metodologia é que os genes escolhidos estejam no genoma em uma única cópia, distribuídos em uma distância de, no mínimo, 100 kb, apresentem extensão nucleotídica suficiente para permitir o sequenciamento e contenham informações suficientes para análise (ZEIGLER, 2003; THOMPSON *et al.*, 2005). Além disso, devem apresentar dados correlacionados com o gene ribossomal 16S e com os percentuais de similaridade obtidos por hibridação DNA-DNA (GEVERS *et al.*, 2005; MARTENS *et al.*, 2007; MENNA *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009).

Aliando esses critérios à utilização de programas capazes de calcular a distância evolutiva entre as linhagens, o MLSA demonstra alto poder de resolução

na discriminação de estirpes em nível de espécie (ZEIGLER, 2003; GEVERS *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2009), o qual não seria atingido com análises pautadas somente no gene 16S RNAr. Dessa maneira, a metodologia de MLSA pode contribuir com pesquisas nas áreas médica, ambiental, industrial e agrônômica. Neste último, têm-se como exemplos os estudos de diversidade bacteriana, os quais refletem impactos no solo causados por manejo intensivo, poluição e outros distúrbios (ELLIOT; LYNCH, 1994; ZILLI *et al.*, 2003); as análises de microrganismos relacionados à qualidade do solo, com intuito de compreender os microambientes e, posteriormente, desenvolver sistemas de agrossilvicultura sustentável, ou recuperar áreas degradadas (THOMAS; KEVAN, 1993; LU *et al.*, 2012); e os estudos de identificação dos microrganismos benéficos à agricultura, para selecionar os de elevado potencial agrônômico e desenvolver inoculantes agrícolas cada vez mais eficientes aos solos brasileiros (DELAMUTA *et al.*, 2013; DALL'AGNOL *et al.*, 2013).

4.7.2 Técnicas de *fingerprinting* do DNA

Devido à alta taxa de conservação dos genes ribossomais e genes *housekeeping*, outros métodos moleculares relacionados à caracterização de estirpes também devem ser utilizados, a fim de diferenciar grupos de estirpes altamente relacionadas, como por exemplo, populações de bactérias pertencentes a uma mesma espécie.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, a caracterização de microrganismos ganhou maior confiabilidade e reprodutibilidade. O que antigamente era feito com base em caracteres resultantes de expressão gênica e, portanto, variáveis em resposta a mudanças ambientais e às condições de crescimento, passou a ser feito com base nas sequências do DNA.

Diversas técnicas foram desenvolvidas, aperfeiçoadas e muitas são empregadas atualmente (por exemplo, revisão de FAKRUDDIN *et al.*, 2013). As mais amplamente utilizadas estão fundamentadas na amplificação de determinadas regiões conservadas do DNA, ou na digestão do mesmo com enzimas de restrição. Os fragmentos resultantes são submetidos à eletroforese em gel de agarose, resultando em padrões únicos para cada estirpe, uma verdadeira “impressão digital” (*fingerprinting*) do microrganismo. Tais técnicas conferem um poder discriminatório muito maior do que aqueles obtidos por análises puramente fenotípicas

(FAKRUDDIN *et al.*, 2013).

Dentre as técnicas de *fingerprinting* do DNA bastante utilizadas na tipagem de BFNs estão análises por rep-PCR (*Repetitive sequence-based PCR*) e por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). No primeiro caso, o perfil de DNA é analisado após amplificação com *primers* específicos de elementos repetitivos e conservados do DNA, normalmente no espaço intergêncio, ou seja, em regiões não codificantes do genoma, e em ambas as orientações (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; de BRUIJN, 1992). Existem três principais famílias de rep-PCR, compreendendo as sequências REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) (STERN *et al.*, 1984), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) (HULTON *et al.*, 1991) e BOX (MARTIN *et al.*, 1992; KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995). Pelo fato destes elementos serem universais em eubactérias e estarem associados a elevados graus de polimorfismo, essas regiões gênicas provavelmente refletem os processos de adaptação evolutiva dos microrganismos (VAN BERKUM, 1999), sendo empregadas com frequência nos estudos de taxonomia.

No segundo caso, a caracterização intraespecífica das estirpes é feita através da análise do polimorfismo do DNA gerado pela digestão do mesmo com enzimas de restrição, que pode ser feita utilizando-se o DNA total (RFLP) ou uma parte dele (PCR-RFLP). Quando a técnica de PCR é empregada para, primeiramente, amplificar um determinado gene e posteriormente digeri-lo com endonucleases de restrição o poder discriminatório aumenta significativamente.

4.7.2.1 BOX-PCR

A utilização da metodologia de BOX-PCR é internacionalmente reconhecida pelo seu poder de discriminação, confiabilidade em diferenciar estirpes distintas e repetibilidade do método (HUNGRIA *et al.*, 2008). A amplificação dos elementos *box*, em especial a subunidade *boxA*, de 54 pb e aproximadamente 25 cópias no genoma, que representa a única subunidade altamente conservada entre bactérias (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995) é feita por um único *primer*, o BOX-A1R. A utilização de apenas um *primer* é possível porque as sequências desses elementos apresentam-se em orientações invertidas no genoma (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; VERSALOVIC *et al.*, 1994; RADEMAKER; LOUWS; de

BRUIJN, 1998).

4.7.2.2 Análise de polimorfismo por RFLP

A técnica consiste em aplicar enzimas de restrição para digerir o DNA cromossomal em locais precisos do genoma. Como estes locais variam entre diferentes isolados, os fragmentos gerados refletem diferentes perfis, utilizados para distinguir estirpes. No RFLP, esses fragmentos gerados após digestão são separados em gel de agarose e transferidos em membranas de nitrocelulose ou nylon por *Southern blotting* (SAMBROOK *et al.*, 1989), onde são, em seguida, hibridizados com sondas específicas e analisados. Neste caso, a escolha das enzimas de restrição deve ser feita cuidadosamente pois o DNA pode estar na sua forma metilada, protegendo os sítios da ação de endonucleases e, dessa forma, inibindo a restrição.

No RFLP-PCR (também chamado de ARDRA – *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), como diz o nome, utiliza-se a técnica de PCR aliada ao RFLP. Neste caso, utilizam-se *primers* específicos para amplificar determinados *loci* do genoma, como o espaço intergênico 16S-23S DNAr ou o DNA ribossomal 16S (16S RNAr), que são posteriormente digeridos e analisados em gel de agarose, sem que seja necessária a etapa de *blotting*, o que facilita e diminui o custo das análises. Além disso, as sequências analisadas são livres de metilações, aumentando as opções de escolha de endonucleases (FAKRUDDIN *et al.*, 2013).

Algumas das endonucleases mais utilizadas são Hpa II (5'-C/CGG-3'; 3'-GGC/C-5'), Rsa I (5'-GT/AC-3'; 3'-CA/TG-5') e Hae III (5'-GG/CC-3'; 3'-CC/GG-5'). A análise conjunta de diversos sítios polimórficos permite discriminar estirpes de forma substancial, tornando a técnica bastante apropriada para analisar padrões de diversidade intra e interespecífico.

4.7.3 Análise de Ácidos Graxos

Os perfis de ácidos graxos são utilizados para investigar a estrutura de comunidades microbianas, devido ao fato de certos grupos de microrganismos possuírem tipos específicos deste composto, funcionando, dessa forma, como bons biomarcadores taxonômicos. Um exemplo é o emprego da técnica no monitoramento

de populações microbianas que estão envolvidas em funções específicas, já que alguns grupos funcionais de microrganismos do solo possuem ácidos graxos bastante típicos. Outro exemplo é a comparação dos perfis obtidos de estirpes desconhecidas com aqueles obtidos de espécies conhecidas, enriquecendo as avaliações de identificação, classificação ou descrição de uma nova espécie (FERNANDES; CHAER, 2010).

Diversos protocolos de extração foram propostos na tentativa de se obter uma maior abrangência dos compostos recuperados nas amostras, envolvendo ou não etapas de fracionamento de lipídios totais e reações de liberação dos ácidos graxos das células microbianas. Todos, no entanto, possuem a etapa de cromatografia gasosa como ponto comum na análise da mistura de lipídios do extrato. Nesta etapa, os compostos são convertidos em formas voláteis, como ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, do inglês, *fatty acid methyl ester*) originados através de reações de metilação.

Alguns dos principais ácidos graxos utilizados como biomarcadores taxonômicos estão listados na Tabela 4. Os FAMEs são designados através do número total de átomos de carbono, seguido do número de insaturações, sendo a posição da dupla ligação indicada a partir do metil terminal da molécula (ω). A configuração da dupla ligação, cis ou trans, é indicada, respectivamente como “c” e “t”. Ácidos graxos ramificados são indicados como iso (i), se a ramificação metil está a um átomo de carbono do ω terminal, anteiso (a), se a ramificação está a dois átomos de carbono ou pela posição do grupamento metil a partir do terminal carboxílico da molécula. Ácidos graxos ciclopropílicos são identificados pelo número total de átomos de carbono acompanhado do prefixo “cy”.

Tabela 4 – Diferentes grupos microbianos e seus principais ácidos graxos utilizados como biomarcadores.

GRUPO MICROBIANO	BIOMARCADORES FAME	COMENTÁRIOS
Fungos	18:2 ω 6c	Apresenta boa correlação com o ergosterol, um outro biomarcador de fungos; também abundantes como reserva na fração de lipídios neutros de eucariotos.
Bactérias Gram +	15:0i; 15:0a; 16:0i; 17:0i; 17:0a	
Bactérias Gram -	18:1 ω 7c; 17:0cy; 19:0cy	
Actinobactérias	10-Me 16:0; 10-Me 17:0; 10-Me 18:0	
Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)	16:1 ω 5c	Também abundantes em algumas bactérias do grupo Cytophaga / Flexibacter. O uso deste ácido graxo como marcador de FMA é mais apropriado quando este é derivado da fração neutra (lipídios neutros), a qual ocorre exclusivamente em esporos e vesículas destes fungos
Microeucariotos	20:4 ω 6c	Muitas vezes utilizado como marcador para protozoários, mas também ocorre em nematóides, fungos e algas.

Fonte: Fernandes e Chaer (2010).

Um método de extração bastante utilizado atualmente é pelo procedimento comercial MIDI® (MIDI-FA), protocolo originalmente proposto para a extração total de ácidos graxos e compostos correlatos (alquenos, cadeias de fitanil e de amino diidroxialcanos) de culturas puras visando a identificação taxonômica de isolados microbianos, que é obtida através da comparação entre o perfil cromatográfico do isolado em questão e uma biblioteca de perfis de ácidos graxos de microrganismos conhecidos (SASSER, 1990). Uma vantagem do método MIDI-FA é a possibilidade de uso de *kits* de reagentes prontos, diminuindo o tempo de obtenção dos compostos e facilitando o procedimento. Ainda, os sistemas de identificação de picos cromatográficos e as bibliotecas de perfis de ácidos graxos requeridos para a identificação de culturas puras também são comercializados pela Microbial Identification Inc. (Newark, Delaware, EUA).

A análise é composta por quatro etapas: saponificação, metilação, recuperação dos compostos metilados e uma lavagem da fase orgânica. Primeiramente o material é tratado com NaOH aquecida a 100°C em uma solução de água e metanol a volumes iguais. Nesta fase ocorre a lise das células e os ácidos graxos são separados dos lipídios celulares e convertidos em sais de sódio (sabão). A etapa seguinte consiste na metilação, na qual uma mistura de ácidos fortes e

metanol são adicionados ao conteúdo dos frascos e incubação a 85 °C. Este passo é executado com o objetivo de aumentar a volatilidade dos compostos formados na saponificação e adequá-los à análise cromatográfica. A recuperação dos FAMES produzidos é obtida adicionando-se hexano, de modo a separar as amostras em duas fases, uma orgânica, onde estão contidos os FAMES, e outra aquosa-alcoólica, repleta de compostos mais polares. Por último, a fase orgânica é aspirada, transferida para novos tubos e tratado com solução alcalina fraca, que lava os resíduos ácidos. Após uma nova aspiração da fase orgânica as amostras são, enfim, analisadas por cromatografia gasosa.

Além da utilização deste método na taxonomia bacteriana, a avaliação de ácidos graxos também é realizada nos estudos de estrutura da comunidade microbiana, para investigar as respostas da mesma a diversos fatores como uso do solo (WALDROP; BALSER, 2000; CHAER; FERNANDES, 2009a), sistemas de cultivo (ESPERSCHÜTZ; GATTINGER, 2007), preparo do solo (CHAER; FERNANDES, 2009b), adição de resíduos orgânicos (WATTS, 2010), xenobióticos (ZHANG; XU, 2010), dentre outros; para inferir a biomassa microbiana (desde que a recuperação dos ácidos graxos seja quantitativa); e para avaliar situações de estresse microbiano, uma vez que alguns ácidos graxos são alterados sob condições adversas (GUCKERT; HOOD., 1986; KIEFT; WHITE, 1994; PIETIKÄINEN; HIUKKA, 2000).

4.7.4 Hibridação DNA-DNA (HDD)

A hibridação DNA-DNA (HDD) consiste na avaliação de similaridade entre o genoma de duas espécies por meio do pareamento entre as duas moléculas de DNA, formando híbridos sob condições padronizadas. Essas condições incluem altas temperaturas para promover a desnaturação da dupla-hélice do DNA e posterior diminuição da mesma, para permitir a reassociação das fitas. O pareamento entre a molécula de uma espécie conhecida com a espécie que se deseja classificar será maior quanto maior forem as similaridades entre as duas sequências, formando um DNA híbrido.

A similaridade é medida pela porcentagem de associação das fitas e pela diferença na temperatura de *melting* (T_m), a temperatura necessária para dissociar o

DNA. Fitas híbridas pouco similares não apresentam pareamentos fortes, e uma temperatura baixa é capaz de dissociá-la, em comparação com o pareamento da molécula original. Assim, somente se a estirpe desconhecida apresentar 70% ou mais de similaridade com a estirpe-tipo e 5°C ou menos nos valores de ΔT_m , ela pode representar um indivíduo da mesma espécie que a estirpe-tipo utilizada como padrão (VANDAMME *et al.*, 1996; GEVERS *et al.*, 2005).

A HDD foi amplamente utilizada, e inclusive requisitada, quando se desejava descrever uma nova espécie. No entanto, essa técnica apresenta variações nos valores quando reproduzida em diferentes laboratórios (VANDAMME *et al.*, 1996; GEVERS *et al.*, 2005) e constitui um procedimento custoso e laborioso, dificultando análises de um grande número de estirpes. Além disso, não existe um banco de dados que permita a deposição da informação de pesquisas realizadas em diferentes laboratórios, impedindo a busca e a comparação das informações (RAMOS *et al.*, 2011). Devido a estas desvantagens, a HDD vem sendo substituída pelo sequenciamento do genoma e pela comparação da média das identidades nucleotídicas (ANI) das estirpes em estudo. A ANI é obtida através de programas específicos, que calculam a porcentagem média de similaridade nas sequências de DNA dos genomas totais entre duas estirpes. Tais técnicas estão descritas com mais detalhes no item 4.7.5.

4.7.5 Sequenciamento do genoma e determinação do *Average Nucleotide Identity* (ANI)

O sequenciamento do genoma é a técnica mais sensível e propícia para distinguir duas espécies altamente relacionadas de forma inequívoca. Atualmente, há equipamentos cada vez mais elaborados, capazes de sequenciar genomas extensos com precisão, aliados a programas de bioinformática que permitem montar essas sequências de maneira rápida e eficaz.

Uma das plataformas mais adequadas para o sequenciamento de genomas de procariotos dentre os sequenciadores de última geração é o MiSeq da Illumina, por permitir o sequenciamento de pequenos genomas com custo acessível e excelente qualidade, além de realizar outras aplicações de interesse (sequenciamento do DNA, RNA mensageiros, microRNAs, metagenômica, entre outros). Outras plataformas conhecidas incluem a 454 FLX da Roche, a SOLiD

System da Applied Biosystems, HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing (tSMS) da Helicos e Ion Torrent, da LifeTechnologies (GLENN, 2011).

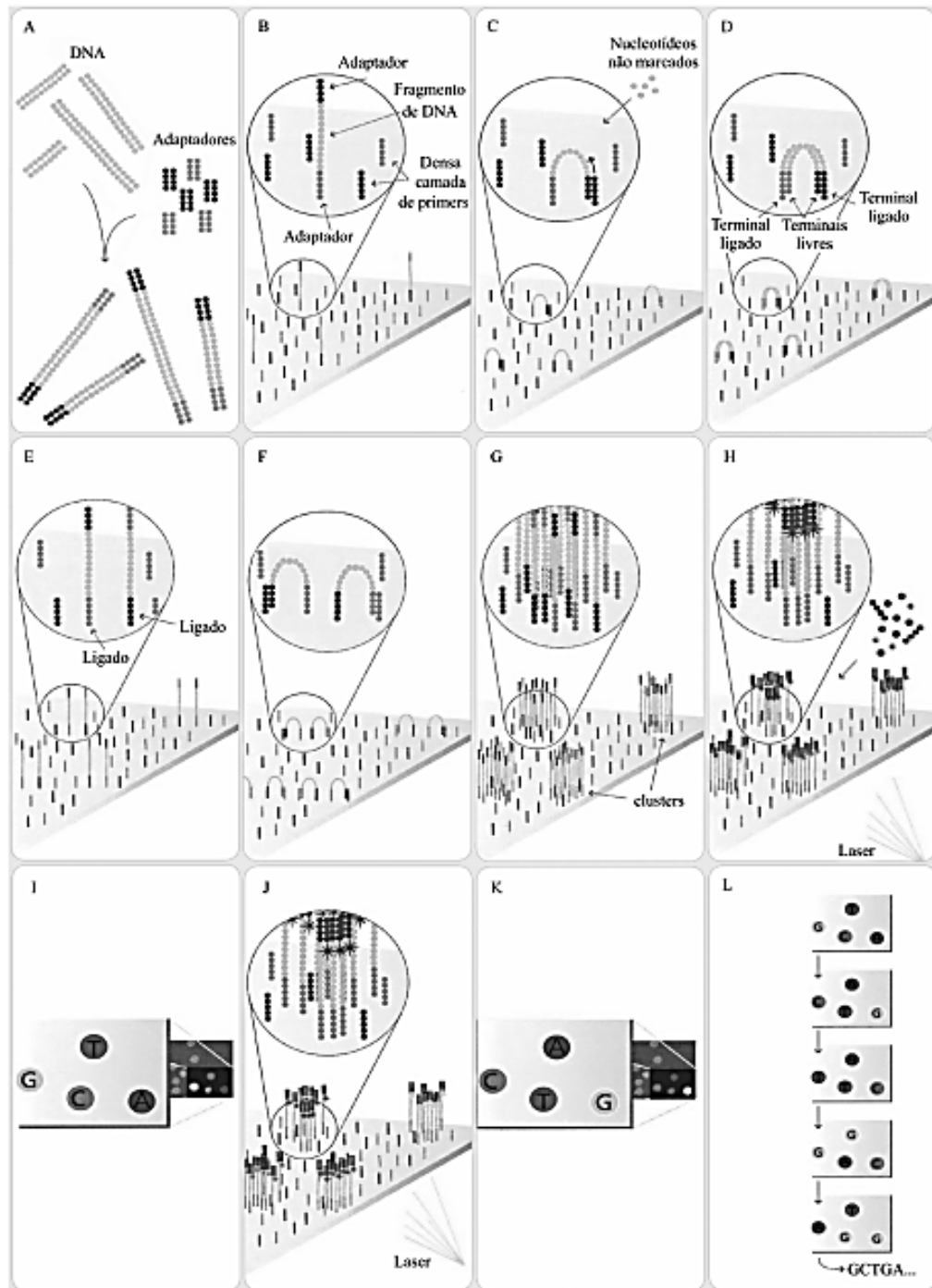
O procedimento consiste, basicamente, em quatro etapas. Primeiro, deve-se extrair o DNA total do microrganismo em estudo e preparar as bibliotecas genômicas, onde o DNA é fragmentado e adaptadores são ligados aos terminais coesivos. Depois, aplica-se esse DNA fragmentado no sequenciador Illumina MiSeq e as sequências são lidas, corrigidas e “filtradas” de acordo com a qualidade. Em seguida, os *contigs* são verificados por meio de um mapeamento dos fragmentos (*reads*) e sobrepostos, de maneira que *contigs* maiores em extensão e menores em número são formados (COIL; JOSPIN; DARLING, 2015). A partir de então, o genoma pode ser montado e analisado por softwares específicos. Nucleotídeos terminadores marcados com fluoróforos e DNA polimerase são utilizados, tal como no sequenciamento Sanger. A inovação da técnica está relacionada à clonagem *in vitro* dos fragmentos de DNA em uma plataforma sólida de vidro, processo também chamado de PCR de fase sólida (FEDURCO *et al.*, 2006; TURCATTI *et al.*, 2008). A superfície onde ocorre a clonagem é dividida em linhas, com capacidade de sequenciamento de até oito bibliotecas.

Uma abordagem mais detalhada está representada na Figura 7: depois de fragmentado, o DNA fita simples presente em cada linha liga-se a adaptadores em ambas as extremidades, e é fixado ao suporte por meio de seus terminais 5'. Os terminais 3' permanecem livres para servir de iniciadores nos ciclos de PCR. No primeiro ciclo de amplificação, ocorre a síntese da segunda fita do DNA com nucleotídeos não marcados. Devido à alta densidade de adaptadores no suporte, a ligação dos adaptadores das extremidades livres ao seu oligonucleotídeo complementar é facilitada, resultando em uma estrutura em ponte que é fixada perto do clone inicial. A extensão ocorre normalmente, seguindo a forma em ponte da fita. Ao atingir a etapa de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Os ciclos se repetem tal como em uma PCR habitual, gerando diversas cópias de cada fragmento, desta vez com a incorporação de nucleotídeos marcados com fluoróforos. Os clones gerados permanecem próximos uns dos outros, gerando *clusters* de sequenciamento, que são lidos sequencialmente pelo sinal de fluorescência emitido. Uma representação satisfatória da biblioteca corresponde a cerca de 50 milhões de clusters (SHENDURE; JI, 2008; CARVALHO; SILVA, 2010).

Com o genoma desvendado, as possibilidades de análise são inúmeras e

permitem aos microbiologistas investigar com mais afinco questões ligadas à evolução e adaptação dos microrganismos na natureza, bem como funções específicas desempenhada pelos mesmos.

Figura 7 – Etapas do sequenciamento pela plataforma Illumina.



A) Fragmentação aleatória do DNA e ligação dos adaptadores às extremidades. **B)** Adesão do DNA fita-simples ao suporte sólido contendo oligonucleotídeos complementares aos adaptadores. **C)** Anelamento do adaptador ao seu complementar no suporte, com consequente formação de uma estrutura em ponte (primeiro ciclo da PCR). **C e D)** A extremidade 3' livre do oligonucleotídeo é utilizada como primer nos ciclos subsequentes. **E)** Desnaturação, com consequente rompimento da ponte. **F)** Repetição da etapa de anelamento, com formação de novas pontes seguido de novo ciclo de amplificação. **G)** Repetição de ciclos de amplificação, resultando em diversos clusters de moléculas idênticas, que permanecem ligadas ao suporte. **H, J, K, L)** Incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser, gerando um sinal que é captado e lido e montado de forma sequencial, permitindo a montagem da sequência completa de cada cluster.

Através do sequenciamento total do genoma bacteriano pode-se também obter a ANI (*Average Nucleotide Identity*), a qual consiste na comparação entre estirpes através do sequenciamento de seus genomas e alinhamento em programas específicos de bioinformática, de forma a avaliar a porcentagem de similaridade nucleotídica entre as mesmas. Essa metodologia vem sendo utilizada em substituição à HDD, promovendo resultados mais confiáveis e passíveis de serem comparados e reproduzidos com maior precisão e estabilidade. O valor de referência considerado equivalente à hibridação (70% similaridade; $\Delta Tm < 5$ °C) é de 96% (KONSTANTINIDIS *et al.*, 2006).

A grande vantagem da utilização da ANI se dá, especialmente, na possibilidade de armazenar as sequências em bancos de dados, sem necessidade de novo sequenciamento para análises futuras. Assim, os custos empregados são bastante reduzidos, visto que os pesquisadores que desejam comparar estirpes de seus estudos com estirpes de referência necessitam apenas realizar o sequenciamento daquelas bactérias que ainda não possuem genoma depositado no banco de dados.

4.8 DESCRIÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES BACTERIANAS

Uma espécie bacteriana somente pode ser considerada nova se a descrição estiver de acordo com as regras estabelecidas pelo Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos (ICSP), que avalia os testes executados a fim de verificar a coerência dos mesmos na publicação de um novo táxon (ICSP, 1992). O delineamento da nova espécie inclui uma lista de características e métodos que provem a distinção entre o microrganismo em questão e as espécies relacionadas que já foram descritas, demonstrando conexão de dados genotípicos, fenotípicos e filogenéticos em meio aos exemplares, ou seja, uma sólida análise polifásica. Além disso, antes de divulgar o novo microrganismo a Comissão Judicial pode exigir, em intervalos regulares, a reavaliação dos testes recomendados (STACKEBRANDT *et al.*, 2002).

Se aceita, a nova espécie deverá ser publicada no *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) ou outras revistas microbiológicas relacionadas, como a *Systematic and Applied Microbiology* (SAM).

Os padrões mínimos exigidos pelo ICSP (1992) na descrição de uma nova

espécie bacteriana estão listados abaixo:

- Uma estirpe tipo (“type strain”) deve ser nomeada entre os exemplares, sendo que a mesma deve estar depositada em pelo menos duas coleções de culturas de países diferentes;
- Os exemplares devem ser completamente avaliados por abordagem polifásica, ou seja, devem ser estudados segundo suas características fenotípicas, genéticas e filogenéticas;
- São recomendados, no mínimo, três exemplares para a descrição de uma nova espécie, e os mesmos devem ser igualmente estudados de modo a revelar a diversidade intra-específica. No entanto, em casos excepcionais, pode-se realizar a descrição de uma única estirpe, desde que a mesma apresente alta relevância para a sociedade (ambiental, industrial, médica, etc) e nenhum outro exemplar tenha sido encontrado. Além disso, devem-se realizar trabalhos taxonômicos completos e exaustivos para balancear a falta de outras estirpes na descrição.
- Estudos genéticos devem incluir análises de “fingerprinting” (BOX, ERIC, RAPD);
- O gene ribossomal 16S deve ser ao menos parcialmente sequenciado e os dados devem ser depositados em bancos de dados mundiais como DDBJ, EMBL e GenBank, disponibilizando o número de acesso para a consulta.
- Uma análise Multilocus deve ser realizada (MLSA) e as sequências dos genes *housekeeping* devem ser igualmente depositadas e disponibilizadas através do número de acesso. São necessários, no mínimo, três genes *housekeeping* na análise concatenada;
- Análises fenotípicas devem incluir morfologia de colônia, resistência a antibióticos, utilização de diferentes fontes de carbono, crescimento em diferentes meios de cultura, entre outros;
- Marcadores quimiotaxonômicos dos exemplares devem ser obtidos e comparados com as demais espécies relacionadas, a exemplo de perfis de ácidos graxos, composição de lipídios polares, quinonas e padrões de poliaminas;
- O conteúdo G+C da nova espécie deve ser definido e o valor dado em porcentagem,
- A ANI deve ser realizada entre a estirpe-tipo e outras estirpes do gênero mais próximas,
- Todos os valores de referência devem ser obedecidos: 97% de similaridade para o gene 16S RNAr; 94% de identidade nucleotídica para os genes *housekeeping*

individuais e 96% na análise concatenada; 70% nos perfis de BOX-PCR; 95-96% na ANI, entre outros valores estabelecidos de acordo com o método.

4.9 RELEVÂNCIA DA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR EM ESTUDOS ENVOLVENDO RIZÓBIOS

Tendo em vista os benefícios que os rizóbios apresentam para o meio ambiente e as inúmeras vantagens que se pode adquirir quando empregamos tais microrganismos como inoculantes agrícolas, os trabalhos que aprofundem nosso conhecimento em relação ao papel ecológico e potencial biotecnológico dos rizóbios é de suma importância. Dentre as ferramentas utilizadas para aprimorar tais estudos, as diversas técnicas moleculares apresentadas anteriormente neste trabalho, aliada com programas de bioinformática cada vez mais precisos e velozes, representam um dos instrumentos mais eficientes. Isso porque a caracterização em nível molecular, especialmente utilizando o material genético, o qual é único para cada microrganismo, permite identificar as características próprias daquele gênero ou espécie e, assim, além de identificá-lo corretamente, ajuda a compreender como ele desempenha seu papel no ecossistema em que está inserido.

Para exemplificar, pode-se citar, alguns trabalhos recentes que utilizaram essas técnicas nos estudos com rizóbios, como Helena *et al.* (2015), Ribeiro *et al.* (2015) e Roman-Ponce *et al.* (2016), os quais executaram análises polifásicas (morfologia, fisiologia e *fingerprinting* do DNA) e sequenciamento do genoma para descrever novas espécies de rizóbios, Laranjo, Alexandre e Oliveira (2014), que além de filogenia, realizaram testes qualitativos para verificar a eficiência das estirpes na nodulação e fixação de N; Bournaud *et al.* (2013), Díaz-Alcantara *et al.* (2014) e Bontemps *et al.* (2016), que realizaram análises filogenéticas com diferentes marcadores taxonômicos e marcador simbiótico para avaliar a diversidade de rizóbios. Estas análises estendem-se para outros estudos com bactérias diazotróficas (endofíticas e associativas, CRISTINA; CHRISTAPHER; SUBHASH, 2013; ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2016), bem como microrganismos de importância médica (KRIEGER; THUMBIKAT, 2016; KHADEMI *et al.*, 2016; RASMUSSEN *et al.*, 2016) e industrial (CHAUDHURI *et al.*, 2016; FIDALGO *et al.*, 2016; MASOMIAN *et al.*, 2016).

Sendo assim, o emprego da caracterização molecular e filogenética têm apresentado resultados bastante interessantes e promissores nos estudos com

microrganismos em geral, e é, por esse motivo, cada vez mais requisitado quando se deseja avaliar a diversidade microbiana de um determinado ecossistema, que pode variar desde uma pequena área (pequenas lavouras, fragmentos florestais, lagos, entre outros) até grandes dimensões (grandes reservas ecológicas ou áreas degradadas, rios de grandes extensões, biomas, entre outros).

Os microrganismos habitam os mais diversos os ambientes, relacionando-se com o homem direta ou indiretamente. Já apresentamos nesta revisão a importância ecológica e os benefícios econômicos que os rizóbios trazem para nosso país, afetando a qualidade do solo, tanto de áreas nativas como áreas de agronomia intensa. Dessa forma, é imprescindível realizar levantamentos da diversidade de rizóbios em áreas de interesse, permitindo o aperfeiçoamento do nosso conhecimento em relação aos mesmos e possibilitando futuros aproveitamentos no meio ambiente, na agricultura e na indústria.

5. REFERÊNCIAS

- ABRAMOVAY, R. Moratória para os cerrados- Elementos para uma estratégia de agricultura sustentável. Consórcio Atech/Museu Emílio Goeldi - **Agenda 21**, São Paulo, 1999.
- ALAVI, P. *et al.* *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. **BMC Genomics**, v.15, p. 482, 2014.
- ALFAIA, S. S. Caracterização e distribuição das formas do nitrogênio orgânico em três solos da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 2, p. 135-140, 2006.
- ANGUS, A. A. *et al.* Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratiro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors, **Plant and Soil**, v. 369, n.1, 2013.
- ANGUS, A. A. *et al.* Plant-associated symbiotic *Burkholderia* species lack hallmark strategies required in mammalian pathogenesis. **PloS One**; v. 9, e83779, 2014.
- ANÔNIMO. **Aspectos do cerrado**. Disponível em <http://ecologia.ib.usp.br/cerrado/aspectos_clima.htm> Acesso em: 6 Fev 2014.
- ARDLEY, J. K. *et al.* *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2579-2588, 2012.
- AZEGAMI, K. *et al.* *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 144–152, 1987.
- BAUER A. W., KIRBY, E. M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BAUTISTA, V. V.; MONSALUD, R. G.; YOKOTA, A. *Devosia yakushimensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. **International Society for Microbial Ecology**, v. 60, p. 627-632, 2010.
- BECKER, J. M. *et al.* Bacterial activity, community structure, and centimeter-scale spatial heterogeneity in contaminated soil. **Microbiology Ecology**, v. 51, p. 220–231, 2006.
- BELL, T. Experimental tests of the bacterial distance-decay relationship. **International Society for Microbial Ecology**, v. 4, p. 1357–1365, 2010.
- BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, p. 1–13, 2009.

BONTEMPS, C. *et al.* *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes, **Molecular Ecology**, n. 9, p. 44-52, 2010.

BONTEMPS, C. *et al.* Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **New Phytologist**, v. 209, n. 1, p. 319–333, 2016.

BOURNAUD, C. *et al.* *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the *Piptadenia* group (tribe mimoseae), **Plos One**, v. 8, n. 5, 2013.

BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. **CANOCO Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows: Software for Canonical Community Ordination (version 4)**. Microcomputer Power, Ithaca, New York, 1998, 352 pp.

BRETT, P. J.; DESHAZER, D.; WOODS, D. E. Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei* -like strains. **Epidemiology and Infection**, v.118, p.137–148, 1997.

BRILL, W. J. Nitrogen fixation: basic to applied. **American Scientist**, v. 67, p. 458-466, 1979.

BROUGHTON, W. J. *et al.* Flavonoid- inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3654-3663, 2006.

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

BUCHANAN, R. E. In: SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. (ed.). Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, p. 225-420, 1980. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK814/toc/?report=reader>>. Acesso em: 23 out 2015.

CABALLERO-MELLADO, J. *et al.* *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. **Internatinal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CARDOSO, J. D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 2035–2049, 2011.

CARVALHO, M. C. C. G.; DA SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p.735–744, 2010.

CASSMAN, K. G. Agriculture's contribution to the reactive nitrogen load. In: **IFA - 71st Annual Conference**. Philadelphia: IFA, 2003. Disponível em

<<http://www.fertilizer.org/HomePage/LIBRARY/Publication-database.html/Agriculture-s-Contribution-to-the-Reactive-Nitrogen-Load.html>>. Acesso em: 17 jun 2013.

CASTRO, M. C. Fatores econômicos e desmatamento do Cerrado Goiano. **Conjuntura Econômica Goiana**, n. 23, 2012.

CASTRO-NEVES, B., M. **Efeito das queimadas em áreas do cerrado strictu senso e na biomassa de raízes finas**. 2007. Tese (Doutorado em Ecologia). Universidade de Brasília, Brasília.

CHAER, G. M. *et al.* Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 414-424, 2009a.

CHAER, G. M. *et al.* Shifts in microbial community composition and physiological profiles across a gradient of induced soil degradation. **Soil Science Society of America Journal**, v. 73, n. 4, p. 1327-1334, 2009b.

CHAUDHURI, B. *et al.* Phylogenetic characterization of BKH3 bacterium isolated from a hot spring consortium of Bakreshwar (India) and its application. **Advances in Microbiology**, v. 6, p. 453-461, 2016.

CHEN, W. M. *et al.* *Ralstonia taiwanensis* sp nov isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1729–1735, 2001.

CHEN, W. M. *et al.* *Burkholderia nodosa* sp nov isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1055–1059, 2007.

CHEN, W. M. *et al.* *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2174-2179, 2008.

CHEN, W.M. *et al.* *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1847-1851, 2006.

CHEN, Y. *et al.* Characterization and analysis of the *Burkholderia pseudomallei* BsaN virulence regulon. **BMC Microbiology**, v.14, p. 206, 2014.

CHENG, A. C.; CURRIE, B. J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p. 383-416, 2005.

CHRISTINA, A.; CHRISTAPHER, V.; BHOORE, S. J. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. **Pharmacognosy Reviews**, v. 7, n. 13, p. 11–6, 2013.

CHUEIRE, L. M. O. *et al.* 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.

CI-BRASIL, **Conservação Internacional**. Disponível em: <www.conservacao.org>. Acesso em: 17 jan 2014.

COENYE, T. *et al.* *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 623-627, 2004.

COENYE, T. *et al.* Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3427-3436, 2001.

COENYE, T. O. M. *et al.* Minireview: Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3427–3436, 2001.

COIL, D., JOSPIN, G., DARLING, A. E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 4, p. 587–589, 2015.

CONN, K. L., NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant growth-promoting rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 801-808, 1997.

COSTA, R. A.; SANTOS, F. Expansão agrícola e vulnerabilidade natural do meio físico no sul goiano. **Geografia em Atos**, v.2, p. 23–35, 2011.

COSTA, R. C. L. **Metabolismo e fixação biológica do nitrogênio**. Disponível em <<http://dc301.4shared.com/doc/MbLqsMtG/preview.html>>. Acesso em: 22 jun 2013.

DA SILVA, K. *et al.* *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 175–182. 2012.

DALL'AGNOL, R. F. *et al.* *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, p. 4167–4173, 2013.

DE LAJUDIE, P. *et al.* *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, p.1277-1290, 1998.

DE MEYER, S. E. *et al.* *Burkholderia rhynchosiae* sp. nov., isolated from *Rhynchosia ferulifolia* root nodules. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3944-3949, 2013.

DE MEYER, S. E. *et al.* *Burkholderia dilworthii* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1090-1095, 2014.

DEAN, W. With **Broadax and Firebrand: The Destruction of the Brazilian Atlantic Forest**. University of California Press, Berkeley. 1995.

DELAMUTA, J. R. K. *et al.* Multilocus Sequence Analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium*

strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 698-710, 2012.

DELAMUTA, J. R. K. *et al.* Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3342–3351, 2013.

DÍAZ-ALCÁNTARA, C. A. *et al.* Analysis of rhizobial strains nodulating *Phaseolus vulgaris* from Hispaniola Island, a geographic bridge between Meso and South America and the first historical link with Europe. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 149–156.

DODD, J. C. *et al.* Mansur, I. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. **Plant Soil**, v. 226, p. 131–151. 2000.

DONNELLY, P. K. *et al.* Cellulose and lignin degradation in forest soils: response to moisture, temperature, and acidity. **Microbiology Ecology**, v. 20, n. 1, p. 289–295, 1990.

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

EBERL, L.; VANDAMME, P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. **F1000Research**, 1007, 2016 (in press). DOI:10.12688/f1000research.8221.1.

EISENLOHR, P. V.; 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.

EITEN, G. Delimitação do conceito de Cerrado. **Arquivos do Jardim Botânico**, Rio de Janeiro v. 21, p. 125-134, 1977.

ELLIOT, L. F.; LYNCH, J. M., Biodiversity and soil resilience. In: GREENLAND, D. J., SZABOLES, I. (Eds.). **Soil resilience and sustainable land use**. Wallingford: CAB International, 1994. pp. 353-364.

ELLIOTT, G. N. *et al.* *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 762-778, 2009.

ELLIOTT, G. N. *et al.* Nodulation of *Cyclopia* spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. **Annals of Botany**, v. 100, n. 7, p. 1403–11, 2007.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Levantamento de Reconhecimento dos Solos do Estado do Paraná. In: OLMOS, J. *et al.* EMBRAPA—SNLCS. **Boletim Técnico**, 57. Curitiba, EMBRAPA—SNLCSJSUDESUL/IAPAR, 1984.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. In: SANTOS, H. G. 3 ed. rev. ampl: Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353 p.

- ESPERSCHÜTZ, J. *et al.* Response of soil microbial biomass and microbial structures under conventional and organic farming systems under identical crop rotations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 61, p. 26-37, 2007.
- ESTEVAM, R. **Folha do Cerrado** - Produção de grãos pode ultrapassar 196 milhões de t. Disponível em <<http://folhadocerrado.net/noticia/producao-de-graos-pode-ultrapassar-196-milhoes-de-t>>. Acesso em: 11 fev 2014.
- ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *et al.* *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2790-2798, 2001.
- ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *et al.* Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by Multilocus Sequence Analysis, **Current Microbiology**, v. 67, p. 51-60, 2013.
- ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., *et al.* To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1303–1314.
- EWING, B. *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.
- FAKRUDDIN, M. *et al.* Identification and characterization of microorganisms: DNA-fingerprinting methods. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, v. 35 n. 4, p. 397–404, 2013.
- FARRAND, S. K.; VAN BERKUM, P. B.; OGER, P. *Agrobacterium* is a definable member of the family *Rhizobiaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 53, p. 1681–1687, 2003.
- FEDURCO, M. *et al.* BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n.3, 2006.
- FEUJE, F., ANGER, V. Spot tests in inorganic analyses. **Analytical Chemistry Acta**, v. 149, p. 363 – 367, 1972.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the *bootstrap*. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach, **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, p. 368-376, 1981.
- FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M. **Análise de perfis de ácidos graxos como ferramenta para estudos em microbiologia do solo**. 2010. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros (Documentos, 163).
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 911-920, 2003.

FERREIRA, P. A. A. *et al.* Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1947-1959, 2012.

FIDALGO, C. *et al.* Culturable endophytic bacteria from the salt marsh plant *Halimione portulacoides*: phylogenetic diversity, functional characterization, and influence of metal(loid) contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 10200–10214. 2016.

FIERER, N. *et al.* Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. **International Society for Microbial Ecology**, v. 6, p. 1007–1017, 2012.

FRANKLIN, R. B.; MILLS, A. L. Importance of spatially structured environmental heterogeneity in controlling microbial community composition at small spatial scales in an agricultural field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1833–1840, 2009.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin Press, 1932. 343 p.

FREIBERG, C. *et al.* Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v. 387, n. 6631, p. 394–401, 1997.

FUNDAÇÃO AGRISUS. **Cerrado é exemplo de transformação na produção agrícola tropical**. Disponível em:

<<http://www.agrisus.org.br/imprime.asp?tb=noticias&cod=155>>. Acesso em: 27 out 2015.

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.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Atlantic Forest hotspots status: an overview. In: _____. **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Center for Applied Biodiversity Science and Island Press, Washington, D.C. 2003. 73 p.

GARRITY G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. *Alphaproteobacteria* class. nov. In Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List no. 107. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1 – 6, 2006.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. Class II. *Betaproteobacteria* class. nov. In: BRENNER, D. J. *et al.* (editors), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed., v. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005a, p. 575.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. Family IX. *Methylobacteriaceae* fam. nov. In: D.J. BRENNER *et al.* (editors). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005b, p. 567.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G. M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed., v. 1, The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. New York: The Williams & Wilkins, Springer-Verlag, 2001. pp. 119-154.

GAUNT, M. W. *et al.* Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA based classification of rhizobia. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 51, p. 2037–2048, 2001.

GEOCERRADO. **Solos do cerrado**. Disponível em: <<http://geocerrado.wordpress.com/2011/11/15/solos-do-cerrado/>>. Acesso em: 21 fev 2014.

GERMANO, M.G. *et al.* RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of Bradyrhizobial strains from thirty-three legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 217-229, 2006.

GEVERS, D. *et al.* Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 733-739, 2005.

GILLIS, M. *et al.* Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal Systematic of Bacteriology**, v. 45, p. 274-289, 1995.

GIRVAN, M. S. *et al.* Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2692–2701, 2004.

GLENN, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Resources**, v.11, n.5, p.759–769, 2011.

GOEDERT, W. J. (ed.) **Solos dos Cerrados: tecnologias e estratégias de manejo**. Planaltina, EMBRAPA, CPAC, 1987. 442p.

GONOD, L. V; CHADOEUF, J.; CHENU, C. Spatial distribution of microbial 2,4-dichlorophenoxy acetic acid mineralization from field to microhabitat scales. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, p. 64–71, 2006.

GONOD, L. V; CHENU, C.; SOULAS, G. Spatial variability of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) mineralization potential at a millimetre scale in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 373–382, 2003.

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

GOVAN, J. R. W.; VANDAMME, P. Agricultural and medical microbiology: a time for bridging gaps. **Microbiology**, v. 144, p. 2373–2375, 1998.

GRUNDMANN, G. L. Spatial scales of soil bacterial diversity—the size of a clone. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, p.119–127, 2004..

GUCKERT, J. B.; HOOD, M. A.; WHITE, D.C. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. **Applied and Environmental Microbiology, Washington**, v. 52, p. 794-801, 1986.

GYANESHWAR, P. *et al.* Legume-nodulating Betaproteobacteria : diversity, host range and future prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 11, p. 1276-1288, 2011.

HARIDASAN, M. **Competição por nutrientes em espécies arbóreas do cerrado**. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C., FELFILI, J. M. (Orgs.). Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2005. p.167-178.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 3, p. 183-195, 2008.

HARRIS, J. K. *et al.* The genetic core of the universal ancestor. **Genome Research**, v. 13, p. 407-412, 2003.

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

HELENE, L. C. F. *et al.* *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 4441–4448, 2015.

HILL, G. T. *et al.* Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 25–36, 2000.

HOBSON, R.; GOULD, I.; GOVAN, J. *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* as a cause of brain abscesses secondary to chronic suppurative otitis media. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, p. 908–911, 1995.

HU, S.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Microbial dynamics associated with multiphasic decomposition of ¹⁴C-labeled cellulose in soil. **Microbiology Ecology**, v. 33, n. 2, p. 134–143, 1997.

HUGHES, J. B. *et al.* Minireview - Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4399–4406, 2001.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 825-834, 1991.

HUNGRIA, M. *et al.* **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. *et al.* Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.) **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. pp. 9-89.

HUNGRIA, M. *et al.* Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Inoculantes microbianos: situação no Brasil. In: BIOFAG, org. **Uso y perspectivas de los biofertilizantes en iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial**. Montevideo: BIOFAG, 2007. p.1-16.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, p. 88-93, 2003.

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

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

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

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors impacting N₂ fixation in legumes grown in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; MENDES, I.C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F. (Ed.) **Biological nitrogen fixation**. Chapter 99. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. v.2. p.1005-1019.

IBGE. **Geografia do Brasil**. Região Centro-Oeste. Rio de Janeiro: IBGE, v. 1, 1989, 267 p.

ICSP. Statutes of the International Committee on Systematic Bacteriology of the International Union of Microbiological Societies. Article 9, Organization and Functions of Subcommittees on Taxonomy. In: LAPAGE, S. P. *et al.* International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). **American Society for Microbiology**, p. 152-155, 1992. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-minimalstandards.html>>. Acesso em: 12 jan 2014.

IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/>>. Acesso em: 30 ago 2016.

JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist**, v. 11, p.

37–50, 1912.

JANOS, D. P. **Mycorrhizas, succession and rehabilitation of deforested lands in the humid tropics**. In: FRANKLAND, J. C.; GADD, G. M., (Ed). Fungi and environmental change. Cambridge, Univ. Press, 1996. p.1-18. (British Mycological Society Symposium, 20).

JOBSON, R. W.; LUCKOW, M. Phylogenetic Study of the Genus *Piptadenia* (Mimosoideae: Leguminosae) using Plastid trnL-F and trnK/matK Sequence Data. **Systematic Botany**, v. 32, p. 569–575, 2007.

JONES, K. M. *et al.* How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. **Nature Reviews**, v. 5, p. 619, 2007.

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Williams & Wilkins, Baltimore, 1984. pp. 235-244.

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

JORDAN, D. C.; ALLEN, N. O. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In: BUCHNAN, R.E.; GIBBONS, N.E. (Eds.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. v. 1. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co., 1974. p. 235-244.

JOSEPH, S. J. *et al.* Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7210 –7215, 2003.

KARKI, H. S. *et al.* Diversities in Virulence, Antifungal Activity, Pigmentation and DNA Fingerprint among Strains of *Burkholderia glumae*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

KARLOVSKY, P. Secondary Metabolites in Soil Ecology. In: VARMA, A. (ed). **Soil Biology**, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 14, 2008. 294 p.

KARPATI, F.; JONASSON, J. Polymerase chain reaction for the detection of *Pseudomonas eruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* in sputum of patients with cystic fibrosis. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, p. 397–403, 1996.

KASCHUK, G. *et al.* 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.

KELLEY, K. R; STEVENSON. J. F. Forms and nature of organic N in soil. **Fertilizer Research**, v. 42, p. 1–11, 1995.

KHADEMI, F. *et al.* Phylogenetic relationships among *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples in Mashhad, Iran. **Journal of Infection and Public Health**, 2016, (in press). Disponível em <http://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.01.003>.

Acesso 21 out 2016.

KIEFT, T. L.; RINGELBERG, D. B.; WHITE, D. C. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3292-3299, 1994.

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.

KIRK, J. L. *et al.* Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169–188, 2004.

KLENK, H. P.; GOKER, M. En route to a genome-based classification of *Archea* and *Bacteria*? **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 175–182, 2010.

KLINK, C. A. MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147–155, 2005.

KLINK, C. A.; MOREIRA, A. G. Past and current human occupation, and land use. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of Neotropical savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. cap.5, p.69-90.

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.

KOTTEK, M. *et al.* World Map of KöppenGeiger Climate Classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 15, p. 259-263, 2006.

KOWALCHUK, G. A. *et al.* Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 509–520, 2002.

KRAEMER, S. A; VELICER, G. J. Endemic social diversity within natural kin groups of a cooperative bacterium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 10823–10830, 2011.

KRIEGER, J. N.; THUMBIKAT, P. Bacterial prostatitis: bacterial virulence, clinical outcomes, and new directions. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, p. 1 - 20, 2016.

KRUG, D. *et al.* Discovering the hidden secondary metabolome of *Myxococcus xanthus*: a study of intraspecific diversity. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3058–3068, 2008.

LAGUERRE, G. *et al.* Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 981–993, 2001.

LARANJO, M.; ALEXANDRE, A.; OLIVEIRA, S. Legume growth-promoting rhizobia:

An overview on the *Mesorhizobium* genus. **Microbiological Research**, v.169, n.1, p. 2–17, 2014.

LAUBER, C. L. *et al.* Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5111–5120, 2009.

LEFF, L. G. *et al.* Identification of aquatic *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* by hybridization with species-specific rRNA gene probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1634–1636, 1995.

LEPSCH, I. (ed.). **Manual para Levantamento utilitário do meio físico e classificação de terras no sistema de capacidade de uso**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1991. 175 p.

LEPSCH, I. F. **Formação e conservação dos solos**. São Paulo: Oficina de Textos. 2002. 178p.

LI, X.; DE BOER, S. H. First report of *Burkholderia andropogonis* causing leaf spots of *Bougainvillea* sp. in Hong Kong and clover in Canada. **Plant Disease**, v. 89, p. 1132. 2005.

LIN, D. X. *et al.* *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1409-1413, 2008.

LISBOA, M. V. Socioambientalismo: coerências conceituais e práticas entre os movimentos. p. 129-139 In: PETERSEN, P. **Agricultura familiar camponesa na construção do futuro**. 2009. 168p.

LIU, B. R. *et al.* A Review of Methods for Studying Microbial Diversity in Soils. **Pedosphere**, v. 16, n. 1, p. 18-24, 2006.

LIU, P. Y. F. *et al.* Comparison of different PCR approaches for characterization of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3304–3307, 1995.

LO, C. C. Effect of pesticides on soil microbial community. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 45, n. 5, p. 348-59, 2010.

LOCKE; M.A.; ZABLOTOWICZ, R. M. Pesticids in soil – Benefits and limitations to soil health. In: SCHJØNNING, P.; ELMHOLT, S.; CHRISTENSEN, B. T. (eds). **Managing soil quality: challenges in modern agriculture**. Stoneville, USA: CAB International, 2004. p. 239-260.

LPSN. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em: 20 ago 2016.

LU, P. *et al.* *Burkholderia zhejiangensis* sp. nov., a novel methyl parathion-degrading bacterium isolated from a wastewater-treating system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1337–1341, 2012.

MAGNANI, G. S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar**. 2005. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1539–1551, 2008.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. pp.126-192.

MANTOVANI, W. A degradação dos biomas brasileiros. In: Ribeiro, W. C. **Patrimônio ambiental brasileiro**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. p. 367–439.

MARQUELLI, R. P. **O desenvolvimento sustentável da agricultura no cerrado brasileiro**. 2003. Monografia (MBA, em Gestão Sustentável da Agricultura Irrigada). ISEA-FGV/ Ecobusiness School, Brasília.

MARTENS, M. *et al.* Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 200-214, 2008.

MARTENS, M. *et al.* Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 57, p. 489-503, 2007.

MARTIN, B. *et al.* A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 3479–3483, 1992.

MARTÍNEZ-AGUILAR, L. *et al.* *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, p. 1063-1071, 2014.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. *et al.* *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 417–426, 1991.

MASOMIAN, M. *et al.* Analysis of comparative sequence and genomic data to verify phylogenetic relationship and explore a new subfamily of bacterial lipases. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2016.

MAVENGERE, N. R.; ELLIS, A. G.; LE ROUX, J. J. *Burkholderia aspalathi* sp. nov., isolated from root nodules of the South African legume *Aspalathus abietina* Thunb. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 64, p. 1906-1912, 2014.

MAYNAUD, G. *et al.* Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-

nodulating bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 65-72, 2012.

MCCORMICK, J. B. *et al.* Wound infection by an indigenous *Pseudomonas* pseudomallei-like organism isolated from the soil: case report and epidemiologic study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 135, p. 103–107, 1977.

MELO, V. F. ALLEONI, L. R. F. **Química e mineralogia do solo**, Parte II- Aplicações. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2009. 685 p.

MENDES, I. C. *et al.* Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. **Plant Soil**, v. 359, 183 – 195, 2012.

MENNA, P. *et al.* 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. 315-32, 2006.

MENNA, P. *et al.* rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, v. 48, n. 1-3, p. 120-130, 2009.

MICHELIS, J. *et al.* *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p.193–205, 1998.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Mapa de cobertura vegetal do bioma Cerrado**. Disponível em <<http://www.terrabrasil.org.br/ecotecadigital/pdf/mapa-de-cobertura-vegetal-do-bioma-cerrado.pdf>> Acesso em: 10 out 2016.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Mata Atlântica**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: 24 out 2015.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. **O bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 23 jan 2014.

MOLIN, J., MOLIN, S. **CASE: complex adaptive systems ecology**. In: Jones, J.G. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*, v. 15. Plenum, New York, p. 27–79, 1997.

MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. Introduction: the Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica** v. 32, p. 786–792, 2000.

MORGANTE, P. G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/3319817/Fixacao-Biologica-e-Assimilacao-de-Nitrogenio>, 2003>. Acesso em: 17 jun 2013.

MORÓN, B. *et al.* Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. **Chemistry and Biology**, v. 12, n. 9, p. 1029–1040, 2005.

MOSTASSO, L. *et al.* Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, p. 121-132, 2002.

MOULIN, L. *et al.* Nodulation of legumes by members of the β -subclass of proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950, 2001.

MOUSAVI, S. A. *et al.* Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, p. 208–215, 2014.

MOUSAVI, S. A. *et al.* 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.

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NANDAKUMAR, R. *et al.* *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* Cause Bacterial Panicle Blight in Rice in the Southern United States. **Plant Disease**, v. 93, n. 9, p. 896–905, 2009.

NAVARRO, R. B. *et al.* Uptake hydrogenase (Hup) in common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbioses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p.4161-4165, 1993.

NETO, M. C. N. F. A “Comissão Exploradora do Planalto Central do Brasil”: A civilização a caminho do sertão. **Estudos Humanidades**, Goiânia: UCG, v. 1, p. 239 - 261, 1973.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (Eds.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 3-8.

NIERMAN, W. C. *et al.* Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 14246- 14251, 2004.

NORMAND, P. *et al.* Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. **Gene**, v. 111, p. 119–124, 1992.

NUNAN, N. *et al.* In situ spatial patterns of soil bacterial populations, mapped at multiple scales, in an arable soil. **Microbiology Ecology**, v. 44, p. 296–305, 2002.

NUNAN, N. *et al.* Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 44, p. 203–215, 2003.

O'DONNELL, A. G. *et al.* Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. **Plant and Soil** v. 232, p. 135–145, 2001.

OLIVEIRA, A. **O que é o Cerrado?** Disponível em: <<http://www.cerradoeditora.com/sobre-o-cerrado/>>. Acesso em: 10 fev 2014.

OLIVEIRA, G. C. **Solos da região dos cerrados: reconhecimento na paisagem, potencialidades e limitações para uso agrícola**. Curso de qualificação profissional à distância. Universidade Federal de Lavras (UFLA). Lavras, Minas Gerais. 2009.

OLIVEIRA, S. H. *et al.* Control of microbiological corrosion on carbon steel with

sodium hypochlorite and biopolymer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 27–35, 2016.

OR, D. *et al.* Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media—a review. **Advances in Water Resources**, v. 30, p.1505–1527, 2007.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 2028-2029, 2015.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification, **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, p. 1633-1644, 2007.

PEREIRA, A. A. *et al.* Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1397-1412, 2007.

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

PIETIKÄINEN, J.; HIUKKA, R.; FRITZE, H. Does short-term heating of forest humus change its properties as a substrate for microbes? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 277-288, 2000.

PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1851-1864, 2007.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. 252p.

POSTGATE, J. R.; HILL, S. Nitrogen fixation. In: LYNCH, J. M.; POOLE, N. J. (Eds.) **Microbial ecology, a conceptual approach**. Oxford: Blackwell, 1979. p. 191-213.

QUINCE, C.; CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. The rational exploration of microbial diversity. **International Society for Microbial Ecology**, v. 2, p. 997–1006, 2008.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; DE BRUIJN, F. J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKKERMANS, A. D. L; VAN ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F. J. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p. 1-26.

RAJANIEMI, T. K; ALLISON, V. J. Abiotic conditions and plant cover differentially affect microbial biomass and community composition on dune gradients. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 102–109, 2009.

RAMOS, P. L. *et al.* An MLSA-based online scheme for the rapid identification of *Stenotrophomonas* isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p.

394-399, 2011.

RASMUSSEN, L. H. *et al.* Whole genome sequencing as a tool for phylogenetic analysis of clinical strains of Mitis group streptococci. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 1–11, 2016.

RBMA – Reserva Biológica da Mata Atlântica. **Anuário Mata Atlântica – 500 anos de destruição**. Disponível em:

<http://www.rbma.org.br/anuario/mata_03_aanosdedesttuicao.asp>. Acesso em: 22 out 2015.

RESENDE, M. *et al.* **Pedologia: base para distinção de ambientes**. Viçosa: Neput, 2005. 304p.

RIBEIRO, J. F., SANO, S. M.; SILVA, J. A. Chave preliminar de identificação dos tipos fisionômicos da vegetação do Cerrado. In: **XXXII Congresso Nacional de Botânica**, 32. 1981. Teresina, Brasil. **Anais...** Teresina: SBB/UFPI, 1981, p. 124-133.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, T. M. B. **Fitofisionomias do bioma Cerrado**. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. (eds.), **Cerrado: Ambiente e Flora**, Planaltina: Embrapa Cerrados, Cap. 3, 1998, p. 89-166.

RIBEIRO, M. C. *et al.* The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In: ZACHOS, F. E.; HABEL, J. C. (eds) **Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas**. Springer, Heidelberg. 2011. p 405–434.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 297-306, 2009.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. **Research in Microbiology**, v. 164, p. 740-748, 2013.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1180-1185, 2012.

RICHTER, M.; ROSSELLO-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.

RIVAS, R. *et al.* Description of *Devosianeptunia* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 47-53, 2003.

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

ROGEL, M. A.; ORMENO-ORRILLO, E.; MARTINEZ-ROMERO, E. Minireview: Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes **Systematic and**

Applied Microbiology, v. 34, p. 96–104, 2011.

ROMÁN-PONCE, B. *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.

RONDON, M. R. *et al.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2541–2547, 2000.

RONDON, M. R., GOODMAN, R. M., HANDELSMAN, J. The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 403–409, 1999.

ROUSK, J. *et al.* Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **International Society for Microbial Ecology**, v. 4, p. 1340–1351, 2010.

RUSSEL, F.W. **Soil conditions and plant growth**. 10th ed. London: Longman, p. 160-170. 1973.

SAIT, M., HUGENHOLTZ, P. JANSSEN, P. H. Cultivation of genetically distinct soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in culture-independent surveys. **Environmental Microbiology**, v. 4, p. 654 – 666, 2002.

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

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 2nd ed, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.

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

SANTOS, P. E. L.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; ECOLOGI, P. DE. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2790-2798, 2001.

SANTOS, P. E. L.; VINUESA, P. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by Multilocus Sequence Analysis. **Current Microbiology**, v. 67, p. 51-60, 2013.

SARITA, S. *et al.* Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p.1–11, 2005.

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**. MIDI - Technical Note #101. 1990.

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.

SCARANO, F. R. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rainforest. **Annals of Botany**, v. 90, p. 517–524, 2002.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 7, p. e92, 2006.

SCHMIDT, M. W. I. *et al.* Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 49-56, 2011.

SCHULZ, S. *et al.* The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation. **Biogeosciences**, v. 10, n. 6, p. 3983-3996, 2013.

SESSITSCH, A. *et al.* Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4215–4224, 2001.

SGPA – Sociedade Goiana de Pecuária e Agricultura. **A trajetória inédita da agricultura brasileira**. Disponível em: <<http://www.sgpa.com.br/post/?post/=1168>>. Acesso em: 17 fev 2014.

SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acid Residues**, v. 18, p. 6503-6508, 1990.

SHELLY, D. B. *et al.* Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3112–3115, 2000.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n.10, p.1135-1145, 2008.

SHEU, S. Y. *et al.* *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 435-441, 2013.

SHEU, S. Y. *et al.* *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2272-2278, 2012.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: Past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153-1161, 2011.

SINGH, B. K; NUNAN, N.; MILLARD, P. Response of fungal, bacterial and ureolytic communities to synthetic sheep urine deposition in a grassland soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 70, p. 109–117, 2009.

SIQUEIRA, J. O. *et al.* **Microrganismos e processos biológicos do solo. Perspectiva Ambiental**. Brasília, DF. Embrapa, 1994. 142p.

SNEATH, P. H. A. **International code of nomenclature of Bacteria (1900 revision)**, Washington: American Society for Microbiology, 1992.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman & Co, 1973. 573 p.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume-*Rhizobium* technology**. NIFTAL, MIRCEN, University of Hawaii Press, Maui, 1985.

SON, R. *et al.* Molecular characterization of *Vibrio cholera* O1 outbreak strains in Miri, Sarawak (Malaysia). **Acta Tropica**, v. 83, p. 169-176, 2002.

SON, R. *et al.* Use of randomly amplified polymorphic DNA analysis to differentiate isolates of *Vibrio parahaemolyticus* from cockles (*Anadara granosa*). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 895-901, 1998.

SOS Mata Atlântica; INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995–2000**. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, INPE, São José dos Campos, Brasil. 2001.

SOS Mata Atlântica; INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Atlas dos municípios**. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/dados-mais-recentes/atlas-dos-municipios/#sthash.gqDJrYKy.dpuf>>. Acesso em: 23 out 2015a.

SOS Mata Atlântica; INPE- Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2011-2012**. São Paulo. (Relatório Técnico), p. 1–61, 2015b.

SOS Mata Atlântica; INPE- Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2014-2015**. Disponível em <<http://mapas.sosma.org.br/>>. Acesso em: 30 ago 2016.

SOUZA, Z. M. *et al.* Sistemas de colheita e manejo da palhada de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 271-278, 2005.

SPERA, S. T. *et al.* **Atributos Físicos de Solos e Distribuição das Fitofisionomias de Cerrado na Bacia Hidrográfica do Rio Jardim, DF**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 146).

SPIPKER, T. *et al.* Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2607-2610, 2009.

STACKEBRANDT, E. *et al.* Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1043-1047, 2002.

STERN, M. J. *et al.* Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v. 37, p. 1015–1026, 1984.

- STOCCO, P. *et al.* Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1107–1120, 2008.
- STRAININFO. Available at: <http://www.straininfo.net>. Accessed 23 Out 2015.
- SUÀREZ-MORENO, Z. R. *et al.* Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated Burkholderia. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 249–66, 2011.
- TABARELLI, M. *et al.* Challenges and opportunities for Biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic forest. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 695–700. 2005.
- TALBI, C. *et al.* *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 4587–4591, 2010.
- 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, p. 512-526, 1993.
- TAYEB, L. A. *et al.* Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. **Research in Microbiology**, v. 159, p.169-177, 2008.
- The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-3. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: 23 out 2015.
- THOMAS, V. C.; KEVAN, P. Basic principles of agroecology and sustainable agriculture. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 5, p. 1-19, 1993.
- THOMPSON, F. L. *et al.* Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of Multilocus Sequence Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5107-5115, 2005.
- TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240–245, 2002.
- TREVORS, J. T. Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. **Water Air Soil Pollut**, v. 101, p. 45–67, 1998.
- TRITT, A. *et al.* An Integrated Pipeline for de Novo Assembly of Microbial Genomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.
- TRUJILLO, M. E. *et al.* Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1318-1327, 2005.
- TURCATTI, G. *et al.* A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 4, 2008.

UFG. Universidade Federal de Goiás. **Biotecnologia e Biodiversidade**. Disponível em: <<https://biotek.iesa.ufg.br/p/1868-mapas>>. Acesso em: 22 out 2015.

VAN BERKUM, P. *et al.* Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2988–2998, 2003.

VAN BERKUM, P. Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 729-734, 1999.

VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; EARDLY, B. D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 240 - 244. 1996.

VANDAMME, P. *et al.* *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 507-512, 2002.

VANDAMME, P. *et al.* Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p.1042–1047, 2000.

VANDAMME, P. *et al.* Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: _____. (Eds). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 1997. p. 297-360.

VARMA, A.; **Soil Biology**. In: KARLOVSKY, P. (Ed). Secondary metabolites in soil ecology, v. 14, 2008. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

VERSALOVIC, J. *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

VIAL, L. *et al.* Minireview: The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species : a tribute to adaptation, **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 1–12, 2011.

VILLAS-BOAS, R. C.; MOREIRA, F. M. S. Microbiologia do solo no ensino médio de lavras, MG. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 36, p. 295-306, 2012.

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

VINUESA, P. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: *Genisteae*) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*,

Bradyrhizobium genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 55, n. 2, p. 569–575, 2005.

VINUESA, P. *et al.* Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania microsymbionts* from Venezuelan wetlands. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 702–716, 2005.

VOGEL, T. M. *et al.* TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 252-252, 2009.

VOS, M. *et al.* Local adaptation of bacteriophages to their bacterial hosts in soil. **Science**, v. 325, p. 833, 2009.

WALDROP, M. P.; BALSER, T. C.; FIRESTONE, M. K. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 1837-1846, 2000.

WALL, D. H., VIRGINIA, R. A. Controls on soil biodiversity: insights from extreme environments. **Applied Soil Ecology**, v. 13, p. 137–150, 1999.

WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes. In: TRIPLETT, E.W. (Ed.) **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process**. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press, 2000. p. 177–186.

WATTS, D. B. Soil microbial community dynamics as influenced by composted dairy manure, soil properties, and landscape position. **Soil Science**, v. 175, p. 474-486, 2010.

WEISBURG, W. G. *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 6578–6583, 1998.

WILSON, K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: AUSUBEL F. M. *et al.* (Eds.) **Current Protocols in Molecular Biology**, p. 241–245. New York, USA: John Wiley & Sons, 1987.

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

WOOMER, P.; ASANO, W. Environmental factors related to rhizobial abundance in kikuyugrass (*Pennisetum clandestinum*) pastures, **Tropical Agriculture**, v. 67, n. 3, p. 217–220, 1990.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and

glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Soil**, v. 198, p. 97–107, 1998.

XU, K. W. *et al.* Polyphasic characterization of rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* from Panxi, China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 2303–2315, 2013.

YABUUCHI, E. *et al.* Proposal of *Burkholderia* gen nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov., **Microbiology Immunology**, v. 36, p.1251–1275, 1992.

YAO, H. *et al.* Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. **Microbiology Ecology**, v. 40, p. 223–237, 2000.

YAO, Z. Y. *et al.* Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2219–2230, 2002.

YOUNG, I. M; CRAWFORD, J. W. Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. **Science**, v.304, p.1634–1637, 2004.

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

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

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

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

ZHANG, C.; XU, J. Impact of imazethapyr on the microbial community structure in agricultural soils. **Chemosphere**, v. 81, p. 800-806, 2010.

ZILLI, J. E. *et al.* **Levantamento da biodiversidade de rizóbio em diferentes áreas de um sistema integrado de produção agroecológica**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1998. 15p.

ZILLI, J. *et al.* Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

ZULETA, F. L. *et al.* The complete genome of *Burkholderia phenoliruptrix* strain BR3459a, a symbiont of *Mimosa flocculosa*: highlighting the coexistence of symbiotic and pathogenic genes. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 535, 2014.

ZULKIFLI, Y. *et al.* Random amplified polymorphic DNA-PCR and ERIC PCR analysis on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia. **International Food Research Journal**, v.16, p. 141-150, 2009.

6. ESTUDO 1

DALL'AGNOL, R. F. *et al.* *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.3222-3229, 2014.

Rhizobium paranaense sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil

Rebeca Fuzinato Dall'Agnol,^{1,2,3} Renan Augusto Ribeiro,^{1,3,3} Jakeline Renata Marc, on Delamuta,^{1,3,3} Ernesto Ormen˜o-Orrillo,⁴ Marco Antonio Rogel,⁴ Diva Souza Andrade,⁵ Esperanza Martı́nez-Romero⁴ and Mariangela Hungria^{1,2,3}

Correspondence
Mariangela Hungria
mariangela.hungria@embrapa.br
or hungria@pq.cnpq.br

¹Embrapa Soja, C.P. 231, 86001-970, Londrina, Parana´, Brazil

²Universidade Estadual de Londrina, Dept. of Biochemistry and Biotechnology, C.P. 10.011, 86057-970, Londrina, Parana´, Brazil

³Universidade Estadual de Londrina, Dept. of Microbiology, C.P. 10.011, 86057-9970, Londrina, Parana´, Brazil

⁴Centro de Ciencias Geno´micas, Universidad Nacional Auto´noma de Me´xico, Cuernavaca, Morelos, Mexico

⁵IAPAR, C.P. 481, 86001-970, Londrina, Parana´, Brazil

Nitrogen (N), the nutrient most required for plant growth, is key for good yield of agriculturally important crops. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) can benefit from bacteria collectively called rhizobia, which are capable of fixing atmospheric nitrogen (N₂) in root nodules and supplying it to the plant. Common bean is amongst the most promiscuous legume hosts; several described species, in addition to putative novel ones have been reported as able to nodulate this legume, although not always effectively in terms of fixing N₂. In this study, we present data indicating that Brazilian strains PRF 35^T, PRF 54, CPAO 1135 and H 52, currently classified as *Rhizobium tropici*, represent a novel species symbiont of common bean. Morphological, physiological and biochemical properties differentiate these strains from other species of the genus *Rhizobium*, as do BOX-PCR profiles (less than 60 % similarity), multilocus sequence analysis with *recA*, *gyrB* and *rpoA* (less than 96.4 % sequence similarity), DNA–DNA hybridization (less than 50 % DNA–DNA relatedness), and average nucleotide identity of whole genomes (less than 92.8%). The novel species is effective in nodulating and fixing N₂ with *P. vulgaris*,

Leucaena leucocephala and *Leucaena esculenta*. We propose the name *Rhizobium paranaense* sp. nov. for this novel taxon, with strain PRF 35^T (5CNPSo 120^T5LMG 27577^T5IPR-Pv 1249^T) as the type strain.

Agricultural soils are frequently damaged by intense management and stressful climate conditions, leading to nutrient impoverishment and loss of biological activity. Since nitrogen (N) is an essential nutrient for crops, its

deficiency in soil can negatively affect crop growth. Symbiotic diazotrophic bacteria known as rhizobia can fix atmospheric N₂ in the root nodules of legumes, supplying a large proportion of the host plant's nitrogen needs. Besides environmental benefits, the application of these bacteria as inoculants can promote significant economy in N-fertilizer use (Ormen˜o-Orrillo et al., 2013). Important commercial crops such as common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) possess the ability to associate with a variety of diazotrophic bacteria within the genus *Rhizobium*, including species effective in fixing N₂ (Fix⁺) (*Rhizobium leguminosarum* sv. *phaseoli*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium*

³These authors contributed equally to this paper.

Abbreviations: ANI, average nucleotide identity; DDH, DNA–DNA hybridization.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number of the sequences obtained in this work are in supplementary table S1.

Three supplementary figures and six supplementary tables are available with the online version of this paper.

etli, *Rhizobium leucaenae*, *Rhizobium giardinii* sv. phaseoli, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium lusitanum*, *Rhizobium pisi*, *Rhizobium freirei*, *Rhizobium mesoamericanum*, as well as *Fix²* species (*R. giardinii* sv. *giardinii* and *Rhizobium miluonense*).

All strains used in commercial inoculants in Brazil with common bean belong to *R. tropici* [SEMIA 4077^T (5CIAT 899^T) and SEMIA 4088 (5H 12)] or *R. freirei* [SEMIA 4080^T (5PRF 81^T)], and show genetic stability and high tolerance of stressful environmental conditions (Hungria et al., 2000, 2003; Dall'Agnol et al., 2013). In our studies, we have identified other strains, including PRF 35^T, PRF 54, CPAO 1135 and H 52, which show high efficiency in N₂ fixation with common bean, and are classified as *R. tropici* (Hungria et al., 2000, 2003; Mostasso et al., 2002; Pinto et al., 2007). However, our research group has accumulated evidence to indicate that these strains represent a distinct species (Mostasso et al., 2002; Chueire et al., 2003; Pinto et al., 2007; Ribeiro et al., 2009).

The four above-mentioned strains composed a group by cluster analysis of BOX-PCR genomic fingerprints, with less than 60 % similarity with other *R. tropici*-related species (Fig. S1, available in the online Supplementary Material). The four strains have been isolated from disparate regions of Brazil: PRF 35^T and PRF 54 are from Parana' State in the south (Hungria et al., 2000; Cardoso et al., 2012); H 52 is from the Cerrados region in central-western Brazil (Mostasso et al., 2002), and CPAO 1135 is from Mato Grosso do Sul State, in the western region (Pinto et al., 2007) (Table 1). Strains from this group are able to nodulate and establish effective N₂-fixing symbioses with *P. vulgaris*,

Leucaena leucocephala and *Leucaena esculenta*; form pseudonodules on *Calopogonium mucunoides* and *Macroptilium atropurpureum*; and are unable to nodulate *Centrosema pubescens*, *Lupinus albus*, *Medicago sativa* and *Vigna unguiculata* (Hungria et al., 2000 and this study). Due to their potential agronomic and environmental importance, we performed a polyphasic analysis to demonstrate that these four strains show considerable genetic and phenotypic

Table 1. Strains used in this study

Strain	Host species	Geographical origin	Reference
<i>Rhizobium paranaense</i> sp. nov. PRF 35 ^T (5CNPSo 120 ^T 5LMG 2757 ^T 5IPR-Pv 1249 ^T)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Parana', Brazil	Hungria et al. (2000); Cardoso et al. (2012)
PRF 54 (5CNPSo 121)	<i>P. vulgaris</i>	Parana', Brazil	Hungria et al. (2000)
CPAO 1135 (5CNPSo 234)	<i>P. vulgaris</i>	Mato Grosso do Sul, Brazil	Pinto et al. (2007)
H 52 (5CNPSo 731)	<i>P. vulgaris</i>	Goia's, Brazil	Mostasso et al. (2002)
<i>Rhizobium leucaenae</i> CFN 299 ^T (5USDA 9039 ^T 5LMG 9517 ^T 5UMR1026 ^T 5CENA 183 ^T 5SEMIA 4083 ^T 5CNPSo 141 ^T)	<i>P. vulgaris</i>	Brazil	Ribeiro et al. (2012)
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T (5USDA 9030 ^T 5ATCC 49672 ^T 5UMR 1899 ^T 5TAL 1797 ^T 5HAMB 1163 ^T 5CM0 ^T 5SEMIA 4077 ^T 5DSM 11418 ^T 5BR 322 ^T 5CNPSo 142 ^T)	<i>P. vulgaris</i>	Colombia	Martínez-Romero et al. (1991)
<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T (5DSM 30148 ^T 5LMG 150 ^T 5NBRC 13257 ^T 5IAM 13570 ^T 5CNPSo 1976 ^T)			Vela'zquez et al. (2010)
<i>Rhizobium hainanense</i> CCBAU 57015 ^T (5I66 ^T 5BCRC 15793 ^T 5CCRC 15793 ^T 5CECT 4658 ^T 5DSM 11917 ^T 5ICMP 13690 ^T 5LMG 18074 ^T 5USDA 3588 ^T 5CNPSo 2450 ^T)	<i>Desmodium sinuatum</i>	Hainan, China	Chen et al. (1997)
<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7 ^T (5CECT 7016 ^T 5CIP 109524 ^T 5LMG 22705 ^T 5CNPSo 2055 ^T)	<i>P. vulgaris</i>	Arcos de Valdevez, Portugal	Valverde et al. (2006)
<i>Rhizobium multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T (5HAMB 5LMG 23946 ^T 5LMG 24298 ^T 5CNPSo 2054 ^T)	<i>Halimodendron halodendron</i>	Xinjiang, China	Han et al. (2008)
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251 ^T (5HAMB 2971 ^T 5LMG 24208 ^T 5CNPSo 2056 ^T)	<i>Lespedeza chinensis</i>	Hunan, China	Gu et al. (2008)
<i>Rhizobium calliandrae</i> CCGE524 ^T (5ATCC BAA-2435 ^T 5CIP 110456 ^T 5LBP2-1 ^T 5CNPSo 2466 ^T)	<i>Calliandra grandiflora</i>	Chiapas, Mexico	Rinco'n-Rosales et al. (2013)
<i>Rhizobium mayense</i> CCGE526 ^T (5CIP 110454 ^T 5NSJP1-1 ^T 5CNPSo 2464 ^T)	<i>C. grandiflora</i>	Chiapas, Mexico	Rinco'n-Rosales et al. (2013)
<i>Rhizobium jaguaris</i> CCGE525 ^T (5ATCC BAA-2445 ^T 5CIP 110453 ^T 5NSJP1-2 ^T 5CNPSo 2465 ^T)	<i>C. grandiflora</i>	Chiapas, Mexico	Rinco'n-Rosales et al. (2013)
<i>Rhizobium freirei</i> PRF 81 ^T (5SEMIA 4080 ^T 5IPR-Pv81 ^T ; WDCM 440 ^T 5CNPSo 122 ^T)	<i>P. vulgaris</i>	Parana', Brazil	Dall'Agnol et al. (2013)

dissimilarities with known species of the genus *Rhizobium*, and therefore should be considered a distinct taxon.

16S rRNA gene sequences were retrieved from the GenBank database, or obtained at Embrapa's Soil Biotechnology Laboratory (Table S1) with primers and conditions specified in Table S2. Alignments and phylogenies were obtained with MEGA 5.1 software, using the maximum-likelihood (Felsenstein, 1981) algorithm, as suggested by Tindall et al. (2010), as well as the neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) algorithm and Kimura two-parameter (K2P) distances (Kimura, 1980). The 16S rRNA gene phylogeny based on the maximum-likelihood algorithm showed that strains PRF 35^T, PRF 54, CPAO 1135 and H 52 fall within a clade formed by eleven species of the 'Rhizobium tropici group' (*R. tropici*, *R. leucaenae*, *R. lusitanum*, *R. multihospitium*, *R. miluonense*, *R. hainanense*, *R. calliandrae*, *R. mayense*, *R. jaguaris*, *R. rhizogenes* and *R. freirei*) (Ribeiro et al., 2012; Dall'Agnol et al., 2013) (Fig. 1). The phylogeny was confirmed with the neighbour-joining algorithm (Fig. S2). The levels of 16S rRNA gene sequence similarity among these four strains ranged from 99.3 % to 99.9 %, overlapping the range between distinct species within this group

(99.1–99.8 %) (Table S3). As many authors have verified, phylogenetic analysis based exclusively on the 16S rRNA gene may not reflect the correct taxonomic position of a strain at the species level (Wang & Martínez-Romero, 2000; Coenye et al., 2001; Martens et al., 2007; Menna et al., 2009). For example, we have recently reported that *R. freirei* and *R. multihospitium* have identical 16S rRNA gene sequences (Dall'Agnol et al., 2013). According to Vandamme et al. (1996), different species should show less than 97 % of nucleotide identity in the 16S rRNA gene, which does not occur within any of the type strains used in our study.

To clarify the relationships among strains PRF 35^T, PRF 54, CPAO 1135 and H 52 and other species of the genus *Rhizobium*, a multilocus sequence analysis (MLSA) was performed. Sequences of three housekeeping genes, *gyrB*, *recA* and *rpoA*, were obtained from the GenBank database or at Embrapa's Biotechnology Laboratory using previously described primers and conditions (Table S2). The phylogenetic tree was reconstructed as described for the 16S rRNA gene, and congruence between the three housekeeping genes was confirmed before they were concatenated into a unique sequence. Fig. 2 shows the result of the three-gene

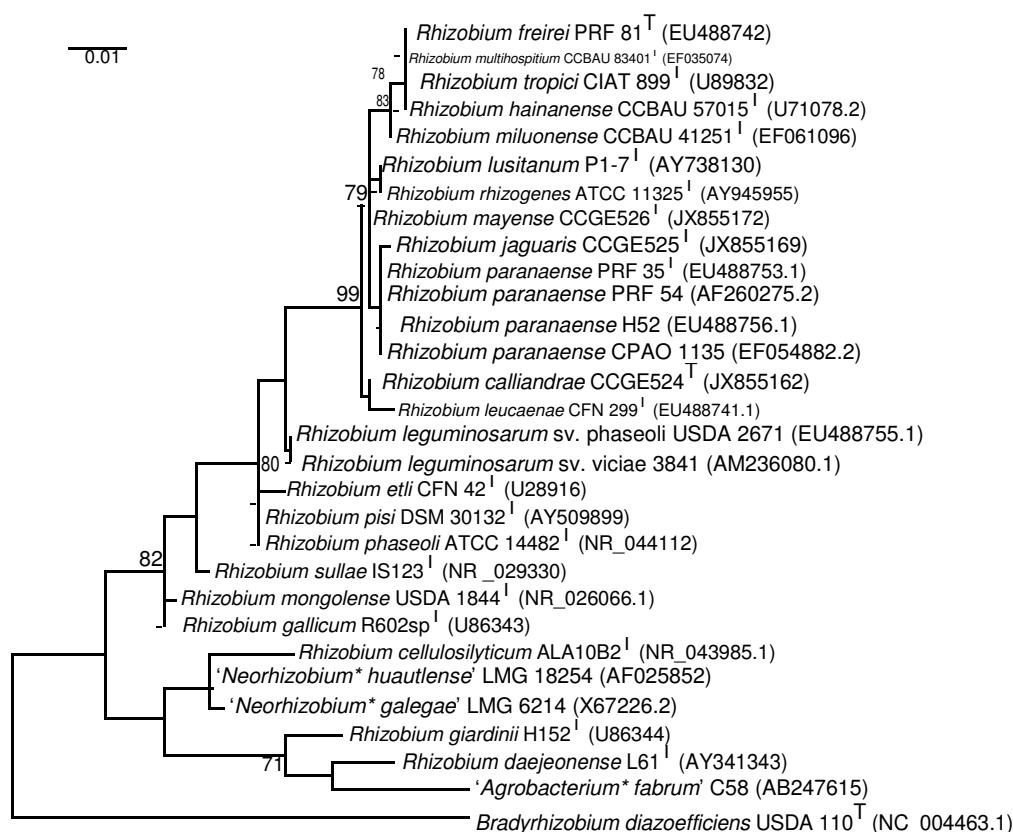


Fig. 1. Maximum-likelihood 16S rRNA gene phylogeny based on gene sequences from *Rhizobium paranaense* sp. nov. and other species of the genus *Rhizobium*. Bootstrap support values based on 1000 resamplings are shown at nodes only when they were ≥ 70 %. Bar, percentage of nucleotide substitutions. Asterisks indicate that according to the recent proposal by Mousavi et al. (2014), *R. galegae* and *R. huaatlense* should be reclassified in the new genus 'Neorhizobium' and some species should return to the genus *Agrobacterium*.

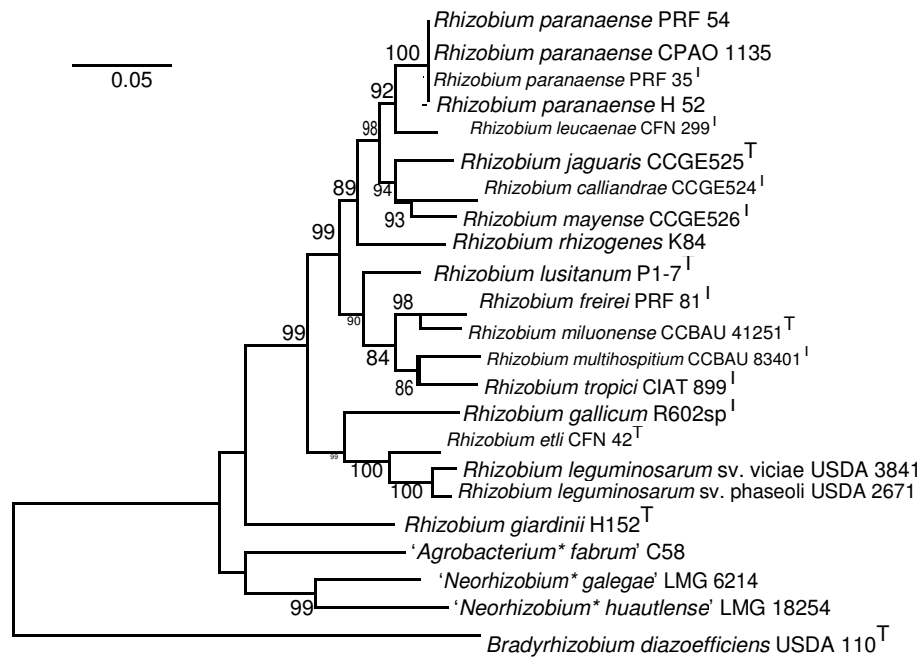


Fig. 2. Maximum-likelihood phylogeny based on concatenated alignment of *gyrB*, *recA* and *rpoA* gene sequences from *R. paranaense* sp. nov. and closely related species of the genus *Rhizobium*. Bootstrap support values based on 1000 resamplings are shown at nodes only when they were ≥ 70 %. Bar, percentage of nucleotide substitutions. Asterisks indicate that according to the recent proposal by Mousavi et al. (2014), *R. galegae* and *R. huautlense* should be reclassified in the new genus 'Neorhizobium' and some species should return to the genus *Agrobacterium*.

concatenated phylogenetic analysis, where strains PRF 35^T, PRF 54, CPAO 1135 and H 52 were placed into a single, highly supported group in the tree built with the maximum-likelihood algorithm; a similar tree was obtained with the neighbour-joining algorithm (Fig. S3). Nucleotide identities of the concatenated sequences among the strains ranged from 99.7–99.9 % (Table S3). Strains PRF 35^T, PRF 54, CPAO 1135 and H 52 were part of a subclade including *R. leucaenae*, *R. jaguaris*, *R. mayense* and *R. calliandrae*, all belonging to the 'R. tropici group'. *R. hainanense* was not included in the MLSA, but similarities of *gyrB* and *recA* sequences were lower than with species closer to strain PRF 35^T (Table S3). *R. leucaenae* was the closest species to strains PRF 35^T, PRF 54, CPAO 1135 and H 52 (Fig. 2), with a nucleotide identity of 96.4 % with strain PRF 35^T (Table S3). The concatenated tree is also supportive of the recent proposal of reclassification of *R. huautlense* and *R. galegae* in the new genus 'Neorhizobium', and of *R. radiobacter* as a member of the genus *Agrobacterium*; it is also indicative that *R. giardinii* might represent a new genus (Mousavi et al., 2014).

To support the distinctiveness of the group of four strains from other related species, DNA–DNA hybridization (DDH) experiments (Martínez-Romero et al., 1991) were performed between strain PRF 35^T and all type strains of the 'R. tropici group'. The DNA–DNA relatedness value obtained was less than 50 % with all type strains evaluated (Table S4), confirming that the group of four investigated

strains correspond to a novel species of the genus *Rhizobium*.

Average nucleotide identity (ANI) of genome sequences has been proposed as an alternative to DDH in prokaryotic taxonomy with an ANI of 95–96 % corresponding to 70 % DDH (Richter & Rossello-Móra, 2009; Konstantinidis et al., 2006). The genome sequences of strain PRF 35^T (a 20-fold coverage, our unpublished results), *R. tropici* CIAT 899^T, *R. freirei* PRF 81^T (Ormenó-Orrillo et al., 2012), *R. rhizogenes* K84 (Slater et al., 2009) and *R. leucaenae* CFN 299^T (a 20-fold coverage, our unpublished results) were used to calculate ANI values using JSpecies (Richter & Rossello-Móra, 2009) and mummer for sequence alignment. These species represent the diversity found within the 'R. tropici group' (Fig. 2). Strain PRF 35^T had ANI values of 92.7 %, 86.7 %, 86.5 % and 86 % with *R. leucaenae* CFN 299^T, *R. freirei* PRF 81^T, *R. rhizogenes* K84 and *R. tropici* CIAT 899^T, respectively, all below the species circumscription threshold.

To determine the DNA G+C content of strain PRF 35^T, genome contigs were concatenated and the proportion of G+C bases was calculated with BioEdit (Hall, 1999). The genomic DNA G+C content of strain PRF 35^T was 59.1 mol%, which is within the range reported for species of the genus *Rhizobium* (Jordan, 1984).

Phenotypic characterization of the four investigated strains was performed as described previously (Hungria et al., 2001; Ribeiro et al., 2012). The morpho-physiological tests

Table 2. Distinctive phenotypic features of *Rhizobium paranaense* sp. nov. and phylogenetically related species of the 'Rhizobium tropici group'

Taxa: 1, PRF 35^T; 2, *R. leucaenae*; 3, *R. tropici*; 4, *R. lusitanum*; 5, *R. miluonense*; 6, *R. multihospitium*; 7, *R. hainanense*; 8, *R. rhizogenes*; 9, *R. calliandrae*; 10, *R. mayense*; 11, *R. jaguaris*; 12, *R. freirei*. +, Growth, 2, no growth; w, weak growth*; ND, not determined.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Colony characteristics												
Morphology on YMA	Opaque, gummy	Opaque, dry	Translucent, gummy	Opaque, gummy	Opaque, gummy	Opaque, gummy	Translucent, gummy	Translucent, gummy	Translucent, gummy	Opaque, gummy	Opaque, gummy	Opaque, gummy
Colour on YMA	White	Rose	White	Light rose	White	White	White	Rose	Light rose	Rose	Rose	Rose
Elevation	Convex	Flat	Convex	Convex	Convex	Convex	Convex	Convex	Convex	Convex	Convex	Convex
Growth in/at:												
PY without Ca	2	2	+	+	+	+	+	+	2	2	2	w
LB	2	2	+	+	+	2	2	+	2	2	2	w
TY 40 uC	+	w	+	2	2	2	2	+	2	2	2	+
TY pH 4	+	w	+	2	+	2	ND	2	2	2	2	+
Carbon source utilization												
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	w	+	w	+	+
Erythritol	+	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinose	+	+	+	w	+	+	+	+	w	w	w	w
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	w	w	w	w	w
L-Xylose	+	+	2	+	+	+	+	+	w	w	w	+
D-Adonitol	+	+	+	+	w	+	+	+	w	w	w	+
Methyl b-D-xylopyranoside	w	+	+	+	+	+	+	+	w	+	w	w
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	w	+	w	w	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	w	+	w	w	w
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	w	+	w	w	+
L-Sorbose	2	2	2	w	+	w	w	w	2	2	2	w
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	w	w	+	+	w
Dulcitol	2	w	2	2	w	w	w	w	w	2	2	2
Inositol	+	+	+	+	+	+	w	w	w	w	w	w
D-Mannitol	+	+	+	w	+	+	+	w	+	+	w	w
D-Sorbitol	2	2	2	w	+	w	+	w	2	w	w	w
Methyl a-D-mannopyranoside	2	2	2	w	2	w	2	2	2	2	2	2
Methyl a-D-glucopyranoside	w	2	+	w	+	+	+	+	w	w	w	w
N-Acetylglucosamine	w	2	2	2	+	+	w	+	2	w	2	+
Amygdalin	2	2	2	w	w	w	+	+	2	w	2	2
Arbutin	w	2	w	+	+	+	+	+	w	w	w	+
Salicin	+	2	w	+	+	+	w	+	w	w	w	+

Table 2. cont.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cellobiose	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w
Maltose	+	w	+	+	+	+	+	w	w	w	w	w
Lactose	+	w	w	+	+	+	w	w	w	w	w	w
Melibiose	w	w	w	+	+	+	w	w	w	w	w	w
Sucrose	w	w	+	+	+	+	w	+	w	w	w	w
Trehalose	w	w	+	+	+	+	+	+	w	w	w	w
Melezitose	+	2	2	2	2	2	w	2	2	2	2	2
Raffinose	w	w	w	+	+	+	w	w	w	w	w	w
Glycogen	+	2	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylitol	w	2	2	w	+	w	+	w	2	w	2	w
Gentiobiose	+	w	w	+	+	+	+	+	w	w	w	w
Turanose	w	w	w	w	+	+	+	w	w	w	w	w
D-Tagatose	2	w	2	w	+	w	w	+	w	2	2	w
D-Arabitol	+	+	+	w	+	+	+	w	w	w	w	w
L-Arabitol	2	2	w	w	w	w	+	+	2	2	2	+
Resistance to:												
Nalidixic acid (30 mg)	+	+	+	+	+	+	2	w	+	+	+	+
Ampicillin (10 mg)	2	2	+	2	+	+	2	2	2	2	2	w
Chloramphenicol (30 mg)	2	2	+	2	+	2	w	+	w	2	2	2
Cefuroxime (30 mg)	2	2	+	+	+	+	2	2	2	2	2	+
Erythromycin (15 mg)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	+
Streptomycin (10 mg)	2	2	+	2	w	w	w	+	2	2	2	2
Neomycin (30 mg)	2	2	2	w	2	w	2	w	w	+	w	w
Penicillin (10U)	+	2	+	+	+	+	+	+	+	w	w	+
Tetracycline (30 mg)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Enzyme activity												
Urease	+	w	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	w	+	+

*Growth was considered weak when optical density was between 20 and 59 % of the full growth in liquid medium, or with the light green colour in the API 50CH kit.

included colony morphology, growth characteristics, utilization of different carbon sources, tolerance of antibiotics and urease activity in YM medium with red phenol (Vincent, 1970). The strains used as comparisons are shown in Table 1. The phenotypes of strain PRF 35^T were compared with those of strains from the 'R. tropici group', including *R. leucaenae*, *R. tropici*, *R. lusitanum*, *R. miluonense*, *R. multihospitium*, *R. hainanense*, *R. rhizogenes*, *R. calliandrae*, *R. mayense*, *R. jaguaris* and *R. freirei* (Table 2) and to other common-bean *Rhizobium* symbionts (Table S5). The results showed that strain PRF 35^T can be distinguished from *R. leucaenae*, the closest species by MLSA, in mucus production, colony colour on YMA medium, tolerance of penicillin, growth at 40 °C and at pH 4, and in 15 out of the 49 carbon sources tested with the API 50CH kit (Table 2). It also differs from *R. tropici*, the species it is usually classified as representing, in colony morphology, growth in LB medium and PY medium without Ca, tolerance of ampicillin, chloramphenicol, cefuroxime and streptomycin, and the pattern of utilization of 13 carbon sources. In relation to *R. jaguaris*, also a close species in the 16S rRNA gene phylogeny, it differs in colony morphology, tolerance of erythromycin, neomycin and penicillin, and in the pattern of utilization of 19 carbon sources (Table 2).

Fatty acid profiles were obtained with the MIDI system using FAME library TSBA6 from a culture grown for 5 days at 28 °C on YMA plates. Like many species within the genus *Rhizobium*, the four investigated strains presented summed feature 8 (C₁₈:1v7c/v6c) as major fatty acids (Tighe et al., 2000), but at a higher proportion than other species of the 'R. tropici group', except for, *R. leucaenae* and *R. freirei*. (Table S6). Other fatty acids can also be used to distinguish the group of four investigated strains from other species due to differences in relative amounts. Strains PRF 35^T, PRF 54, CPAO 1135 and H 52 had lower proportions of C₁₆:0

amounts of C₁₉:0 cyclo v8c than *R. calliandrae*, *R. jaguaris* and *R. freirei*, but lower amounts than *R. leucaenae*, *R. tropici*, *R. lusitanum*, *R. multihospitium* and *R. rhizogenes* (Table S6).

The genotypic, phenotypic and phylogenetic data presented in this work indicate that strains PRF 35^T, PRF 54, CPAO 1135 and H 52 represent a homogeneous group distinct from all other species described in the genus *Rhizobium*. Hence, we propose the name *Rhizobium paranaense* sp. nov. to accommodate this group of strains.

Description of *Rhizobium paranaense* sp. nov.

Rhizobium paranaense (pa.ra.na.en9se. N.L. neutr. adj. paranaense of or belonging to Parana'. Named after Parana' State, where our research group is established and where the type strain was isolated).

Cells are Gram-reaction-negative, aerobic, non-spore-forming rods. Colonies on YMA medium are circular convex, white, opaque, with abundant production of mucus and usually 3–5 mm in diameter within 2–3 days

of incubation at 28 °C. Acidifies YMA medium after 3 days. Can tolerate 40 °C. Grows at pH 4, but not in PY medium without Ca and in LB medium. Sensitive to ampicillin (10 mg), neomycin (30 mg), chloramphenicol (30 mg), streptomycin (10 mg), cefuroxime (30 mg) and tetracycline (30 mg), and resistant to nalidixic acid (30 mg), erythromycin (15 mg) and penicillin (10 U). Utilizes glycerol, erythritol, D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, L-xylose, D-adonitol, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-rhamnose, inositol, D-mannitol, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melezitose, glycogen, gentio-biose, D-lyxose, D-fucose, L-fucose and D-arabitol as carbon sources; weakly uses methyl β-D-xylopyranoside, methyl α-D-glucopyranoside, N-acetylglucosamine, arbutin, meli-biose, sucrose, trehalose, raffinose, xylitol and turanose. Induces the formation of root nodules and is effective in fixing N₂ with *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala* and *Leucaena esculenta*.

The type strain is PRF 35^T (5CNPS0120^T5LMG 27577^T5 IPR-Pv 1249^T) isolated from an effective nodule of *P. vulgaris* collected in Parana' State, Brazil. The DNA G+C content of the type strain is 59.1 mol%.

Acknowledgements

The study was partially supported by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil), Project Repensa (562008/2010-1) and UNAM, Mexico (PAPIIT IN205412). The authors acknowledge Ligia Maria O. Chueire (Embrapa Soja) for help in several steps of this work, Dr Itamar Soares de Melo (Embrapa Meio Ambiente) for help in the fatty acids analysis and Dr Allan R. J. Eaglesham for suggestions on the manuscript. R. A. R., R. F. D.'A. and J. R. M. D. acknowledge PhD fellowships from CAPES (National Council for the Improvement of Higher Education). M. H. is also a research fellow from CNPq (300547/2010-2). Embrapa Soja and Centro de Ciencias Genômicas, UNAM had a bilateral collaboration project CNPq/CONACYT (490048/2009-9). Approved for publication by the Editorial Board of Embrapa Soja as manuscript number 043/2014.

References

- Cardoso, J. D., Hungria, M. & Andrade, D. S. (2012). Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 2035–2049.
- Chen, W.-X., Tan, Z.-Y., Gao, J.-L., Li, Y. & Wang, E.-T. (1997). *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int J Syst Bacteriol* 47, 870–873.
- Chueire, L. M. O., Bangel, E. V., Mostasso, F. L., Campo, R. J., Pedrosa, F. O. & Hungria, M. (2003). Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. *Rev Bras Ci Solo* 27, 833–840.
- Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J. R. W. & LiPuma, J. J. (2001). Taxonomy and identification of the Burkholderia cepacia complex. *J Clin Microbiol* 39, 3427–3436.
- Dall'Agnol, R. F., Ribeiro, R. A., Ormen'o-Orrillo, E., Rogel, M. A., Delamuta, J. R., Andrade, D. S., Mart'nez-Romero, E. & Hungria, M. (2013). *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris*

- that is very effective at fixing nitrogen. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 4167–4173.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17, 368–376.
- Gu, C. T., Wang, E. T., Tian, C. F., Han, T. X., Chen, W. F., Sui, X. H. & Chen, W. X. (2008). *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1364–1368.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95–98.
- Han, T. X., Wang, E. T., Wu, L. J., Chen, W. F., Gu, J. G., Gu, C. T., Tian, C. F. & Chen, W. X. (2008). *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1693–1699.
- Hungria, M., Andrade, D. S., Chueire, L. M. O., Probanza, A., Gutierrez-Manero, F. J. & Megías, M. (2000). Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem* 32, 1515–1528.
- Hungria, M., Chueire, L. M. O., Coca, R. G. & Megías, M. (2001). Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. *Soil Biol Biochem* 33, 1349–1361.
- Hungria, M., Campo, R. J. & Mendes, I. C. (2003). Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol Fert Soils* 39, 88–93.
- Jordan, D. C. (1984). Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 234–235. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111–120.
- Konstantinidis, K. T., Ramette, A. & Tiedje, J. M. (2006). Toward a more robust assessment of intraspecific diversity, using fewer genetic markers. *Appl Environ Microbiol* 72, 7286–7293.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M. & Willems, A. (2007). Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 489–503.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P. & Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol* 41, 417–426.
- Menna, P., Barcellos, F. G. & Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2934–2950.
- Mostasso, L., Mostasso, F. L., Dias, B. G., Vargas, M. A. T. & Hungria, M. (2002). Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Res* 73, 121–132.
- Mousavi, S. A., Osterman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P. & Lindström, K. (2014). Phylogeny of the *Rhizobium*-*Allorhizobium*-*Agrobacterium* clade supports the delimitation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 37, 208–215.
- Ormenó-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L. G. P., Ollero, F. J., Nicolás, M. F., Pains Rodrigues, E., Shigueyoshi Nakatani, A., Silva Batista, J. S., Oliveira Chueire, L. M. & other authors (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* 13, 735.
- Ormenó-Orrillo, E., Hungria, M. & Martínez-Romero, E. (2013). Dinitrogen-fixing prokaryotes. In *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*, pp. 427–451. Edited by E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt & F. Thompson. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Pinto, F. G. S., Hungria, M. & Mercante, F. M. (2007). Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol Biochem* 39, 1851–1864.
- Ribeiro, R. A., Barcellos, F. G., Thompson, F. L. & Hungria, M. (2009). Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res Microbiol* 160, 297–306.
- Ribeiro, R. A., Rogel, M. A., López-López, A., Ormenó-Orrillo, E., Barcellos, F. G., Martínez, J., Thompson, F. L., Martínez-Romero, E. & Hungria, M. (2012). Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1179–1184.
- Richter, M. & Rossello-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19126–19131.
- Rincón-Rosales, R., Villalobos-Escobedo, J. M., Rogel, M. A., Martínez, J., Ormenó-Orrillo, E. & Martínez-Romero, E. (2013). *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayense* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 3423–3429.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406–425.
- Slater, S. C., Goldman, B. S., Goodner, B., Setubal, J. C., Farrand, S. K., Nester, E. W., Burr, T. J., Banta, L., Dickerman, A. W. & other authors (2009). Genome sequences of three *Agrobacterium* biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *J Bacteriol* 191, 2501–2511.
- Tighe, S. W., de Lajudie, P., Dipietro, K., Lindström, K., Nick, G. & Jarvis, B. D. W. (2000). Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 787–801.
- Tindall, B. J., Rossello-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W. & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 249–266.
- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E. & Vela-zquez, E. (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2631–2637.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60, 407–438.
- Vela-zquez, E., Palomo, J. L., Rivas, R., Guerra, H., Peix, A., Trujillo, M. E., García-Benavides, P., Mateos, P. F., Wabiko, H. & Martínez-Molina, E. (2010). Analysis of core genes supports the reclassification of strains *Agrobacterium radiobacter* K84 and *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 into the species *Rhizobium rhizogenes*. *Syst Appl Microbiol* 33, 247–251.
- Vincent, J. M. (1970). Manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific, IBP Handbook, 15, 164.
- Wang, E. T. & Martínez-Romero, E. (2000). Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes. In *Prokaryotic Nitrogen Fixation: a Model System for Analysis of a Biological Process*, pp. 177–186. Edited by E. W. Triplett. Wymondham: Horizon Scientific.

Table S1. GenBank accession numbers for the sequences used in this study.

Species/strain name	16S rRNA	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>
<i>R. paranaense</i> PRF 35 ^T	EU488753.1	KF738135	EU488826.1	EU488842.1
<i>R. paranaense</i> PRF 54	AF260275.2	KF738136	KF738133	KF738130
<i>R. paranaense</i> CPAO 1135	EF054882.2	KF738137	KF738134	KF738131
<i>R. paranaense</i> H 52	EU488756.1	KF738138	EU488828.1	EU488834.1
<i>R. calliandrae</i> CCGE 524 ^T	JX855162	KF761514	JX855189	KF761517
<i>R. freirei</i> PRF 81 ^T	EU488742	KJ603458	EU488827	EU488836
<i>R. hainanense</i> CCBAU 57015 ^T	U71078.2	HQ438236	HQ394252	-
<i>R. jaguaris</i> CCGE 525 ^T	JX855169	KF761516	JX855192	KF761519
<i>R. leguminosarum</i> sv. <i>phaseoli</i> USDA 2671 ^T	EU488755.1	KC293526	EU488811	EU488837
<i>R. leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i> 3841	AM236080.1	AM236080	AM236080	AM236080
<i>R. leucaenae</i> CFN 299 ^T	EU488741.1	KC293524	EU488817	EU488845
<i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T	AY738130	KC293525	DQ431674	JF318205
<i>R. mayense</i> CCGE 526 ^T	JX855172	KF761515	JX855195	KF761518
<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	EF061096	KC293527	HM047131	JF318206
<i>R. multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T	EF035074	KC293528	EF490029	JF318207
<i>R. rhizogenes</i> K84	-	NC_011985.1	NC_011985.1	NC_011985.1
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	U89832	HQ438238	AJ294373	EU488833
<i>R. cellulosityticum</i> ALA10B2 ^T	NR_043985.1	-	-	-
<i>R. daejeonense</i> L61 ^T	AY341343	-	-	-
<i>R. etli</i> CFN 42 ^T	U28916	-	-	-
<i>N. galegae</i> LMG 6214 ^{T,*}	X67226.2	-	-	-
<i>R. gallicum</i> R602 ^T	U86343	-	-	-
<i>R. giardinii</i> H 152 ^T	U86344	-	-	-
<i>N. huautlense</i> LMG 18254 ^{T,*}	AF025852	-	-	-
<i>R. mongolense</i> USDA 1844 ^T	NR_026066.1	-	-	-
<i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T	NR_044112	-	-	-
<i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T	AY509899	-	-	-
<i>R. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	AY945955	-	-	-
<i>R. sullae</i> IS123 ^T	NR_029330	-	-	-
<i>A. fabrum</i> C58 ^T	AB247615	-	-	-

* According to the recent proposal by Mousavi *et al.* (2014), *R. galegae* and *R. huautlense* should be reclassified in the new genus *Neorhizobium* and some species should return to the genus *Agrobacterium*.

Note: Sequences obtained from this paper are in bold.

Table S2. Primers used for the PCR amplification and sequencing analysis of the DNA, and size of the aligned fragment considered in the MLSA analysis.

Gene	Primer	Sequence (5' - 3')	Size	Reference
16S rRNA	fd1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1,333 bp	Menna <i>et al.</i> (2006)
	Y2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT		
	362f	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG		
	786f	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG		
	rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC		
<i>recA</i>	recA6f	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA	397 bp	Gaunt <i>et al.</i> (2001)
	recA555r	CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT		
<i>rpoA</i>	RRrpoAf	GGAAATCGCCATCAAGATGG	603 bp	Ribeiro <i>et al.</i> (2009)
	RRrpoAr	ACGCTTGCGGAGATCTTC		
<i>gyrB</i>	gyrB343f	TTCGACCAGAAATCCTAYAAGG	580 bp	Martens <i>et al.</i> (2008)
	gyrB1043r	AGCTTGTCTTSGTCTGCG		

Table S3. Percentage of nucleotide identity between species of the “*R. tropici* group” and between these species and *R. paranaense* sp. nov. at four loci.

Species	Loci				concatenated [†]
	16S rRNA	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	
Between species range [*]	99.3–99.9	100	100	99.3–99.8	99.7–99.9
Between <i>R. paranaense</i> PRF 35 ^T and					
<i>R. calliandrae</i> CCGE 524 ^T	99.6	90.1	93.4	96.4	93.3
<i>R. freirei</i> PRF 81 ^T	99.1	88.0	91.6	95.8	91.9
<i>R. hainanense</i> CCBAU 57015 ^T	99.2	86.3	93.9	n.d. [‡]	n.d. [‡]
<i>R. jaguaris</i> CCGE 525 ^T	99.8	91.3	94.4	98.4	94.8
<i>R. leucaenae</i> CFN 299 ^T	99.2	94.2	96.5	98.3	96.4
<i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T	99.5	89.4	91.6	97.4	93.0
<i>R. mayense</i> CCGE 526 ^T	99.7	90.2	93.1	98.6	94.2
<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	99.3	87.5	91.6	96.3	91.9
<i>R. multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T	99.2	85.6	94.2	97.1	92.1
<i>R. rhizogenes</i> [§]	99.5	88.0	93.4	97.3	92.9
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	99.1	85.7	92.3	97.4	91.9

Sequence alignments length were 1333, 577, 389 and 600 bp for 16S rRNA, *gyrB*, *recA* and *rpoA*, respectively. * *R. paranaense*, strains PRF 35^T, PRF 54, CPAO 1135 and H 52.

[†] concatenate of *gyrB*, *recA* and *rpoA* gene sequences.

[‡] not determined.

[§] *R. rhizogenes* strain ATCC 11325^T for the 16S rRNA and K84 for the MLSA

Table S4. DNA-DNA hybridization (DDH) between *R. paranaense* PRF 35^T and related type strains.

Strain	DDH (%)
<i>R. paranaense</i> PRF 35 ^T	100 ± 12.1*
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	21 ± 11.5
<i>R. leucaenae</i> CFN 299 ^T	47 ± 3.3
<i>R. freirei</i> PRF 81 ^T	33 ± 2.2
<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	19 ± 1.6
<i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T	25 ± 2.2
<i>R. hainanense</i> CCBAU 57015 ^T	14 ± 0.9
<i>R. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	29 ± 3.0
<i>R. mayense</i> CCGE 526 ^T	42 ± 8.1
<i>R. multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T	20 ± 1.9
<i>R. jaguaris</i> CCGE 525 ^T	49 ± 6.0
<i>R. calliandrae</i> CCGE 524 ^T	22 ± 2.1

* Values ± Standard error for the means of two experiments

D-Melezitose	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	w	w	w	w	w	w	-	w
Glycogen	+	-	-	-	-	-	+	+
Xylitol	w	-	-	+	w	w	w	w
Gentiobiose	+	w	w	w	w	w	w	w
D-Turanose	w	w	w	+	w	w	w	w
D-Lyxose	+	+	+	+	w	+	w	w
D-Tagatose	-	w	-	-	w	-	-	w
D-Fucose	+	+	+	+	+	+	-	+
L-Fucose	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Arabitol	+	+	+	+	w	+	-	w
L-Arabitol	-	-	w	w	-	-	-	+

* +, growth, -, no growth; w, weak growth*; growth was considered weak when O.D. was between 20 and 59% of the full growth in liquid medium, or with the light green color in the API 50CH kit

Table S6. Fatty acid profile of *Rhizobium paranaense* PRF 35^T and type strains of seven related species of the “*Rhizobium tropici* group” grown for 5 d at 28°C on yeast extract-mannitol agar plates.

Data obtained with the MIDI system using FAME library TSBA6.

Strains: 1, *R. paranaense* PRF 35^T; 2, *R. paranaense* PRF 54; 3 *R. paranaense* CPAO 1135; 4 *R. paranaense* H 52; 5, *R. leucaenae*; 6, *R. tropici*; 7, *R. lusitanum*; 8, *R. multihospitium*; 9, *R. miluonense*; 10, *R. rhizogenes*; 11, *R. hainanense*; 12, *R. calliandrae*; 13, *R. jaguaris*; 14, *R. mayense*; 15, *R. freirei*.

Fatty acid	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
C13:1 AT 12 13													0.34	0.4	
iso-C15:0 3-OH ^C		5.72	5.77	5.57		4.03	5.60	3.86	3.79			13.63	7.55	6.63	3.07
C16:0	9.73	8.56	9.36	9.25	8.42	5.37	6.97	4.49	6.84	14.15	15.99	7.21	6.08	6.81	5.26
C16:0 3-OH	5.78	6.10	5.75	6.18		4.39	5.79	5.39	4.63			7.48	4.25	4.06	4.13
iso-C17:0						0.61		0.68				1.06	0.77	0.85	
C17:0 3-OH ^C								0.55				1.16	0.78	0.66	
C18:0						3.67	3.40	1.58	1.83			3.12	6.23	8.56	3.92
C18:0 3-OH						2.33	2.91	2.39	2.20			3.81	0.68	0.64	2.26
C18:1 2-OH						1.15	2.29	2.81	2.27			5.97	0.41		3.95
C _{18:1} ^ω _{7c11} -methyl						0.98									
C19:0 cycle ω8c	18.43	15.04	12.46	16.15	26.53	30.07	24.24	23.18	18.73	22.87	13.12	7.37	8.46	12.07	9.30
C20:2 ω6,9c						0.72									
Unknown ECL 11.543												0.61	0.25	0.29	
Summed Features															
2*						3.13	2.92	3.99	2.78	8.05	7.77	6.31	2.66	2.33	3.59
3 [^]									0.72				0.51	0.47	
8 [‡]	59.72	64.58	66.66	62.85	65.05	43.11	45.88	50.64	55.70	54.92	63.13	42.28	61.03	56.22	64.52

*Summed Feature 2 = C14:0 3-OH/iso-C16:1

I. [^]Summed Feature 3 = C16:1 ω7c/16:1 ω6c

‡Summed Feature 8 = C18:1ω7c/ω9t/ω12t

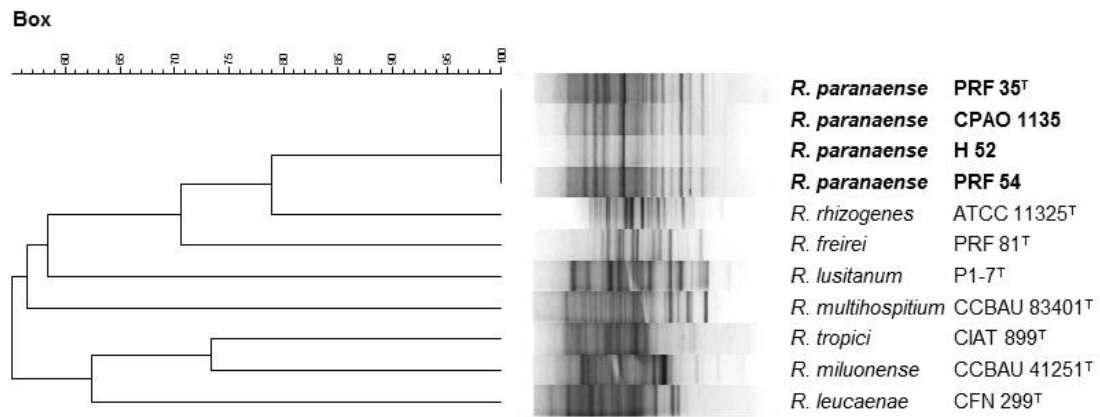


Fig. S1. Dendrogram based on cluster analysis of BOX-A1R-PCR products using the Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) algorithm and the Jaccard coefficient at 1% tolerance of *R. paranaense* sp. nov. and strains belonging to the “*R. tropici* group”. Clusters were obtained with Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 4.6).

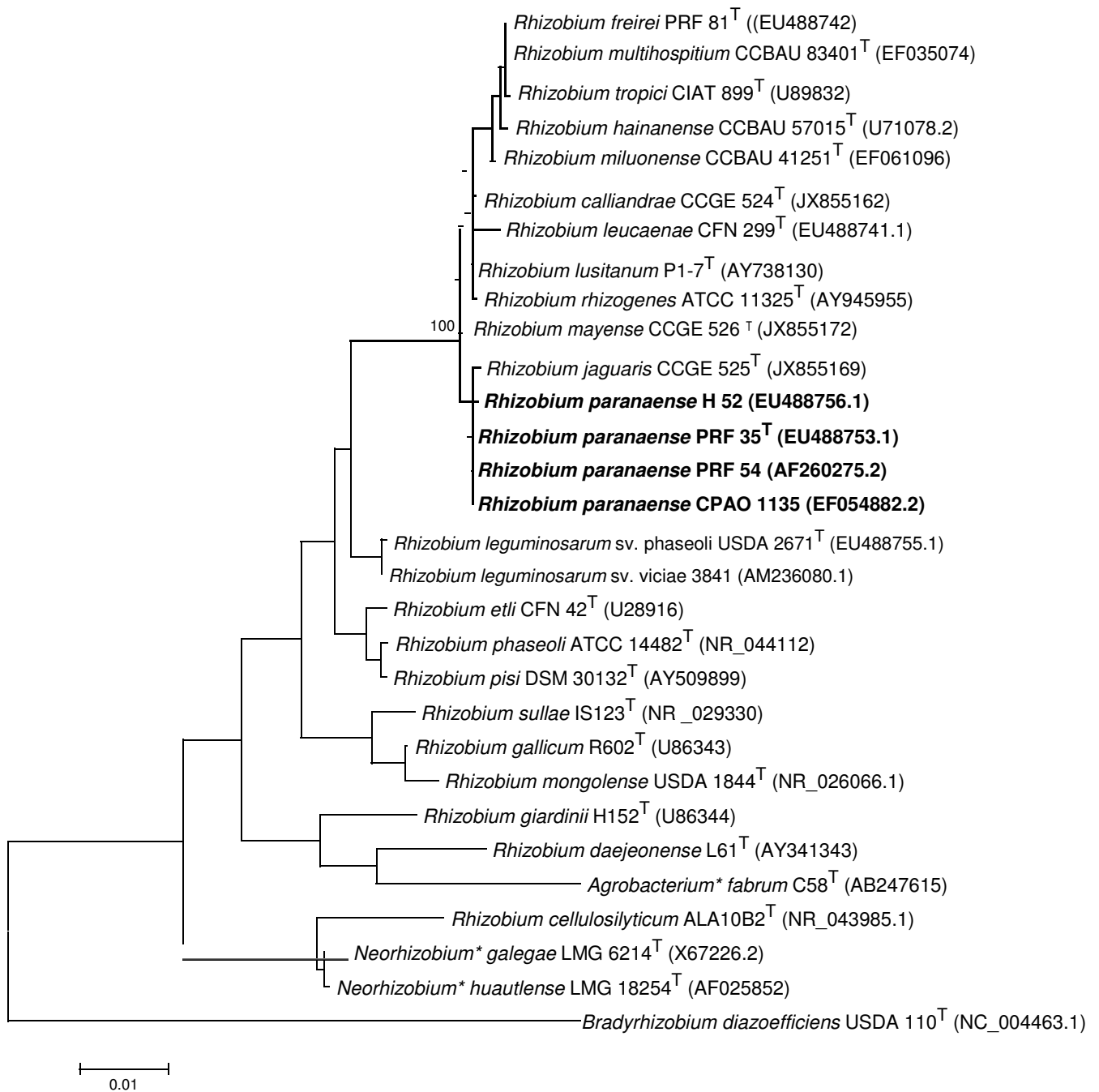


Fig. S2. Neighbor joining 16S rRNA phylogeny based on gene sequences from *R. paranaense* sp. nov. and other *Rhizobium* species. Bootstrap support values based on 1,000 resamplings are shown at nodes only when they were $\geq 70\%$. Bar value indicates percentage of nucleotide substitutions. [*According to the recent proposal by Mousavi *et al.* (2014), *R. galegae* and *R. huautlense* should be reclassified in the new genus *Neorhizobium* and some species should return to the genus *Agrobacterium*].

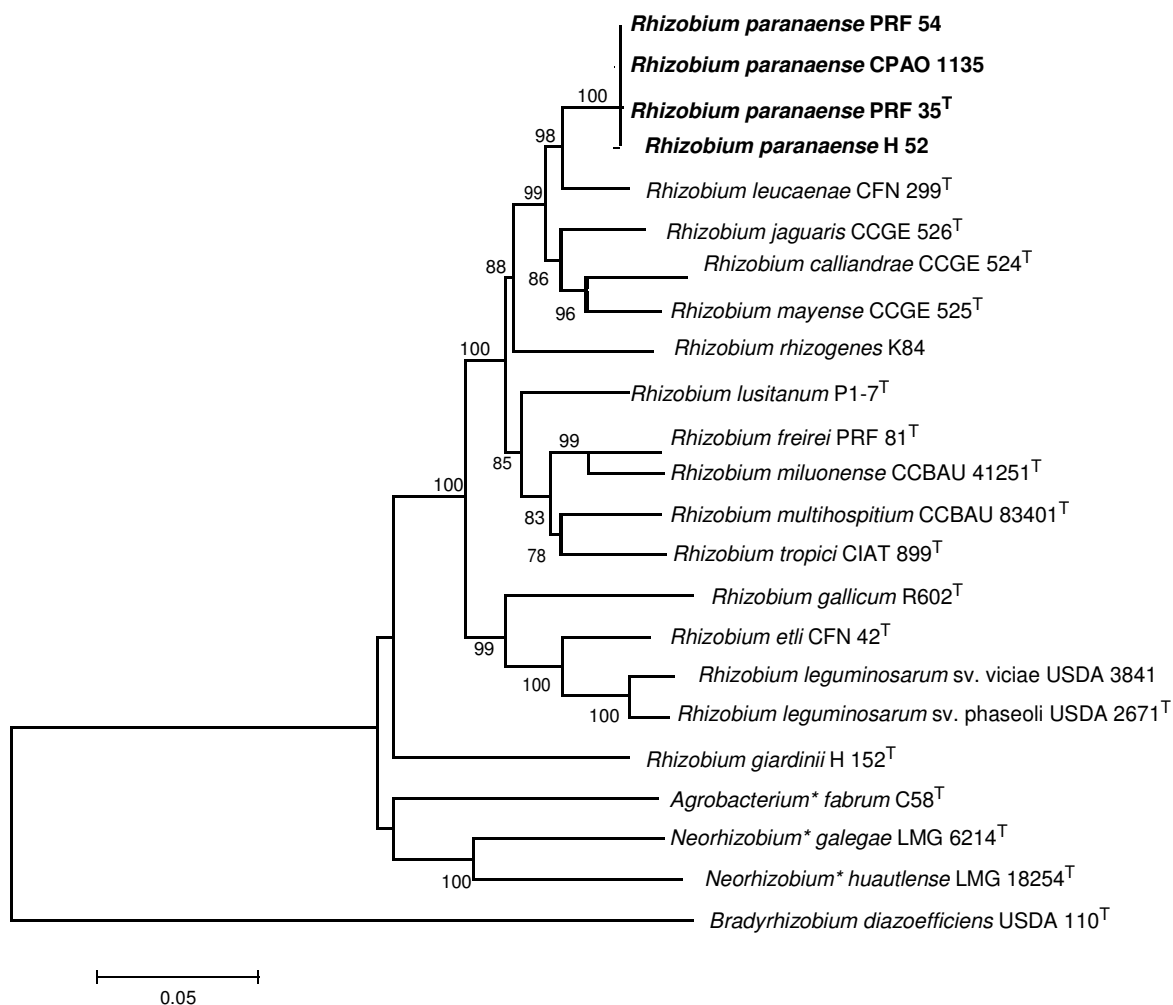


Fig. S3. Neighbor joining phylogeny based on concatenated alignment of *gyrB*, *recA* and *rpoA* gene sequences from *R. paranaense* sp. nov. and closely related *Rhizobium* species. Bootstrap support values based on 1,000 resamplings are shown at nodes only when they were $\geq 70\%$. Bar value indicates percentage of nucleotide substitutions. (*According to the recent proposal by Mousavi *et al.* (2014), *R. galegae* and *R. hauatlense* should be reclassified in the new genus *Neorhizobium* and some species should return to the genus *Agrobacterium*).

References

- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A. & Young, J. P. (2001).** Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 2037-2048.
- Hungria, M., Andrade, D. S., Chueire, L. M. O., Probanza, A., Guttierrez-Mañero, F. J. & Megías, M. (2000).** Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 1515-1528.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. & Willems, A. (2008).** Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 200-214.
- Menna, P., Hungria, M., Barcellos, F. G., Bangel, E. V., Hess, P. N. & Martinez-Romero, E. (2006).** Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol* **29**, 315-332.
- Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlbert, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P., & Lindström, K. (2014).** Phylogeny of the *Rhizobium*-*Azorhizobium*-*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* **37**, 208-215.
- Pinto, F. G. S., Hungria, M. & Mercante, F. M. (2007).** Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol Biochem* **39**, 1851-1864.
- Ribeiro, R. A., Barcellos, F. G., Thompson, F. L. & Hungria, M. (2009).** Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res Microbiol* **160**, 297-306.

7. ESTUDO 2

DALL'AGNOL, R. F. *et al.* *Paraburkholderia nodosa* is the main N₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian "Cerradão". **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, 2016.
DOI: 10.1093/femsec/fiw108.

RESEARCH ARTICLE

Paraburkholderia nodosa is the main N₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian ‘Cerradao’

Rebeca F. Dall’Agnol^{1,2}, Fabio Plotegher¹, Renata C. Souza^{1,3},
Ieda C. Mendes⁴, Fabio B. dos Reis Junior⁴, Gilles Bena⁵, Lionel Moulin⁵ and
Mariangela Hungria^{1,3}✉

¹Embrapa Soja, Soil Biotechnology Laboratory, C.P. 231, 86001-970, Londrina, PR, Brazil, ²Department of Biochemistry and Biotechnology, Universidade Estadual de Londrina, C.P. 10011, 86057-970, Londrina, PR, Brazil, ³Department of Microbiology, Universidade Federal do Parana, C.P. 19031, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil, ⁴Department of Soil Microbiology, Embrapa Cerrados, C.P. 08223, 73301-970, Planaltina, DF, Brazil and ⁵IRD, Cirad, University of Montpellier, Interactions Plantes Microorganismes Environnement (IPME), 34394 Montpellier, France

✉ **Corresponding author:** Embrapa Soja, Laboratory of Soil Biotechnology, C.P. 231, 86001-970, Londrina, Parana, Brazil. Tel: (+55)4333716206; Fax: (+55)4333716100; E-mail: mariangela.hungria@embrapa.br

One sentence summary: Study of the diversity of nitrogen-fixing symbionts from a ‘hot spot area’, the Brazilian ‘Cerradao’, reveals that *Paraburkholderia nodosa* is the main symbiont trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).

Editor: Angela Sessitsch

ABSTRACT

The bacterial genus *Burkholderia* comprises species occupying several habitats, including a group of symbionts of leguminous plants—also called beta-rhizobia—that has been recently ascribed to the new genus *Paraburkholderia*. We used common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to trap rhizobia from an undisturbed soil of the Brazilian Cerrado under the vegetation type ‘Cerradao’. Genetic characterization started with the analyses of 181 isolates by BOX-PCR, where the majority revealed unique profiles, indicating high inter- and intra-species diversity. Restriction fragment length polymorphism-PCR of the 16S rRNA of representative strains of the BOX-PCR groups indicated two main clusters, and gene-sequencing analysis identified the minority (27%) as *Rhizobium* and the majority (73%) as *Paraburkholderia*. Phylogenetic analyses of the 16S rRNA and housekeeping (*recA* and *gyrB*) genes positioned all strains of the second cluster in the species *P. nodosa*, and the phylogeny of a symbiotic gene—*nodC*—was in agreement with the conserved genes. All isolates were stable vis-à-vis nodulating common bean, but, in general, with a low capacity for fixing N₂, although some effective strains were identified. The predominance of *P. nodosa* might be associated with the edaphic properties of the Cerrado biome, and might represent an important role in terms of maintenance of the ecosystem, which is characterized by acid soils with high saturation of aluminum and low N₂ content.

Keywords: beta-rhizobia; phylogeny of prokaryotes; biological N₂ fixation; Cerrado

Received: 17 March 2016; Accepted: 13 May 2016

© FEMS 2016. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

INTRODUCTION

Burkholderia is one of the most ubiquitous and numerous bacterial genus, being capable of colonizing a great variety of niches, including aquatic, edaphic, rhizospheric and clinical environments. It encompasses species of human-health concern—such as the *B. cepacia* complex and *B. pseudomallei*—and plant-pathogenic species, whereas others can promote plant growth, degrade xenobiotics and participate in important environmental processes (Coenye and Vandamme 2003; Gyaneshwar *et al.* 2011; Vial *et al.* 2011; Suarez-Moreno *et al.* 2012; Zuleta *et al.* 2014).

Several *Burkholderia* species have been discovered in the last few years, including symbionts of the mimosoid and papilionoid legume families (de Meyer *et al.* 2013; Sheu *et al.* 2013, 2015; Steenkamp *et al.* 2015), as well as environmental species such as *B. ferrariae* and *B. insulsa* (Valverde *et al.* 2006a; Rusch *et al.* 2015), indicating an expanding understanding of the diversity of this genus. However, the great majority of the studies performed so far are of clinical species, with less information about environmental non-pathogenic strains.

In the last few years, an increasing number of studies—based on analyses of 16S-rRNA (Bontemps *et al.* 2010; Gyaneshwar *et al.* 2011) and of other housekeeping genes (Estrada-de Los Santos *et al.* 2013), as well as genomic approaches (Sawana, Ade-olu and Gupta 2014; Zuleta *et al.* 2014)—have indicated clustering of environmental non-pathogenic species in a separate phylogenetic clade. The creation of a new genus comprising non-pathogenic *Burkholderia* could have profound impacts on the use of these bacteria in agriculture and for environmental purposes (Estrada-de los Santos *et al.* 2015). Recently, the proposal of splitting the species into two new genera, *Paraburkholderia* and *Ca-balleronia* has been taxonomically accepted (Oren and Garrity 2015; Dobritsa and Samadpour 2016). The new genera include environmental species, but it is worth mentioning that some are opportunistic human pathogens.

The Brazilian Cerrado is an important savannah biome distributed across 16 states and comprising 24% of the country's territory (Hungria, Vargas and Araujo 1997). It is characterized by poorly fertile, acidic soils with high aluminum saturation (Adamoli *et al.* 1986; Goedert 1989), leading to a very specific vegetation composed of small trees with gnarled branches, irregularly distributed over a gramineous carpet (Vargas and Hungria 1997). With improvement of fertility, the Cerrado's soils have been increasingly used for agriculture and livestock since the 1960s, and they currently contribute almost 50% of the national production of grains and meat (Oliveira 2013).

One typical property of the Cerrado's soils is their low content of nitrogen (N); therefore, biological nitrogen (N₂) fixation is a key component for biome sustainability (Hungria, Vargas and Araujo 1997). However, despite this agronomic importance, studies of microbial diversity of symbiotic diazotrophic bacteria in undisturbed areas of the biome are few. Some information suggest that rhizobial species, such as *Rhizobium tropici* and *Rhizobium leucaenae*, are abundant (Mostasso *et al.* 2002; Pinto, Hungria and Mercante 2007; Ribeiro *et al.* 2012), that bradyrhizobia are symbionts of several native legumes (Menna *et al.* 2006; Fonseca *et al.* 2012), and that *Paraburkholderia* species are the predominant symbionts of *Mimosa* spp. (Bontemps *et al.* 2010; Gyaneshwar *et al.* 2011). To improve our understanding of the diversity of indigenous symbiotic bacteria, we performed a study in an undisturbed area under the vegetation type of 'Cerradao' vegetation type. To trap bacteria, we used common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), a legume known for its high promiscuity in nodulating with a variety of rhizobial species (Velazquez *et al.* 2001;

Valverde *et al.* 2006b; Ribeiro *et al.* 2015). As our preliminary results showed that most strains fall into the *Paraburkholderia* genus, we proceeded with a more detailed molecular characterization of strains in this group.

MATERIALS AND METHODS

Site description

Soil samples were collected at the Ecological Reserves of Em-brapa Cerrados, a preserved area of 700 ha located in Planaltina, Federal District, Brazil (15° 35' 30" S/ 47° 42' 30" W, at 1175 m of altitude), in the heart of the biome Cerrado. The reserve has all vegetation types of this biome, as shown in Table S1 (Supporting Information) and Fig. S1 (Supporting Information). Our collection was obtained from the undisturbed area of 'Cerradao', covering 37 ha.

The 'Cerradao' vegetation type is a forest formation with xeromorphic aspects (dense and thick leaf cuticles and trunk barks that allow water conservation and therefore withstand drought conditions). Several of the 'Cerradao' tree species lose their leaves during the dry season. Despite the forest-like vegetation type, the floristic composition of 'Cerradao' is similar to the Cerrado *sensu stricto*. The tree coverage ranges from 50% to 90%, and the average tree height ranges from 8 to 15 m (Mendes *et al.* 2012). Information about the legume species found in the 'Cerradao' does not include *Mimosa* spp. (Aquino *et al.* 2009), but other legumes capable of nodulating with *Paraburkholderia* as *Dalbergia* and *Machaerium*.

The regional climate is Cwa (according to the Koppen classification), which is a typical savanna climate with a mean annual precipitation of 1500 mm and two well-defined seasons: dry (from May to September) and rainy (from October to April). Maximum and minimum average temperatures are 26.4 °C and 15.9 °C, respectively (Baptista 1998; Mendes *et al.* 2012)

In the native area, soil samples were randomly collected because there was no evidence of lack of uniformity at the sampling site. We considered 50 soil samplings that were randomly collected in the rainy season, from the 0 to 20 cm layer, spatially covering the whole 'Cerradao' area of 37 ha. We collected bulk soil. The soil is classified as a clay loam Dystrophic-Red-Latosol (Brazilian classification) or a Rhodic Haplustox (American classification). Subsamples were homogenized to represent one soil sample. Chemical properties and granulometry were determined according to Hungria *et al.* (2006) and are displayed in Table S2 (Supporting Information).

Isolation of strains

The 'Cerradao' soil was used to fill 50 pots with 2 kg per pot. Common bean (*P. vulgaris* L.) cultivar Perola' (colored seeds) seeds were surface-sterilized as described before (Hungria and Araujo 1994) and two seeds were sown in each of the 50 pots. Plants were grown receiving N-free nutrient solution (Hungria and Araujo 1994) for 30 days and then were harvested. A total of 10 nodules were randomly collected per pot, representing about one-third of the nodules of each plant; internal nodule color ranged from light to dark pink. Nodules were surface-sterilized as described before (Vincent 1970), followed by streaking each nodule on a modified YMA (Yeast-Mannitol-Agar) medium (Vincent 1970; Menna *et al.* 2006). All isolates with confirmed purity were characterized in relation to morpho-physiological properties [colony morphology (form, elevation, borders, surface, consistency, optical details and color), mucus production

and chromogenesis (acid/alkaline reaction) in YMA modified medium with bromothymol blue or Congo red] (Vincent 1970; Hungria and Araujo 1994).

Strains are deposited at the 'Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria Culture Collection of Embrapa Soja' (WFCC Collection No. 1213, WDCM Collection No. 1054). Stock cultures were maintained on YMA at 4° C, while long-term preservation was performed by cryopreservation with 30% glycerol at -80° C and -150° C, and by lyophilization. Routinely, unless otherwise indicated, strains were grown in modified YMA medium at 28° C.

rep-PCR (BOX-A1R) genomic fingerprinting

DNA was extracted with AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep kit (Axygen Biosciences), following the manufacturer's instructions. rep-PCR profiles were obtained after DNA amplification with BOX-A1R primer (Versalovic *et al.* 1994; Koeuth, Versalovic and Lupski 1995; Velazquez *et al.* 2001), proceeding as described before, which included the addition of a molecular marker (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen[®]) on the left, right and in the center of each gel (Fernandes, Fernandes and Hungria 2003; Kaschuk *et al.* 2006a). Primers used and amplification conditions are listed in Table S3 (Supporting Information).

Restriction fragment length polymorphism-PCR of the 16S rRNA region

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses of the 16SrRNA gene were performed as described before (Germano *et al.* 2006; Pinto, Hungria and Mercante 2007). Basically, the 16S DNA gene was amplified with primers fd1 and rD1 (Table S3, Supporting Information) and 6 µL of the PCR product individually digested with 10 U of endonucleases HpaII (5'-CCG-3'; 3'-CGC/C-5'), RsaI (5'-GT/AC-3'; 3'-CA/TG-5') and HaeIII (5'-GG/CG-3'; 3'-CC/GG-5') (Invitrogen) at 37° C for 2 h, and then submitted to electrophoresis on a 3% agarose gel. A molecular marker (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) was always applied on the left, right and center of each gel.

Sequencing of the 16S rRNA, *recA*, *gyrB* and *nodC* genes

For taxonomic characterization, the 16S rRNA and two house-keeping gene markers—*recA* and *gyrB*—were chosen for PCR amplification and gene fragment sequencing. Primers and amplification conditions are shown in Table S3 (Supporting Information). To infer nodulation genes phylogeny, a fragment of *nodC* was also amplified and sequenced, and primers and PCR conditions are listed in Table S3 (Supporting Information).

All PCR products were purified with Purelink kit (Invitrogen), following the manufacturer's instructions and sequenced on an ABI 3500xL (Applied Biosystems[®]) capillary sequencer analyzer.

A total of 58 16S rRNA, 45 *recA*, 45 *gyrB* and 45 *nodC* gene sequences were obtained and deposited at the GenBank database. Accession numbers are given in Table S4 (Supporting Information).

Molecular data analyses

BOX-PCR and RFLP-PCR fingerprints

A dendrogram was built with the BOX-PCR profiles with the software Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 7.0), applying the Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) algorithm and Jaccard coefficient with 3% of tolerance.

For the RFLP-PCR profiles, the analyses were performed using the Bionumerics software with the parameters as the BOX-PCR, first with each restriction enzyme and then with the combined profiles obtained with all restriction enzymes, as described before (Germano *et al.* 2006; Pinto, Hungria and Mercante 2007).

Phylogenetic analyses

Sequences were corrected with Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 7.0). The DNA sequence alignment and the phylogenetic trees were constructed with MEGA (Tokyo, Hachiya, Japan) software version 6.0 (Tamura *et al.* 2013), using maximum likelihood (ML) algorithm (Felsenstein 1981), Tamura-Nei Model (Tamura and Nei 1993) and a statistical support of 1000 re-samplings (Felsenstein 1985; Hedges 1992). For the Multi-locus sequencing analysis (MLSA), multiple alignments were performed for each gene and a common fragment for all strains was obtained; the size of each fragment is shown in Table S3 (Supporting Information). After, that, genes were concatenated and analyzed with the same parameters. Nucleotide sequence identity was calculated with Bioedit v. 7.2.5 (Carlsbad, California, USA).

Nodulation and biological nitrogen fixation efficiency

Representative strains identified as belonging to the genus *Paraburkholderia* were selected to represent the main groups found in the phylogeny analysis, based on their *recA* and *gyrB* phylogenies and tested for their ability to nodulate and fix N₂ with common bean. The experiment consisted of 10 treatments, comprising 2 controls (non-inoculated with and without N-fertilizer, with the application of 30 mg of N plant⁻¹ week⁻¹); 2 elite strains used in commercial inoculants for the common bean crop in Brazil [*R. tropici* CIAT 899 (=SEMIA 4077) and *R. freirei* PRF 81 (=SEMIA 4080)] and 6 representative *Paraburkholderia* isolates representing the main groups of *Paraburkholderia* identified in the phylogeny. Strains were grown in YMA medium and concentration adjusted to 10⁹ cells mL⁻¹.

Common bean seeds of cultivar Perola' (colored seeds) were surface-sterilized as described in item 2.2 and transferred to modified Leonard Jars (Vincent 1970) containing sterile substrate, consisting of mixture of sand and pulverized coal (1:1, v/v). Four seeds were sown per jar, and each received 0.5 mL of inoculum with adjusted concentration. Plants were thinned to two seedlings per jar six days after emergence. The experiment was conducted with a completely randomized block design with three replicates. The experiment was performed under greenhouse conditions, with 28°–30° C day/23°–25° C night, for 30 days and plants received sterile N-free nutrient solution (Hungria and Araujo 1994) every week.

Plants were harvested 30 days after emergence, roots and shoots were split and nodules were harvested from roots. Shoots and nodules dry weights were obtained after drying at 65° C until constant weight (~72 h). Nodules were counted and total N was determined by Kjeldahl's digestion method followed by the indophenol-blue colorimetric assay (Feije and Anger 1972).

RESULTS

BOX-PCR profiles of isolates from the 'Cerradao'

A total of 181 isolates were obtained and their purity and stable morpho-physiological properties were confirmed after three consecutive replicates (data not shown). Their DNAs were successfully amplified with the BOX-A1R primer and the

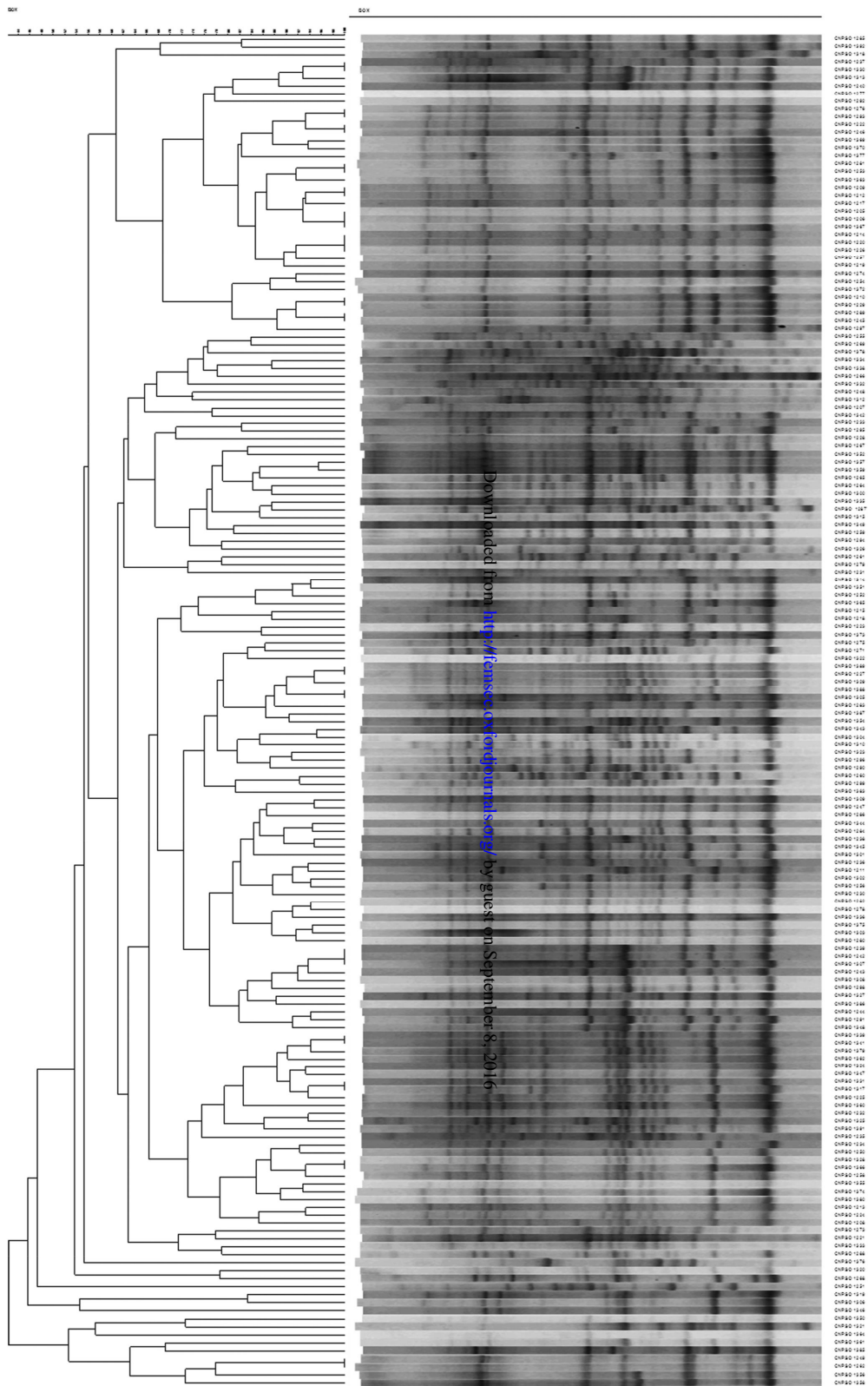


Figure 1. BOX-PCR profiles of 181 isolates trapped by common bean from an undisturbed Brazilian ‘Cerradao’ soil. Dendrograms built with the Bionumerics software using the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient with 3% of tolerance.

results obtained indicated a very high level of genetic diversity (Fig. 1). Considering a cut-off value of 70% similarity to delineate the BOX-PCR groups, as suggested in previous studies (Co-enye et al. 2002; Grange and Hungria 2004; Kaschuk et al. 2006a,b; Menna et al. 2009), almost 100 different profiles were observed. The dendrogram obtained indicates several major clusters, in addition to some isolates occupying isolated positions, and all strains were joined at a very low final level of similarity, of 42% (Fig. 1).

RFLP-PCR analysis of 16S rRNA region

From the BOX-PCR dendrogram, 84 representative isolates were selected and submitted to the RFLP-PCR analysis of the 16S rRNA region with three endonucleases. The patterns obtained are shown in Fig. 2, and the combined analysis with the results obtained with the three enzymes indicated two major groups. The smaller group included 19 isolates distributed in two main subgroups that included 9 (G.R1) and 8 (G.R2) isolates, and 2 isolates joined the subgroups, all clustered at a final level of similarity of 40%. The larger cluster was composed by 65 isolates distributed in six subgroups, with high similarity among the isolates within each subgroup, and joined at a final level of similarity of 80% (Fig. 2).

Sequencing analysis of the 16S rRNA of the 'Cerradao' isolates

Rhizobium isolates

From the results obtained with the RFLP-PCR analysis, a new set of 62 representative isolates was chosen to proceed with the sequence analysis of the 16S rRNA gene. Sequencing analysis identified that 13 isolates belonged to the genus *Rhizobium*, 45 to the *Paraburkholderia* and 5 to endophytes that were not included in the subsequent analyses. From this identification, the isolates were named as strains.

Phylogeny was built separately for the alpha and beta-rhizobia. The 16S rRNA phylogeny of the *Rhizobium* strains showed that five sequences clustered with *R. pusense*, five with *R. miluonense* and one with *R. leucaenae*, while strain CNPSO 1251 occupied an isolated position, possibly indicating a new species; the position of CNPSO 1318 was not well defined (Fig. S4, Supporting Information).

With the taxonomic definition of the genus for each strain, the results of BOX-PCR and RFLP-PCR were re-analyzed. The position of the *Rhizobium* strains in the smaller group in the RFLP-PCR dendrogram was confirmed (Fig. 2). In the BOX-PCR dendrogram, each *Rhizobium* strain showed a unique profile, and they were grouped at a final level of similarity of 50% (Fig. S2, Supporting Information). The two strains that were not grouped with known species in the 16S rRNA sequencing analysis, CNPSO 1251 and CNPSO 1318 (Fig. S4, Supporting Information) showed the most distinct BOX-PCR (Fig. S2, Supporting Information) and RFLP (Fig. 2) profiles.

Paraburkholderia isolates

About two-third of the strains were classified as *Paraburkholderia* in the sequencing analysis of the 16S rRNA gene, and they all fit into the *P. nodosa* group (Fig. 3), showing 98.4%–98.7% of nucleotide identity with the *P. nodosa* type strain (Table 1). Although some intra-species diversity in the 16S rRNA genes was observed, in general the strains showed high similarity, and CNPSO 1376 was the most divergent one (Fig. 3).

We have also re-analyzed the BOX-PCR and RFLP-PCR profiles of the strains classified as *Paraburkholderia*. They all fit into the great group of the RFLP-PCR (Fig. 2). A new analysis of BOX-PCR profiles considering exclusively the *Paraburkholderia* strains confirmed a remarkable intra-specific diversity, with none of the strains showing identical profiles and with several groups sharing <70% similarity among each other (Fig. S3, Supporting Information).

MLSA of the *Paraburkholderia* strains

As the *Paraburkholderia* represented the most abundant symbionts of the 'Cerradao' trapped by common bean, we proceeded with a deeper characterization of this group of strains. Two housekeeping genes were sequenced and analyzed, *recA* (Fig. S5, Supporting Information) and *gyrB* (Fig. S6, Supporting Information). The group of the Brazilian strains showed 55% bootstrap support for the *recA* gene (85%, if we do not include strains CNPSO 1385 and CNPSO 1376) and 92% for the *gyrB* gene (Figs S5 and S6, Supporting Information) and from 99.5% to 100% (*recA*) 97.3% to 100% (*gyrB*) of nucleotide identity among the strains from our study, and from 98.3% to 98.5% (*recA*) 96.8% to 97.3% (*gyrB*) between our strains and the type strain of *P. nodosa* (Table 1).

A concatenated phylogenetic tree with *recA* and *gyrB* genes was built and resulted in four subclusters; again, CNPSO 1376 occupied an isolated position (Fig. 4). The similarity of the strains was higher with the *P. nodosa* type strain, and a larger cluster included *P. silvatlantica*, *P. mimosarum* and *P. sacchari*. Nucleotide identity between the strains from the 'Cerradao' and the type strain of *P. nodosa* were in the range of 97.4%–97.6% (Table 1).

nodC phylogeny of *Paraburkholderia* strains

The *Paraburkholderia* isolates from the 'Cerradao' also showed high similarity of the *nodC* gene with *P. nodosa* (Fig. 5). It is worth mentioning that *P. silvatlantica* was not included in the analysis because it carries no *nodC* and it does not nodulate. The *nodC* sequence of *P. nodosa* type strain was not available, but we used as comparison strain BR 3470, that belongs to the same species and was isolated from *Mimosa bimucronata* (Chen et al. 2007). Nucleotide identity ranged from 94.6% to 100% among our strains and from 93.0% to 100% in the comparison with *P. nodosa* BR 3470; the lowest value (93.0%) referred to CNPSO 1376 strain (Table 1).

Nodulation and nitrogen fixation capacity of *Paraburkholderia* from the 'Cerradao'

Strains were tested for the ability to nodulate effectively *M. cae-salpinifolia*, and all strains classified as *Paraburkholderia* were positive, while the *Rhizobium* strains were not.

Strains of *Paraburkholderia* from the 'Cerradao' were then verified for their capacity of nodulating and fixing N₂ with common bean, and compared to elite *Rhizobium* strains used as commercial inoculants for this legume in Brazil. First, *Paraburkholderia* strains were evaluated to confirm their ability of nodulating common bean, but the majority was either non-effective or showed lower effectiveness in fixing N₂ (data not shown). However, two of them—CNPSO 1258 and CNPSO 1294—exhibited shoot dry weight and N concentration in shoots similar to *R. freirei* PRF 81, while CNPSO 1341 showed low shoot dry weight but high concentration of N in shoots (Table 2). When compared with *R. freirei* PRF 81, strains CNPSO 1258 and CNPSO 1341 showed high total N accumulated in shoots.

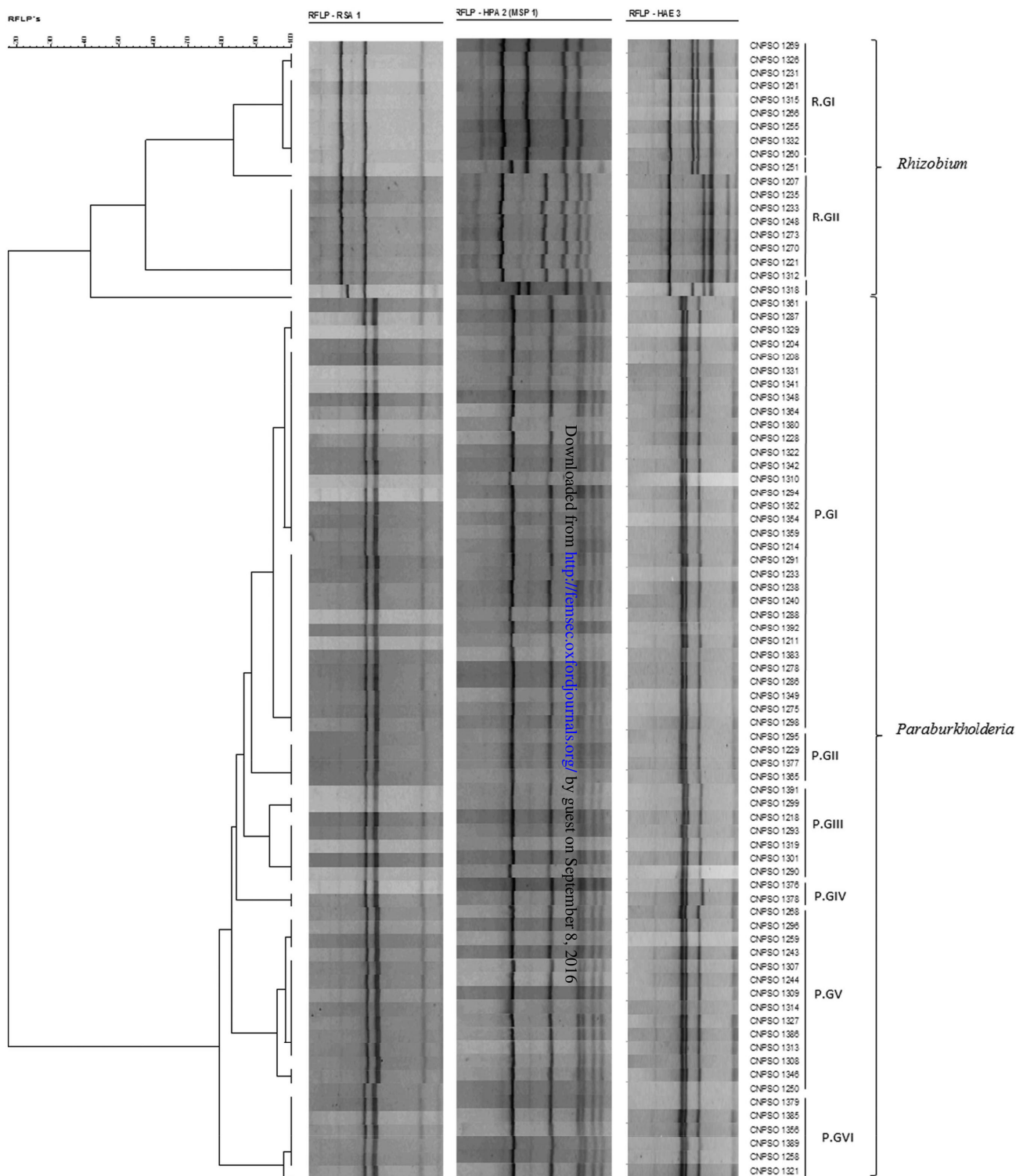


Figure 2. Polyphasic cluster analysis of the PCR products of isolates trapped by common bean from a "Cerradao" soil by RFLP of the 16S rRNA region digested with three restriction enzymes. Dendrogram built with the Bionumerics software with the UPGMA algorithm, and 3% of tolerance. RGI and RGII = *Rhizobium* Group I and II; PGI, PGII, PGIII, PGIV, PGV and PGVI = *Paraburkholderia* Group I–VI.

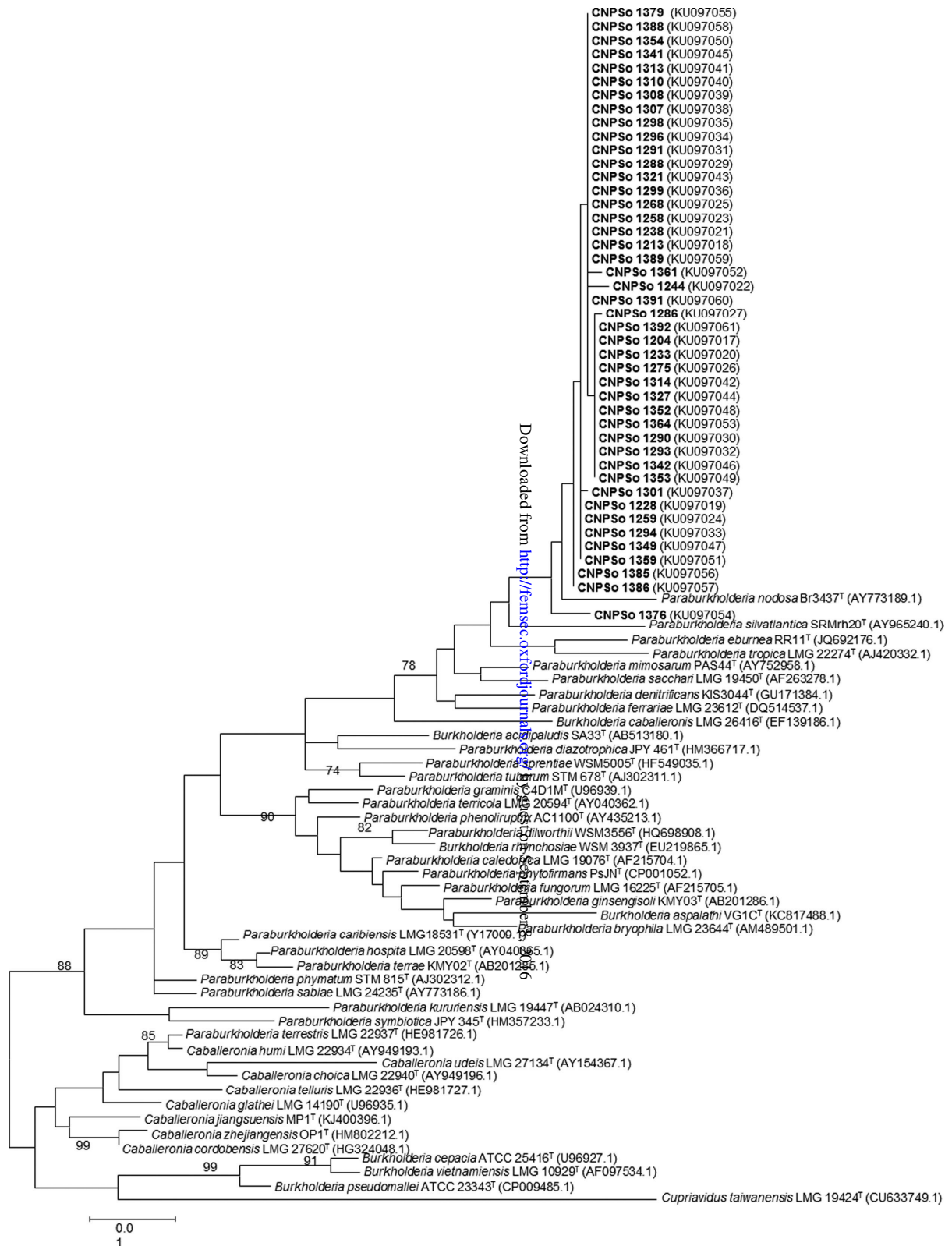


Figure 3. Phylogenetic tree of 16S rDNA gene based on a 1259 bp alignment of *Paraburkholderia* strains trapped by common bean from a “Cerradao” soil and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the ML statistical method with Tamura Nei model and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions.

Table 1. Nucleotide identity among and between strains trapped by common bean from a ‘Cerradao’ soil and *Paraburkholderia nodosa* type strain BR 3437^T.

Gene	Nucleotide sequence identity	
	Among strains	Between strains and <i>P. nodosa</i>
16SrRNA	98.9%–100%	98.4%–98.7%
<i>gyrB</i>	97.3%–100%	96.8%–97.3%
<i>recA</i>	99.5%–100%	98.3%–98.5%
Concatenated	99.1%–100%	97.4%–97.6%
<i>nodC</i>	94.6%–100%	93.0%–100%

DISCUSSION

Common bean is a promiscuous legume and, as such, its capacity of establishing root-nodule symbioses with different rhizobial species has been reported in several studies (Michiels *et al.* 1998; Grange and Hungria 2004; Alberton, Kaschuk and Hungria 2006; Kaschuk *et al.* 2006b; Ribeiro *et al.* 2009, 2015; Oliveira *et al.* 2011; Cardoso, Hungria and Andrade 2012) as one of the most suitable plants to trap rhizobia for diversity studies. Michiels *et al.* (1998) stated that the ability of common bean to accept a variety of symbionts might be due to a capacity to recognize many molecular signals (Nod factors). Recently, del Cerro *et al.* (2015a,b) suggested that contributions both from the bacteria, in producing a variety of Nod factors, and from the host plant in perceiving diverse sets of these molecules explain the common bean-rhizobia promiscuity. In our study, with common bean, we were able to trap 181 rhizobia from an undisturbed area of 37 ha, under the vegetation type of ‘Cerradao’, in the Brazilian Cerradao, and we found that *Rhizobium* spp. represented a small proportion of the strains, whereas the majority fit into the genus

Paraburkholderia.

Rhizobium encompasses several species and strains of high agronomic importance—such as *R. tropici* CIAT 899 and *R. freirei* PRF 81, which are currently and successfully used as inoculants for application to common bean crops in Brazil—in addition to many others carrying important biotechnological properties. Several rhizobial symbionts of common bean have been described, including those that form both effective (*R. leguminosarum* sv. *phaseoli*, *R. phaseoli*, *R. tropici*, *R. etli*, *R. leucaenae*, *R. giardinii* sv. *phaseoli*, *R. gallicum*, *R. lusitanum*, *R. pisi*, *R. freirei*, *R. mesoamericanum*, *R. paranaense*, *R. ecuadorensis*) and ineffective (*R. giardinii* sv. *giardinii*, *R. miluonense*) symbioses (Ribeiro *et al.* 2015). The preliminary resulted 16S-rRNA analysis of 12 *Rhizobium* strains isolated from the ‘Cerradao’ indicated 5 different strains that deserve further investigation, with an emphasis on CNPSo 1251, which might represent a new species. Therefore, our results highlight both the intriguing promiscuity of common bean and the diversity of microsymbionts of this legume.

As *Paraburkholderia* was the main genus found in our survey, we focused on these beta-rhizobia, which also represent another expanding group of symbionts of interest to microbiologists, because of their ecological importance and biotechnological properties. *Burkholderia* has been known as a versatile genus, being adaptable to multiple environments and representing an important component of soil microbial communities (Dal-mastri *et al.* 1999). Many new species of this genus have been described or reclassified in recent years; in addition, two new genera encompassing environmental species—*Paraburkholderia* and *Caballeronia*—have been created (Sawana, Adeolu and Gupta 2014; Oren and Garrity 2015; Dobritsa and Samadpour 2016).

Nevertheless, information about their ecology, distribution and function is still required.

Despite the biotechnological advances that may be achieved with the accommodation of environmental strains in the gen-era *Paraburkholderia* and *Caballeronia* (Sawana, Adeolu and Gupta 2014; Oren and Garrity 2015; Dobritsa and Samadpour 2016), concerns continue over the possibility of these strains carrying pathogenic genes. Indeed, studies show that some N₂-fixing species can act as opportunistic pathogens, such as *P. vietnamiensis* (Mahenthalingam, Baldwin and Dowson 2008). However, other studies report differences in the virulence of clinical and environmental species of *Burkholderia*. Angus *et al.* (2014) used bioinformatics tools to search for virulence determinants in many representative species of mammalian and plant pathogens, opportunistic pathogens, environmental and legume-nodulating

Burkholderia and *Paraburkholderia*. They found that the proteins responsible for virulence in the pathogenic group (T3SS-3 and T6SS-5 proteins, connected to the type-3 and type-4 secretion system, respectively) were absent in most environmental species. Moreover, inoculation of *Caenorhabditis elegans* confirmed that the symbiotic species were unable to cause pathogenicity in this nematode, and were sensitive to most of the antibiotics tested (Angus *et al.* 2014). In another study, Chen *et al.* (2014) verified that environmental *Burkholderia* (now re-classified as *Paraburkholderia*) carrying pathogenic proteins were lacking the *bsaN* gene, required for cell invasion.

The N₂-fixing group of *Paraburkholderia* species is particularly interesting, for their potential applications in agriculture. Diazotrophic *Paraburkholderia* include strains with both free-living (e.g. *P. tropica* and *P. unamae*) (Caballero-Mellado *et al.* 2004; Reis *et al.* 2004) and symbiotic (e.g. *P. mimosarum* and *P. nodosa*) (Chen *et al.* 2006, 2007) styles, some of them with both styles, as *P. tuberum*, *P. phymatum*, *P. caballeronis*.

In our study, based on the analysis of the 16S rRNA, *recA* and *gyrB* genes, we demonstrated that in an undisturbed ‘Cerradao’ soil, *P. nodosa* was the predominant species when common bean was used as trapping host. According to Konstantinidis, Ramette and Tiedje (2006), a percentage of nucleotide identity higher than 94% in single housekeeping gene phylogenies and higher than 96% in concatenated phylogenies indicates that the strains belong to the same species, and the strains from our study fit within *P. nodosa*.

The *Paraburkholderia* strains isolated in our study were also capable of nodulating *M. caesalpinifolia*. Interestingly, the relationship between *Mimosa* and common bean microsymbionts has been noted in another center of *Mimosa* diversity, central Mexico, which also happens to be a center of *Phaseolus* diversity. However, in the case of Mexico, the symbionts of both legume genera are mainly alphaproteobacteria (Bontemps *et al.* 2016), whereas in the undisturbed ‘Cerradao’, they were *Paraburkholderia*. *Paraburkholderia nodosa* has also been isolated from other *Mimosa* species, such as *M. scabrella* and *M. bimucronata* (Chen *et al.* 2005).

Our results confirm previous surveys carried out in the Cerradao biome by Bontemps *et al.* (2010) and dos Reis Jr *et al.* (2010) with isolates trapped by *Mimosa* spp. In these studies, *P. nodosa* and *P. tuberum* were the predominant species; *P. nodosa* was found at altitudes above 800 m. Mishra *et al.* (2012) analyzed several soil properties, including pH, texture, and phosphate and CaCO₃ contents, and verified that these parameters contributed to the predominance of *P. tuberum* nodulating *M. pudica* in French Guiana. Other studies suggested that soil properties such as pH, and geographic conditions such as altitude contribute to the predominance of *Burkholderia/Paraburkholderia*

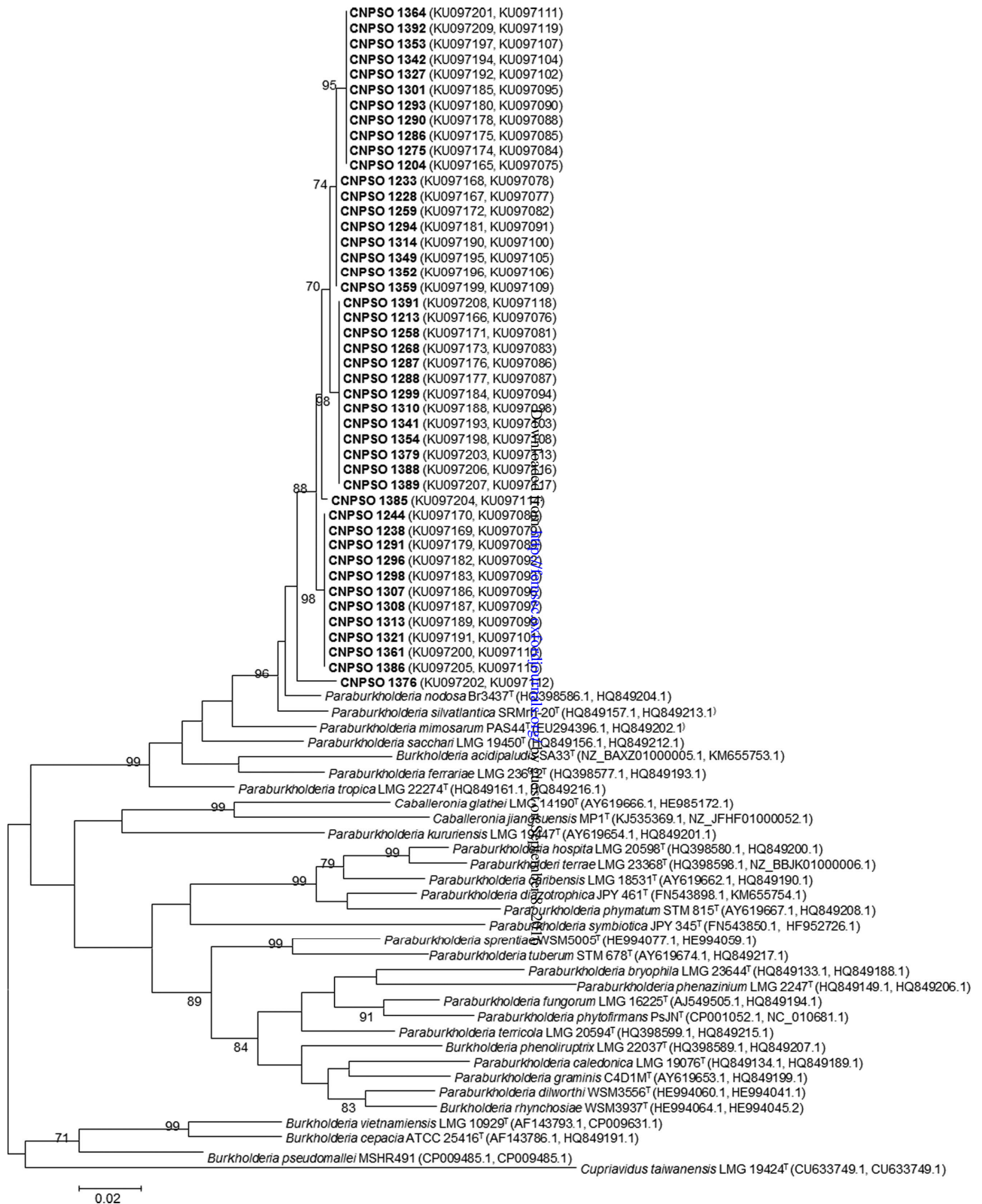


Figure 4. Concatenated phylogenetic tree of *recA* and *gyrB* genes, based on 1000 bp alignment of *Paraburkholderia* strains trapped by common bean from a Cerradao^o soil and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the ML statistical method with Tamura Nei model and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when ≥70%. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions.

Table 2. Comparison of nodulation and N₂-fixation capacity of *Paraburkholderia* strains trapped with common bean in a 'Cerradao' soil in this study and two *Rhizobium* elite strain used in commercial inoculants in Brazil.

CNPSo	Number of nodules (n° plant ⁻¹)	Nodule dry weight (mg plant ⁻¹)	Shoot dry weight (g plant ⁻¹)	Nitrogen concentration (g kg ⁻¹)	Total nitrogen (g kg ⁻¹)
1258	365 ± 140 [⊠]	500 ± 70	2.04 ± 0.32	50.8 ± 2.55	104.29 ± 21.33
1294	478 ± 71	428 ± 107	1.39 ± 0.39	52.9 ± 0.85	37.56 ± 4.67
1307	332 ± 70	187 ± 10	0.72 ± 0.01	12.5 ± 0.85	8.98 ± 2.11
1309	299 ± 25	179 ± 50	0.66 ± 0.26	15.9 ± 1.98	33.12 ± 1.71
1322	235 ± 47	157 ± 49	0.76 ± 0.04	17.5 ± 0.50	18.31 ± 0.44
1341	447 ± 62	310 ± 50	0.94 ± 0.06	40.0 ± 7.64	117.03 ± 19.77
<i>R. freirei</i> PRF 81 ^T	222 ± 71	374 ± 50	1.78 ± 0.02	42.4 ± 10.11	75.88 ± 18.95
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	249 ± 86.3	740 ± 225	6.59 ± 1.22	38.7 ± 2.12	253.74 ± 33.09
Control +N	0	0	3.775 ± 0.813	20.5 ± 0.707	77.28 ± 14
Control -N	0	0	0.62 ± 0.099	13.15 ± 0.45	8.15 ± 0.99

[⊠] Values indicate the average between replicates and standard deviation.

(Elliott et al. 2009; Garau et al. 2009; Bontemps et al. 2010; dos Reis Jr et al. 2010; Liu et al. 2012, 2014; Mishra et al. 2012; Lemaire et al. 2015). Accordingly, we might conclude that soil properties such as low pH, high concentrations of Al and low fertility (Table 2), as well as geographic conditions such as high altitude (1175 m) contributed to the predominance of *P. nodosa* in our study. In relation to soil pH, it is also worth mentioning that Stopnisek et al. (2014) emphasized that *Burkholderia/Paraburkholderia* might not have an actual preference for acidic conditions, but rather be tolerant of them. Interestingly, still in Brazil, at Campos do Jordao, in a biome transitional between the Atlantic and the Araucaria Forests, with subzero temperatures during winter months (contrary to the Cerrados), and high altitudes (1628 m), *Paraburkholderia* spp. was also the pre-dominant symbiont of *Mimosa* spp. (Lammel et al. 2015). In contrast, Gehlot et al. (2013) have shown that an Indian *Mimosa* sp. (*M. himalayana*) nodulates with *Sinorhizobium* in Cerrado soils, a genus that we have not found in our study; however, the soils used in their study were disturbed and received lime (information not included in the paper), which certainly would affect the rhizobial population. In conclusion, we think that it is simplistic to attribute the predominance of one species to a few edapho-climatic properties, as an intricate mixture of biotic and abiotic properties compose each biome.

In relation to other legume hosts of *P. nodosa*, in Mata Atlântica (Brazilian Atlantic Forest), another important Brazilian biome, *P. nodosa* also appears as one of the main rhizobial species, along with *P. sabiae* (Bournaud et al. 2013), in species comprising the 'Piptadenia group'. Our *P. nodosa* strains were trapped by *P. vulgaris*, tribe Phaseoleae. Similarly, *P. phymatum* (Talbi et al. 2010, 2013) and *P. tuberum* (Elliott et al. 2007) have been reported to nodulate common bean in other studies. Indeed, *Paraburkholderia* are common symbionts of legumes in the tribe Phaseoleae that are native to South Africa (Garau et al. 2009; Liu et al. 2014; Lemaire et al. 2015), but with rare reports from South America.

Although *P. nodosa* was the predominant species in our study, we detected a remarkably high intra-diversity. By analyzing BOX elements, we found that each isolate showed a unique profile. Furthermore, within the *P. nodosa* cluster, some strains showed variability in the housekeeping phylogenies, e.g. strain CNPSo 1376.

The *nodC* phylogeny of *Paraburkholderia* from our study was congruent with the phylogenies of the 16S-rRNA and house-keeping genes, suggesting co-evolution. The diversity of *nodC*

genes was low, grouping all isolates in the same cluster with 93% bootstrap and 94.6%–100% nucleotide identity, with the lowest value attributed to strain CNPSo 1376. Indeed, according to Bontemps et al. (2010), nodulation is an ancient and stable trait among *Burkholderia/Paraburkholderia* lineages and the diversity found in symbiotic genes among beta-rhizobia strains is lower than those found in well-established groups of alpha-rhizobia.

Although the great majority of the *Paraburkholderia* strains from our study maintained the capacity to nodulate common bean, the N₂-fixation capacity was low. However, some strains, such as CNPSo 1258 and CNPSo 1341, were as efficient as one *Rhizobium* strain used as a commercial inoculant in Brazil. In relation to the other strains with low capacity for N₂-fixation, it is important to consider that, in a natural ecosystem in equilibrium, the strains possibly do not need to supply large amounts of N to their original host legumes, in contrast to the needs in areas of intensive agriculture where high-yielding legume genotypes are grown.

Despite the limitations inherent in attributing the abundance of microbial species to single soil properties, *P. nodosa* seems to carry important functions in soils of low nutrient content, such as the area chosen for our study. Since the Cerrado biome is an important region for Brazilian agriculture and livestock, and also one of the 'hottest hotspots' for biological conservation (Myers et al. 2000), it is important to keep in mind that the more information we have about its natural microbiota, the more we can help maintain soil microbial diversity. Therefore, identifying diazotrophic strains in this natural environment very poor on soil N may contribute to improving our understanding of ecosystem functioning.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at FEMSEC online.

ACKNOWLEDGEMENTS

R.F. Dall'Agnol acknowledges a PhD fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)-Embrapa. M. Hungria is also a research fellow from CNPq. Approved for publication by the Editorial Board of Embrapa Soja as manuscript number 378/2015.

FUNDING

Partially financed by Embrapa (02.13.08.001.00.00), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) (470515/2012-0) and MCTI/CNPq/CAPES/FAPS (INCT-MPCPAgro).

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Adamoli J, Macedo J, Azevedo LD *et al.* Caracterização da região dos Cerrados. *Solos dos Cerrados: Tecnologias e Estratégias de Manejo*. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1986, 33–74.
- Alberton O, Kaschuk G, Hungria M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biol Biochem* 2006;**38**:1298–307.
- Angus AA, Agapakis CM, Fong S *et al.* Plant-associated symbiotic *Burkholderia* species lack hallmark strategies required in mammalian pathogenesis. *PLoS One* 2014;**9**:e83779.
- Aquino FDG, Vilela MDF, Rogers W *et al.* Caracterização Biotica e de Qualidade da Água Como Subsídios Para Elaboração do Plano de Manejo da Área da Embrapa Cerrados. Planaltina: Embrapa Cerrados (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 248), 2009.
- Baptista GDM. Caracterização climatológica do distrito federal. IEMA/SEMATEC/UnB, inventário hidrogeológico e dos recursos hídricos superficiais do distrito federal. *Brasília* 1998;**1**:187–208.
- Bontemps C, Elliott GN, Simon MF *et al.* *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Mol Ecol* 2010;**19**:44–52.
- Bontemps C, Rogel MA, Wiechmann A *et al.* Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytol* 2016;**209**:319–33.
- Bournaud C, de Faria SM, dos Santos JMF *et al.* *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the *piptadenia* group (tribe mimosae). *PLoS One* 2013;**8**:e63478.
- Caballero-Mellado J, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G *et al.* *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;**54**:1165–72.
- Cardoso JD, Hungria M, Andrade DS. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Appl Microbiol Biot* 2012;**93**:2035–49.
- Chen W-M, De Faria SM, James EK *et al.* *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimacronata* and *Mimosa scabrella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;**57**:1055–9.
- Chen W-M, de Faria SM, Stralioetto R *et al.* Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:7461–71.
- Chen W-M, James EK, Coenye T *et al.* *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;**56**:1847–51.
- Chen Y, Schröder I, French CT *et al.* Characterization and analysis of the *Burkholderia pseudomallei* BsaN virulence regulon. *BMC Microbiol* 2014;**14**:1.
- Coenye T, Spilker T, Martin A *et al.* Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. *J Clin Microbiol* 2002;**40**:3300–7.
- Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* 2003;**5**:719–29.
- Dalmastrici C, Chiarini L, Cantale C *et al.* Soil type and maize cultivation affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microbial Ecol* 1999;**38**:273–84.
- de Meyer SE, Cnockaert M, Ardley JK *et al.* *Burkholderia sprentiae* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;**63**:3950–7.
- del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF *et al.* Opening the ‘black box’ of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. *BMC Genomics* 2015a;**16**:864.
- del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF *et al.* Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. *BMC Genomics* 2015b;**16**:1.
- Dobritsa AP, Samadpour M. Transfer of eleven *Burkholderia* species to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Ca-balleronia* gen. nov., a new genus to accommodate twelve species of *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016, DOI: 10.1099/ijsem.0.001065.
- dos Reis Jr FB, Simon MF, Gross E *et al.* Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytol* 2010;**186**:934–46.
- Elliott GN, Chen WM, Bontemps C *et al.* Nodulation of *Cyclopia* spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. *Ann Bot* 2007;**100**:1403–11.
- Elliott GN, Chou JH, Chen WM *et al.* *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. *Environ Microbiol* 2009;**11**: 762–78.
- Estrada-de los Santos P, Rojas-Rojas FU, Tapia-García EY *et al.* To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Ann Microbiol* 2015, DOI: 10.1007/s13213-015-1183-1.
- Estrada-de los Santos P, Vinuesa P, Martínez-Aguilar L *et al.* Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Curr Microbiol* 2013;**67**:51–60.
- Feije F, Anger V. Spot tests in inorganic analyses. *Analytical Chemistry Acta* 1972;**149**:363–7.
- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 1981;**17**:368–76.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;**39**:783–91.
- Fernandes MF, Fernandes RPM, Hungria M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. *Pesqui Agropec Bras* 2003;**38**:911–20.
- Fonseca MB, Peix A, de Faria SM *et al.* Nodulation in *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Caesalpinioideae), a threatened species native to the Brazilian Cerrado. *PLoS ONE* 2012;**7**:e49520, DOI: 10.1371/journal.pone.
- Garau G, Yates RJ, Deiana P *et al.* Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. *Soil Biol Biochem* 2009;**41**:125–34.
- Gehlot HS, Tak N, Kaushik M *et al.* An invasive *Mimosa* in India does not adopt the symbionts of its native relatives. *Ann Bot* 2013;**112**:179–96.
- Germano MG, Menna P, Mostasso FL *et al.* RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;**56**:217–29.
- Goedert WJ. Região dos Cerrados: potencial agrícola e política para seu desenvolvimento. *Pesqui Agropec Bras* 1989;**24**: 1–17.

- Grange L, Hungria M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biol Biochem* 2004;**36**:1389–98.
- Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L et al. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol Plant Microbe In* 2011;**24**:1276–88.
- Hedges SB. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap *P* value in phylogenetic studies. *Mol Biol Evol* 1992;**9**:366–9.
- Hungria M, Araujo RS. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília, DF: Embrapa-Serviço de Produção e Informação, 1994.
- Hungria M, Campo RJ, Mendes IC et al. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. *Nitrogen Nutrition and Sustainable Plant Productivity*. Houston: Studium Press, LLC, 2006, 43–93.
- Hungria M, Vargas MAT, Araujo RS. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: Vargas MAT, Hungria M. (eds). *Biologia dos Solos dos Cerrados*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997, 189–294.
- Kaschuk G, Hungria M, Andrade D et al. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Appl Soil Ecol* 2006a;**32**:210–20.
- Kaschuk G, Hungria M, Santos JCP et al. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. *Soil Till Res* 2006b;**87**: 205–17.
- Koeth T, Versalovic J, Lupski JR. Differential subsequent conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res* 1995;**5**:408–18.
- Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM. Toward a more robust assessment of intraspecific diversity, using fewer genetic markers. *Appl Environ Microb* 2006;**72**:7286–93.
- Lammel DR, Cruz LM, Mescolotti D et al. Woody *Mimosa* species are nodulated by *Burkholderia* in ombrophylous forest soils and their symbioses are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *Plant Soil* 2015;**393**:123–35.
- Lemaire B, Dlodlo O, Chimphango S et al. Symbiotic diversity, specificity and distribution of rhizobia in native legumes of the Core Cape Subregion (South Africa). *FEMS Microbiol Ecol* 2015;**91**:1–17.
- Liu WYY, Ridgway HJ, James TK et al. *Burkholderia* sp. induces functional nodules on the South African invasive legume *Di-pogon lignosus* (Phaseoleae) in New Zealand soils. *Microb Ecol* 2014;**68**:542–55.
- Liu X, Wei S, Wang F et al. *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in southern China. *FEMS Microbiol Ecol* 2012;**80**:417–26.
- Mahenthalingam E, Baldwin A, Dowson CG. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol* 2008;**104**:1539–51.
- Mendes IC, Fernandes MF, Chaer GM et al. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. *Plant Soil* 2012;**359**:183–95.
- Menna P, Hungria M, Barcellos FG et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol* 2006;**29**:315–32.
- Menna P, Pereira AA, Bangel EV et al. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis* 2009;**48**: 120–30.
- Michiels J, Dombrecht B, Vermeiren N et al. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiol Ecol* 1998;**26**:193–205.
- Mishra RP, Tisseyre P, Melkonian R et al. Genetic diversity of *Mimosapudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phy-matum* and other beta-rhizobia. *FEMS Microbiol Ecol* 2012;**79**: 487–503.
- Mostasso L, Mostasso FL, Dias BG et al. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crop Res* 2002;**73**:121–32.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000;**403**: 853–8.
- Oliveira JP, Galli-Terasawa LV, Enke CG et al. Genetic diversity of rhizobia in a Brazilian oxisol nodulating Mesoamerican and Andean genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J Microb Biot* 2011;**27**:643–50.
- Oliveira M. A evolução da produtividade no Cerrado. 2013, <http://www.pioneersementes.com.br/Media-Center/Pages/Detailhe-do-Artigo.aspx?p=160&t=A+evolu%u100e167%u100e163o+da+produtividade+no+Cerrado> (1 December 2015, date last accessed).
- Oren A, Garrity GM. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. *Int J Syst Evol Micr* 2015;**65**:2028–9.
- Pinto FGS, Hungria M, Mercante FM. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol Biochem* 2007;**39**:1851–64.
- Reis V, Estrada-De los Santos P, Tenorio-Salgado S et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int J Syst Evol Micr* 2004;**54**:2155–62.
- Ribeiro RA, Barcellos FG, Thompson FL et al. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res Microbiol* 2009;**160**:297–306.
- Ribeiro RA, Martins TB, Ormeno-Orrillo E et al. *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *Int J Syst Evol Micr* 2015;**65**:3162–9.
- Ribeiro RA, Rogel MA, Lopez-Lopez A et al. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int J Syst Evol Micr* 2012;**62**:1179–84.
- Rusch A, Islam S, Savalia P et al. *Burkholderia insulsa* sp. nov., a facultatively chemolithotrophic bacterium isolated from an arsenic-rich shallow marine hydrothermal system. *Int J Syst Evol Micr* 2015;**65**:189–94.
- Sawana A, Adeolu M, Gupta RS. 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. *Front Genet* 2014;**5**:1–22.
- Sheu SY, Chen MH, Liu WYY et al. *Burkholderia dipogonis* sp. nov., isolated from root nodules of *Dipogon lignosus* in New Zealand and Western Australia. *Int J Syst Evol Micr* 2015, DOI: 10.1099/ijsem.0.000639.
- Sheu SY, Chou JH, Bontemps C et al. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. *Int J Syst Evol Micr* 2013;**63**:435–41.
- Steenkamp ET, van Zyl E, Beukes CW et al. *Burkholderia kirstenboschensis* sp. nov. nodulated papilionoid legumes indigenous to South Africa. *Syst Appl Microbiol* 2015;**38**:545–54.

- Stopnisek N, Bodenhausen N, Frey B *et al.* Genus-wide acid tolerance accounts for the biogeographical distribution of soil *Burkholderia* populations. *Environ Microbiol* 2014;**16**: 1503–12.
- Suarez-Moreno ZR, Caballero-Mellado J, Coutinho BG *et al.* Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microb Ecol* 2012;**63**: 249–66.
- Talbi C, Argandona M, Salvador M *et al.* *Burkholderia phymatum* improves salt tolerance of symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Soil* 2013;**367**:673–85.
- Talbi C, Delgado MJ, Girard L *et al.* *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. *Appl Environ Microb* 2010;**76**:4587–91.
- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993;**10**: 512–26.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;**30**:2725–9.
- Valverde A, Delvasto P, Peix A *et al.* *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. *Int J Syst Evol Microb* 2006a;**56**:2421–5.
- Valverde A, Igual JM, Peix A *et al.* *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microb* 2006b;**56**:2631–7.
- Vargas M, Hungria M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: Vargas M, Hungria M (eds). *Biologia dos Sojos dos Cerrados*. Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 1997, 297–360.
- Velázquez E, Martínez-Romero E, Rodríguez-Navarro DN *et al.* Characterization of rhizobial isolates of *Phaseolus vulgaris* by staircase electrophoresis of low-molecular-weight RNA. *Appl Environ Microb* 2001;**67**:1008–10.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn F *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Method Mol Cell Biol* 1994;**5**:25–40.
- Vial L, Chapalain A, Groleau MC *et al.* The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. *Environ Microbiol* 2011;**13**:1–12.
- Vincent JM. *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific, 1970.
- Zuleta LF, de Cunha C, de Carvalho FM *et al.* The complete genome of *Burkholderia phenoliruptrix* strain BR3459a, a symbiont of *Mimosa flocculosa*: highlighting the coexistence of symbiotic and pathogenic genes. *BMC Genomics* 2014;**15**:535.

Table S1

Type of vegetation and areas of the Ecological Reserves inside Embrapa Cerrados (Parrori *et al.* 1998).

Name of the Ecological Reserve	Vegetation type	Total area (hectares)
Mirante	Dry forest; gallery forest, typical "Cerrado" and moist grassland	244.2
Cerradão	Dystrophic "Cerradão" and dense "Cerrado"	37
Sarandi	Gallery forest, moist grassland and "vereda"	65
Vellozia	Clean and dirty grassland; clean grassland with "murundu"	45
Cascalheira	Typical "Cerrado"	60

References

Parrori LM, Sousa-Silva JC, de Camargo, *et al.* *Reservas ecológicas da Embrapa cerrados: caracterização e zoneamento*. Planaltina: Embrapa Cerrados. (Embrapa-CPAC. Documentos, 73), 1998.

Table S2

Chemical properties and granulometry at the 0-20 cm soil layer under a native vegetation of “Cerradão” used in the study.

pH	Al	Ca+Mg	Organic matter	P	K	Clay	Sand	Silt
(H ₂ O)	(cmol _c kg ⁻¹)	(cmol _c kg ⁻¹)	(%)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)		(g kg ⁻¹)	
4.72	9.2	5.9	2.71	0.35	20	470	355	175

Table S3
Primers and PCR conditions used in this study.

Gene	Primer	Sequence 5' - 3'	Size*	PCR conditions	Reference
16S rRNA	fD1	5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'	1259 bp	2 min 95 °C, 30 x (15s 94°C, 45s 93°C, 45s 55°C, 2 min 72°C), 5 min 72°C	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
	rD1	5' - AAGGAGGTGATCCAGCC – 3'			
<i>recA</i>	recA-BurkF	5' –AGGACGATTCATGGAAGAWAGC – 3'	416 bp	5 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C,45 72°C), 7 min 72°C	Spilker <i>et al.</i> (2009)
	recA-BurkR	5' –GACGCACYGAYGMRTAGAACTT – 3'			
<i>gyrB</i>	gyrB-BurkF	5' – ACCGGTCTGCAYCACCTCGT – 3'	583 bp	2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C,1min 72°C), 5 min 72°C	Spilker <i>et al.</i> (2009)
	gyrB-BurkR	5' – YTCGTTGWARCTGTCGTTCCACTGC – 3'			
<i>nodC</i>	nodCBurkPipF	5' –T(GA)AT(CT)GA(TC)ATGGAATACTGGC– 3'	358 bp	5 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C,45 72°C), 7 min 72°C	Bournaud <i>et al.</i> (2013)
	nodCBurkPipR	5' –CAGCGGA(CT)AT(CA)GTCATTGA– 3'			
BOX-PCR	BOX-A1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	-	7 min 95 °C, 35 x (1 min 94°C, 1 min 53°C, 8 min 65°C), 16 min 65°C	Versalovic <i>et al.</i> (1994)

* Fragment size used in this study.

References

- Bournaud C, de Faria SM, dos Santos JMF, *et al.* *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the piptadenia group (tribe mimoseae). *PLoS One* 2013; **8**: e63478.
- Spilker T, Baldwin A, Bumford A, *et al.* Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 2607-2610.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn F, *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* 1994; **5**: 25-40.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991; **173**: 697-703.

Table S4

GenBank accession numbers for sequences of *Paraburkholderia nodosa* strains used in this study and of reference/type strains.

	Accession number			
	16SrRNA	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>nodC</i>
CNPSo 1204	KU097017	KU097165	KU097075	KU097120
CNPSo 1213	KU097018	KU097166	KU097076	KU097121
CNPSo 1228	KU097019	KU097167	KU097077	KU097122
CNPSo 1233	KU097020	KU097168	KU097078	KU097123
CNPSo 1238	KU097021	KU097169	KU097079	KU097124
CNPSo 1244	KU097022	KU097170	KU097080	KU097125
CNPSo 1258	KU097023	KU097171	KU097081	KU097126
CNPSo 1259	KU097024	KU097172	KU097082	KU097127
CNPSo 1268	KU097025	KU097173	KU097083	KU097128
CNPSo 1275	KU097026	KU097174	KU097084	KU097129
CNPSo 1286	KU097027	KU097175	KU097085	KU097130
CNPSo 1287	KU097028	KU097176	KU097086	KU097131
CNPSo 1288	KU097029	KU097177	KU097087	KU097132
CNPSo 1290	KU097030	KU097178	KU097088	KU097133
CNPSo 1291	KU097031	KU097179	KU097089	KU097134
CNPSo 1293	KU097032	KU097180	KU097090	KU097135
CNPSo 1294	KU097033	KU097181	KU097091	KU097136
CNPSo 1296	KU097034	KU097182	KU097092	KU097137
CNPSo 1298	KU097035	KU097183	KU097093	KU097138
CNPSo 1299	KU097036	KU097184	KU097094	KU097139
CNPSo 1301	KU097037	KU097185	KU097095	KU097140
CNPSo 1307	KU097038	KU097186	KU097096	KU097141
CNPSo 1308	KU097039	KU097187	KU097097	KU097142
CNPSo 1310	KU097040	KU097188	KU097098	KU097143
CNPSo 1313	KU097041	KU097189	KU097099	KU097144
CNPSo 1314	KU097042	KU097190	KU097100	KU097145
CNPSo 1321	KU097043	KU097191	KU097101	KU097146
CNPSo 1327	KU097044	KU097192	KU097102	KU097147
CNPSo 1341	KU097045	KU097193	KU097103	KU097148
CNPSo 1342	KU097046	KU097194	KU097104	KU097149
CNPSo 1349	KU097047	KU097195	KU097105	KU097150
CNPSo 1352	KU097048	KU097196	KU097106	KU097151
CNPSo 1353	KU097049	KU097197	KU097107	KU097152
CNPSo 1354	KU097050	KU097198	KU097108	KU097153
CNPSo 1359	KU097051	KU097199	KU097109	KU097154
CNPSo 1361	KU097052	KU097200	KU097110	KU097155
CNPSo 1364	KU097053	KU097201	KU097111	KU097156
CNPSo 1376	KU097054	KU097202	KU097112	KU097157
CNPSo 1379	KU097055	KU097203	KU097113	KU097158
CNPSo 1385	KU097056	KU097204	KU097114	KU097159
CNPSo 1386	KU097057	KU097205	KU097115	KU097160
CNPSo 1388	KU097058	KU097206	KU097116	KU097161
CNPSo 1389	KU097059	KU097207	KU097117	KU097162
CNPSo 1391	KU097060	KU097208	KU097118	KU097163
CNPSo 1392	KU097061	KU097209	KU097119	KU097164
CNPSo 1207	KU097062	-	-	-
CNPSo 1221	KU097063	-	-	-
CNPSo 1231	KU097064	-	-	-
CNPSo 1248	KU097065	-	-	-
CNPSo 1251	KU097066	-	-	-
CNPSo 1255	KU097067	-	-	-
CNPSo 1263	KU097068	-	-	-
CNPSo 1273	KU097069	-	-	-
CNPSo 1312	KU097070	-	-	-

CNPSo 1315	KU097071	-	-	-
CNPSo 1318	KU097072	-	-	-
CNPSo 1326	KU097073	-	-	-
CNPSo 1332	KU097074	-	-	-
<i>B. acidipaludis</i> SA33 ^T	AB513180.1	NZ_BAXZ01000005.1	KM655753.1	-
<i>B. aspalathi</i> VG1C ^T	KC817488.1	KF356197.1	-	-
<i>P. bryophila</i> LMG 23644 ^T	AM489501.1	HQ849133.1	HQ849188.1	-
<i>B. caballeronis</i> LMG 26416 ^T	EF139186.1	-	-	-
<i>P. caledonica</i> LMG 19076 ^T	AF215704.1	HQ849134.1	HQ849189.1	-
<i>P. caribensis</i> LMG 18531 ^T	Y17009.1	AY619662.1	HQ849190.1	-
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416 ^T	U96927.1	AF143786.1	HQ849191.1	-
<i>C. choica</i> LMG 22940 ^T	AY949196.1	-	-	-
<i>C. cordobensis</i> LMG 27620 ^T	HG324048.1	-	-	-
<i>B. denitrificans</i> KIS30-44 ^T	GU171384.1	-	-	-
<i>P. diazotrophica</i> JPY 461 ^T	HM366717.1	FN543898.1	KM655754.1	FN543616.1
<i>P. dilworthii</i> WSM3556 ^T	HQ698908.1	HE994060.1	HE994041.1	HG425185.1
<i>P. eburnea</i> RR11 ^T	JQ692176.1	-	-	-
<i>P. ferrariae</i> LMG 23612 ^T	DQ514537.1	HQ398577.1	HQ849193.1	-
<i>P. fungorum</i> LMG 16225 ^T	AF215705.1	AJ549505.1	HQ849194.1	-
<i>C. glathei</i> LMG 14190 ^T	U96935.1	AY619666.1	HE985172.1	-
<i>P. ginsengisoli</i> KMY03 ^T	AB201286.1	-	-	-
<i>P. graminis</i> C4D1M ^T	U96939.1	AY619653.1	HQ849199.1	-
<i>P. hospita</i> LMG 20598 ^T	AY040365.1	HQ398580.1	HQ849200.1	-
<i>C. humi</i> LMG 22934 ^T	AY949193.1	-	-	-
<i>C. jiangsuensis</i> MP1 ^T	KJ400396.1	KJ535369.1	NZ_JFHF01000052.1	-
<i>P. kururiensis</i> LMG 19447 ^T	AB024310.1	AY619654.1	HQ849201.1	-
<i>P. mimosarum</i> PAS44 ^T	AY752958.1	EU294396.1	HQ849202.1	EU386155.1
<i>P. nodosa</i> BR3437 ^T	AY773189.1	HQ398586.1	HQ849204.1	*HE983823.1
<i>P. phenazinium</i> LMG 2247 ^T	U96936.1	HQ849149.1	HQ849206.1	-
<i>P. phenoliruptrix</i> LMG 22037 ^T	AY435213.1	HQ398589.1	HQ849207.1	*HE983803.1
<i>P. phymatum</i> STM 815 ^T	AJ302312.1	AY619667.1	HQ849208.1	-
<i>P. phytofirmans</i> PsJN ^T	CP001052.1	CP001052.1	NC_010681.1	-
<i>B. pseudomallei</i> MSHR491	CP009485.1	CP009485.1	CP009485.1	-
<i>B. rhynchosiae</i> WSM 3937 ^T	EU219865.1	HE994064.1	HE994045.2	HG425184.1
<i>P. sabiae</i> LMG 24235 ^T	AY773186.1	HQ398591.1	-	*HE983805.1
<i>P. sacchari</i> LMG 19450 ^T	AF263278.1	HQ849156.1	HQ849212.1	-
<i>P. silvatlantica</i> SRMrh-20 ^T	AY965240.1	HQ849157.1	HQ849213.1	-
<i>P. sprentiae</i> WSM 5005 ^T	HF549035.1	HE994077.1	HE994059.1	HG425185.1
<i>P. symbiotica</i> JPY 345 ^T	HM357233.1	FN543850.1	HF952726.1	-
<i>C. telluris</i> LMG 22936 ^T	HE981727.1	-	-	-
<i>P. terrae</i> KMY02 ^T	AB201285.1	HQ398598.1	NZ_BBJK01000006.1	-
<i>C. terrestris</i> LMG 22937 ^T	HE981726.1	-	-	-
<i>P. terricola</i> LMG 20594 ^T	AY040362.1	HQ398599.1	HQ849215.1	-
<i>P. tropica</i> LMG 22274 ^T	AJ420332.1	HQ849161.1	HQ849216.1	-
<i>P. tuberum</i> STM 678 ^T	AJ302311.1	AY619674.1	HQ849217.1	AJ306730.1
<i>C. udeis</i> LMG 27134	AY154367.1	-	-	-
<i>B. vietnamiensis</i> LMG 10929 ^T	AF097534.1	AF143793.1	CP009631.1	-
<i>C. zhejiangensis</i> OP-1 ^T	HM802212.1	-	-	-
<i>C. taiwanensis</i> LMG 19424 ^T	CU633749.1	CU633749.1	CU633749.1	CU633751.1
<i>N. galegae</i> LMG 6214 ^T	HG938353.1	-	-	-
<i>N. huautlense</i> LMG 18254 ^T	AF025852.1	-	-	-
<i>R. alarii</i> GBV016 ^T	AM931436	-	-	-
<i>R. cellulosityticum</i> ALA10B2 ^T	DQ855276	-	-	-
<i>R. daejeonense</i> L61 ^T	AY341343	-	-	-
<i>R. endophyticum</i> CCGE2052 ^T	EU867317	-	-	-
<i>R. etli</i> CFN 42 ^T	U28916	-	-	-
<i>R. fabae</i> CCBAU 33202 ^T	115872	-	-	-
<i>R. freirei</i> PRF 81 ^T	EU488742.2	-	-	-
<i>R. gallicum</i> R602 ^T	U86343	-	-	-
<i>R. giardinii</i> H152 ^T	NR_116337.1	-	-	-
<i>R. grahamii</i> CCGE 502 ^T	JF424608	-	-	-
<i>R. hainanense</i> I66 ^T	U71078.2	-	-	-

<i>R. laguerreae</i> FB206 ^T	JN558651.2	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> USDA 2671 ^T	U29388	-	-	-
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> USDA 2370 ^T	U29386	-	-	-
<i>R. leucaena</i> CFN 299 ^T	X67234.2	-	-	-
<i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T	AY738130	-	-	-
<i>R. mesoamericanum</i> CCGE 501 ^T	JF424606	-	-	-
<i>R. mesosinicum</i> CCBAU 25010 ^T	DQ100063	-	-	-
<i>R. miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	EF061096	-	-	-
<i>R. mongolense</i> USDA 1844 ^T	U89817	-	-	-
<i>R. multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T	EF035074.2	-	-	-
<i>R. oryzae</i> ALT 505 ^T	EU056823	-	-	-
<i>R. paranaense</i> PRF 35 ^T	EU488753	-	-	-
<i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T	EF141340	-	-	-
<i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T	AY509899	-	-	-
<i>R. pseudoryzae</i> J3A-127 ^T	DQ454123.3	-	-	-
<i>R. pusense</i> NRCPB10 ^T	FJ969841	-	-	-
<i>R. radiobacter</i> ATCC 19358 ^T	AJ389904	-	-	-
<i>R. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	AY945955	-	-	-
<i>R. soli</i> DS-42 ^T	EF363715	-	-	-
<i>R. sullae</i> IS123 ^T	Y10170	-	-	-
<i>R. tibeticum</i> CCBAU 85039 ^T	EU256404	-	-	-
<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	U89832	-	-	-
<i>R. vallis</i> CCBAU 65647 ^T	FJ839677	-	-	-
<i>B. diazoefficiens</i> USDA110 ^T	NC_004463.1	-	-	-

*Accession numbers of *nodC* sequences of strains *P. nodosa* BR 3470, *P. sabiae* STM 7319 and *P. phenoliruptrix* STM 7415.

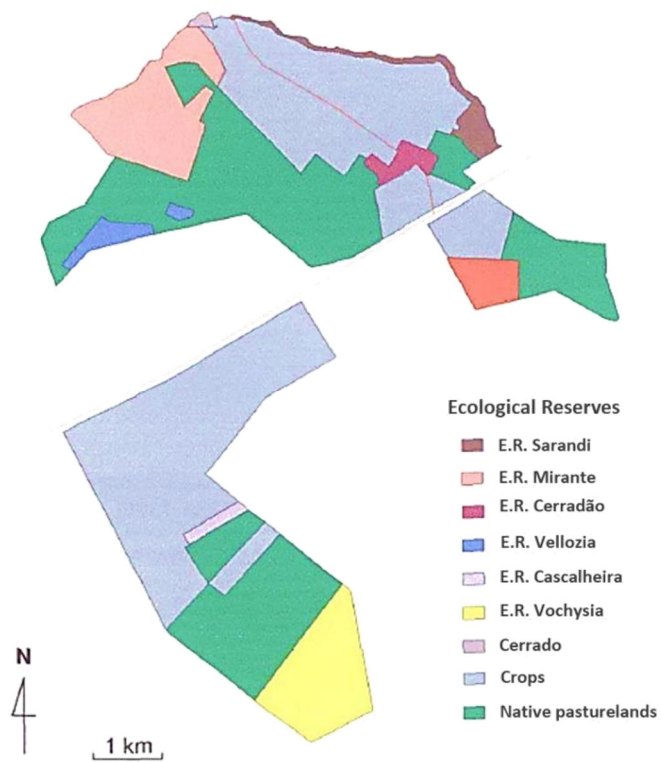


Figure S1. Ecological reserves of Embrapa Cerrados and its vegetation types (Parrori *et al.* 1998).

References

Parrori LM, Sousa-Silva JC, de Camargo, *et al.* *Reservas ecológicas da Embrapa cerrados: caracterização e zoneamento*. Planaltina: Embrapa Cerrados (Embrapa-CPAC. Documentos, 73) 1998.

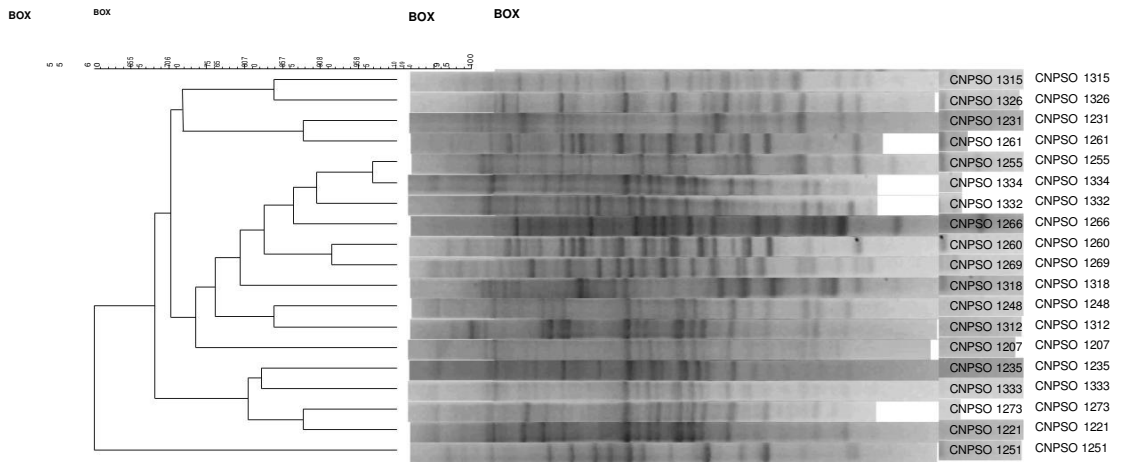


Fig. S2. BOX-PCR profiles of *Rhizobium* strains isolated in this study. Dendrogram was built with the Bionumerics software using the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient with 3% of tolerance.

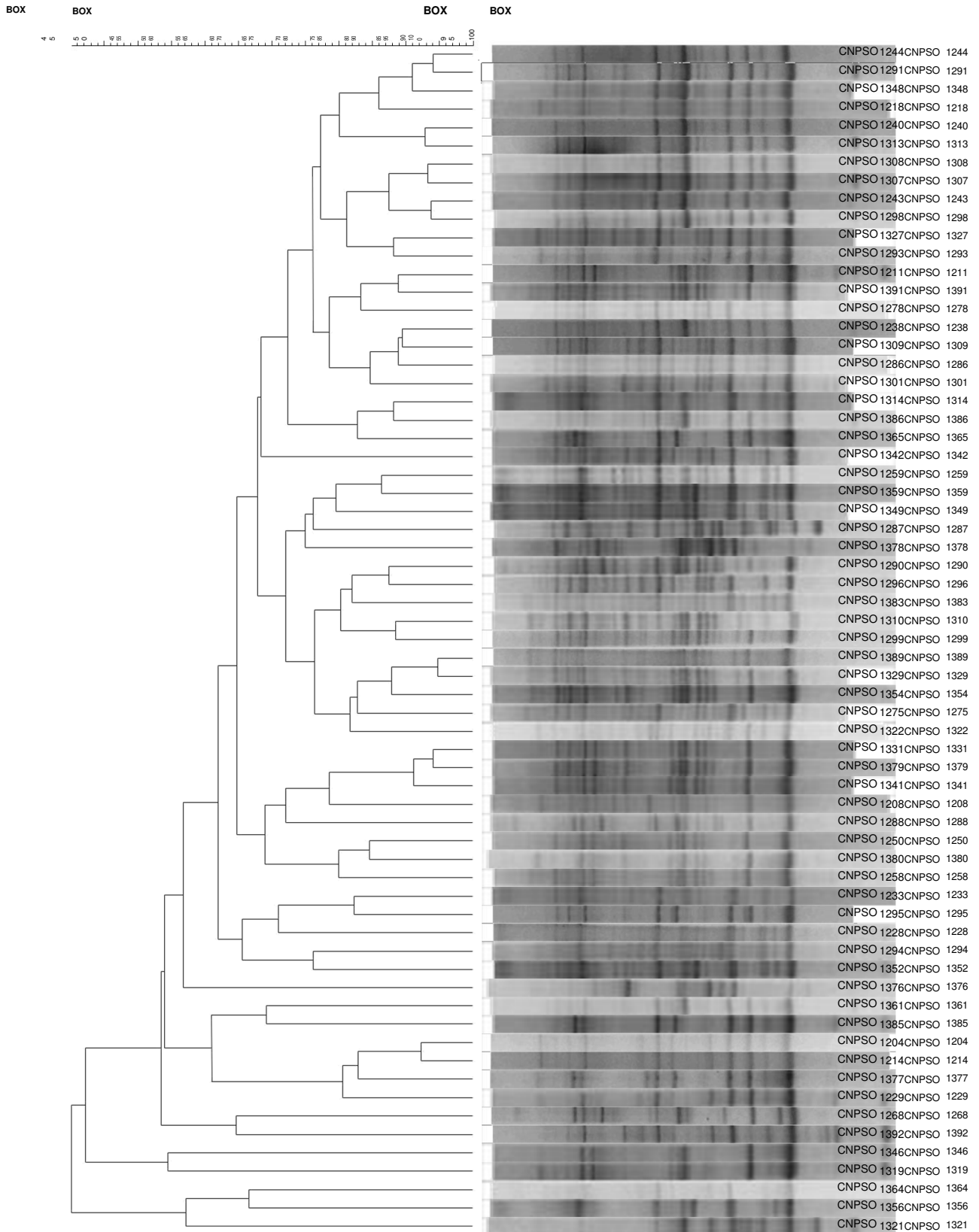


Fig. S3. BOX-PCR profiles of *Paraburkholderia* strains isolated in this study. Dendrogram was built with the software Bionumerics using the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient with 3% of tolerance.

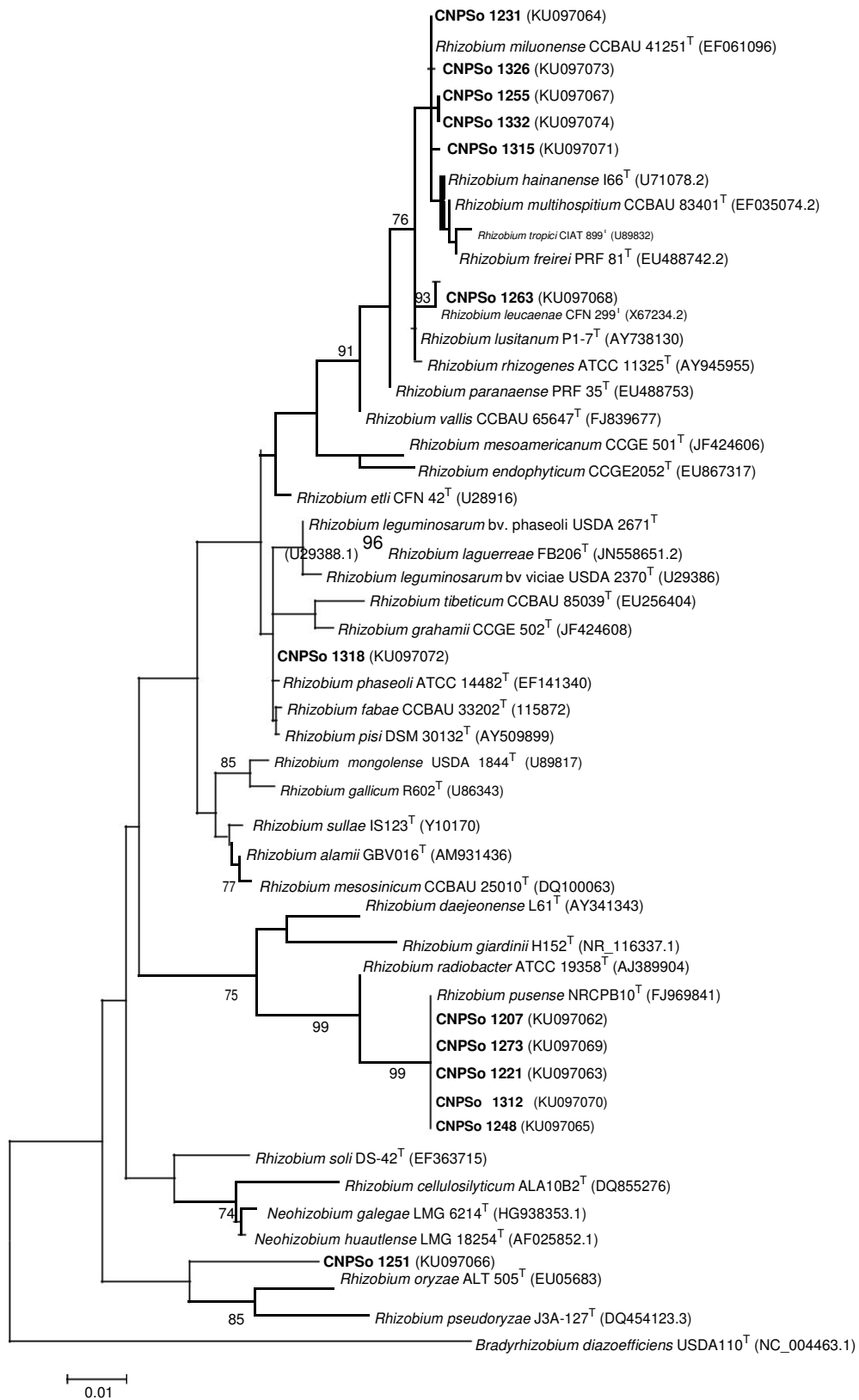
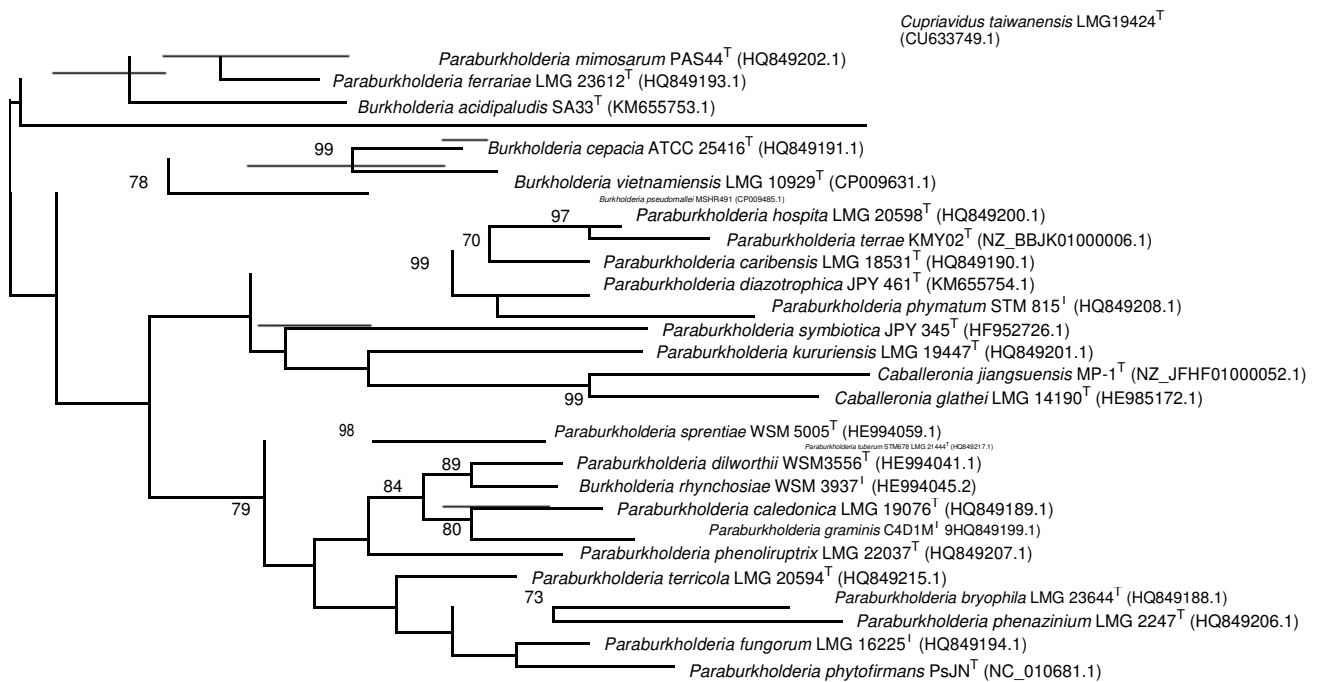
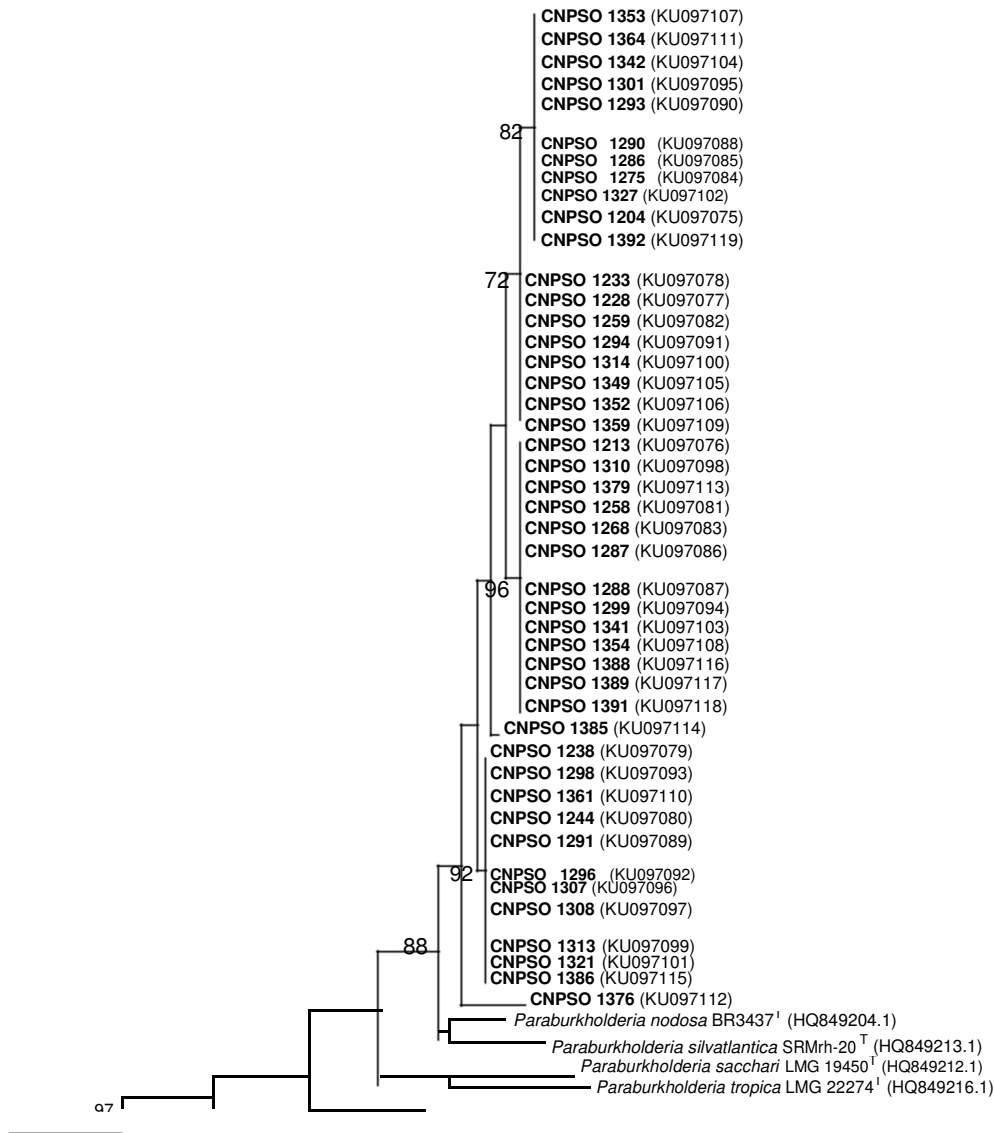


Fig. S4. Phylogenetic tree of 16S rDNA gene based on a 993 bp alignment of *Rhizobium* strains trapped by common bean from a “Cerradão” soil and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions.

0.02

Fig. S5. Phylogenetic tree of *recA* gene based on a 416 bp alignment of *Paraburkholderia* strains trapped by common bean from a “Cerradão” soil and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions.



0.02

Fig. S6. Phylogenetic tree of *gyrB* genes based on a 583 bp alignment of *Paraburkholderia* strains trapped with common bean from a “Cerradão” soil and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions.

8. ESTUDO 3

Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown on soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica)

Rebeca Fuzinatto Dall'Agnol^{a,b,c}, Caroline Bournaud^{c,d}, Sérgio Miana de Faria^e, Gilles Béna^{c,f}, Lionel Moulin^{c,f}, Mariangela Hungria^a

^aEmbrapa Soja, Soil Biotechnology Laboratory, C.P. 231, 86001-970, Londrina, PR, Brazil.

^bUniversidade Estadual de Londrina, Dept. Biochemistry and Biotechnology, C.P. 10.011, 86057-970, Londrina, PR, Brazil.

^cIRD, Cirad, Univ. Montpellier, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), Campus de Baillarguet 34398 Montpellier, France.

^dEmbrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, LIMPP Laboratory, C.P. 02372, 70770-917, Brasília, DF, Brazil.

^eEmbrapa Agrobiologia, C.P 74.505, 23891-000, Seropédica, RJ, Brazil.

^fIRD, Cirad, Univ. Montpellier, Interactions Plantes Microorganismes Environnement (IPME), 34394 Montpellier, France.

E-mails: R.F. Dall'Agnol (rebeca.fd@hotmail.com); C. Bournaud (bournaudcaroline8@gmail.com); S.M. de Faria (sergio.defaria@embrapa.br); G. Béna (gilles.bena@ird.fr); L. Moulin (lionel.moulin@ird.fr); *M. Hungria (mariangela.hungria@embrapa.br; hungria@pq.cnpq.br). * Corresponding author

Abstract

Some species of the genus *Paraburkholderia* that are able to nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes are called β -rhizobia and represent a group of ecological and biotechnological importance. We used *Mimosa pudica* and *Phaseolus vulgaris* to trap 427 rhizobial isolates from rhizospheric soil of Mimoseae trees in the Brazilian Atlantic Forest. Eighty-four representative strains were selected according to the 16S-rRNA haplotypes and taxonomically characterized using a concatenated 16S-rRNA-*recA* phylogeny. Most strains were assembled in the genus *Paraburkholderia*, including *P. sabiae* and *P. nodosa*. *Mesorhizobium* (α -rhizobia) and *Cupriavidus* (β -rhizobia) were also isolated, but in smaller proportions. MLSA and BOX-PCR analyses indicated that six clusters of *Paraburkholderia* represent potential new species. In the phylogenetic analysis of the *nodC* gene, the majority of the strains were positioned in the same groups as in the 16S-rRNA-*recA* tree, indicative of stability and vertical inheritance, but we also identified horizontal transfer of *nodC* in *P. sabiae*. All α - and β -rhizobial species were trapped by both legumes, although preferences of the host plants for specific rhizobial species were observed.

Keys-words: Biological nitrogen fixation, diazotrophic bacteria, beta-rhizobia, phylogeny, nodulation

Introduction

The Atlantic Forest (Mata Atlântica) represents one of the largest and richest biomes of Brazil, with many species of endemic plants and vertebrates (Myers *et al.* 2000), but the original vegetation now covers only 7% of the surface area (MMA 2015). Because of this exceptional loss of habitat, Mata Atlântica is amongst the 25 areas selected as global “hotspots” for conservation priority (Fonseca 1985; WCMC 1992; Myers *et al.* 2000). Although there is interest worldwide in preserving this biome, most studies have been related to plant and animal communities in the remaining fragments, with little effort focused on its microbiology. In view of the fact that microorganisms play important roles in many aspects of ecosystem maintenance, explorations of this domain are of significant relevance.

The particular group of free-living soil bacteria known as rhizobia is broadly recognized for its capacity of establishing symbiotic root-nodule relationships with plants of the Leguminosae (Fabaceae) family that fix atmospheric nitrogen (N₂). The ability to break the strong triple-bond between two N atoms and convert them into soluble compounds easily assimilated by plants is found in two subclasses of Proteobacteria called alpha (α) and beta (β) rhizobia (Gyaneshwar *et al.* 2011; Mishra *et al.* 2012). The β -subclass came to light when Moulin and collaborators (2001) verified that two *Burkholderia* (now reclassified as *Paraburkholderia*) strains were capable of nodulating legumes. This discovery brought new insights into the understanding of the rhizobia-legume symbioses, given that *Burkholderia* species had not been documented as symbionts before, but were known to colonize a great variety of niches, including water, soil, fungi (as endosymbionts), plants (as endophytes and pathogens) and humans (as pathogens). Since then, many studies

have been performed in order to identify new species of symbiotic and environmental *Burkholderia*, as well as to elucidate their taxonomic positions.

In the past decade, phylogenetic and genomic studies (Bontemps *et al.* 2010; Gyaneshwar *et al.* 2011; Estrada-de Los Santos *et al.* 2013; Sawana *et al.* 2014; Zuleta *et al.* 2014) have placed most environmental non-pathogenic species in a separated group, which has been recently split from *Burkholderia* to form two new genera, *Paraburkholderia* (Sawana *et al.* 2014) and *Caballeronia* (Dobritsa and Samadpour 2016). Although these genera have been published as valid names, some researchers have raised criticisms, stating that the main purpose of the partition should have been the split of pathogenic and environmentally friendly groups (Eberl and Vandamme 2016); the name *Paraburkholderia* would thus be inappropriate, as it contains as “*Burkholderia*.” Other researchers have suggested that the genus should remain as *Burkholderia*, as human opportunistic strains (e.g. *B. fungorum*) are also found in the new *Paraburkholderia* genus (Eberl and Vandamme 2016). Undoubtedly, a new genus name might facilitate the use of beneficial species for biotechnological purposes (biocontrol, bioremediation, inoculants), minimizing the direct association with opportunistic human pathogenesis (Vandamme and Peeters 2014).

In relation to the β -rhizobia, all 13 species described so far were transferred to the genus *Paraburkholderia* (Oren and Garrity 2015; Dobritsa and Samadpour 2016). Moreover, two species of *Cupriavidus*—*C. taiwanensis* (Chen *et al.* 2001) and *C. necator* (da Silva *et al.* 2012)—also from the β -proteobacteria subclass, were identified as root-nodule symbionts of leguminous plants. Most of these *Paraburkholderia* species have been isolated from nodules of *Mimosa*, the largest genus of the tribe Mimoseae (Luckow 2005), with almost 60% of species being

native or endemic to Brazil (Simon *et al.* 2011). Therefore, studies of β -rhizobia associated with *Mimosa* species in the Brazilian soils should increase our understanding of their diversity and distribution. Additionally, as several *Mimosa* species are fast growers and can benefit from N₂ fixation, they are also important for ecosystem conservation and enrichment of N-poor soils, being employed in agroforestry, reforestation and ecological-restoration programs (Franco and Faria 1997; Dhillion and Camargo-Ricalde 2005).

Until now, few surveys have been performed on rhizobial diversity focusing on *Mimosa* and related genera in different Brazilian biomes (including Mata Atlântica). In 2010, Bontemps's and dos Reis's groups investigated three different biomes—Cerrado (savanna), Caatinga (xeric shrubland) and Pantanal (wetland)— and found that the majority of the symbionts were strains of *Paraburkholderia*. Species diversity varied according to geographical area and was influenced by different parameters, including altitude and soil pH. At the same time, a large collection of soil samples and fresh nodules were obtained by Bournaud and collaborators (2013) at the Mata Atlântica biome in Rio de Janeiro State with species of the tribe Mimoseae. The soils were collected from nearby trees of the "*Piptadenia* group" (Jobson and Luckow 2007), which comprises *Mimosa* and associated genera. In this survey, the authors also found *Paraburkholderia* species as the preferred symbionts, and the diversity obtained was higher than in other Brazilian biomes, also varying among sites. Three potentially new species were identified, suggesting that this region might harbor an even higher number of undescribed species.

In our study, we used two trap-host plants, the invasive *Mimosa pudica*, which is nodulated mainly by β -rhizobia in native and non-native environments (Gyaneshwar *et al.* 2011), and common bean (*Phaseolus vulgaris*), which is also a

promiscuous legume (Michiels *et al.* 1998; Martinez-Romero 2003), to estimate the rhizobial diversity in different localities of Rio de Janeiro, a Brazilian state that was originally entirely covered by Mata Atlântica vegetation. We took advantage of the collection of Bournaud *et al.* (2013) and we chose six soils from 17 locations, selecting those that exhibited high diversity in a previous study (Bournaud *et al.* in press). Our purpose was to verify (1) the taxonomic position of rhizobia using 16S-rRNA and five housekeeping genes: *recA*, *gyrB*, *gltB*, *trpB* and *phaC*; (2) the symbiotic phylogeny of rhizobia using the *nodC* gene; and (3) the intraspecific diversity of strains using BOX-PCR fingerprints.

Materials and methods

Soil sampling and bacterial isolation

Six soil samples from the Brazilian biome of Mata Atlântica, in the state of Rio de Janeiro, Brazil, were selected for this study (Table 1, Fig. 1). The diversity found in previous studies with the same soils (Bournaud *et al.* 2013; Bournaud *et al.* in press) were taken into account when choosing the samples. All of them were collected nearby trees of the *Piptadenia* group (*Piptadenia gonoacantha*, *P. paniculata*, *Anadenanthera peregrina* and *Parapiptadenia pterosperma*), as mentioned before (Bournaud *et al.* 2013).

Strains were trapped using commercial *M. pudica* and *P. vulgaris* seeds provided by B&T World Seeds, Pagnignan, France, and Embrapa Soja, Londrina, Brazil, respectively. *M. pudica* seeds were first scarified and surface sterilized with 96% sulfuric acid for 15 min, followed by six washes with sterile ultrapure H₂O

(Milli-Q), then immersed in 3% calcium hypochlorite for another 15 min and washed six times with sterile ultrapure H₂O. After sterilization, the seeds were submerged overnight in sterile ultrapure H₂O and transferred to 0.8% water-agar Petri dishes for germination. For *P. vulgaris* seeds, the sterilization process was reduced to 10 min with 3% calcium hypochlorite, followed by thorough washing with sterile H₂O. The Petri dishes were incubated at 37°C for one (*M. pudica*) or two days (*P. vulgaris*) and seedlings were reallocated to sterile Gibson tubes filled with sterile commercial Attapulgate (Oil dry US-special Type III R, Damolin Ettechy S.A., Ettechy, France) almost to the top, humidified with ultrapure water, and completed with four to five grams of soil. Six replicates were made for each treatment (6 soils + control), resulting in 42 tubes per trapping. Tubes were incubated in a tropical growth chamber (*M. pudica*: 27°C/day-23°C/night, photoperiod: 16h/8h, 80% relative humidity; *P. vulgaris*: 22°C/day- 18°C/night, photoperiod: 16h/8h, relative humidity: 60–70%) until the development of nodules (approximately 30 days for *M. pudica* and 15 days for *P. vulgaris*). Plants received only sterilized distilled water during the experiment.

Nodules were collected, surface-sterilized with 3% calcium hypochlorite for three minutes, rinsed six times with sterile ultrapure H₂O and selected randomly for bacterial isolation. Eight nodules from each replicate, varying in size and color, were individually crushed in 20 µL of YM broth (Yeast Mannitol) medium, streaked on Yeast Mannitol Agar (YMA, Vincent, 1970) plates and incubated at 28°C for 1-2 days.

Information about the main strains used in this study is shown in Table S1 (Supporting information). For long-term maintenance, pure bacterial strains were grown in YM broth and preserved in 20% glycerol at -80°C.

DNA extraction

Bacterial DNA was extracted according to the Proteinase K method described by Wilson (1987). Pure colonies of each isolate were grown in 10 mL of YM broth and centrifuged for 5 minutes at 12,000 rpm. Pellets were washed twice and dissolved in 200 μ L of ultrapure water. A final volume of 100 μ L of bacterial suspension was adjusted to OD (620 nm) = 1 and an equal volume of 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) was added, followed by 20 μ L of proteinase K (1 mg mL⁻¹) and incubated at 55°C for 2 h. After incubation, samples were boiled for 15 min to denature the enzyme and kept at -20°C.

PCR conditions and sequencing

Initial characterization

First, we performed an initial characterization of the isolates by amplification and sequencing of a fragment of the 16S rRNA gene. After selecting isolates for the subsequent analysis, we chose two markers for PCR amplification and sequencing, the housekeeping gene *recA*, to have more information about the taxonomic position, and *nodC* gene, to evaluate the phylogenetic position of the symbiotic genes.

PCR amplifications were carried out in a 25 μ L volume reaction with GoTaq DNA Polymerase (Promega), according to manufacturer's instructions. PCR products were purified and sequenced by Genoscreen Inc., using ABI chemistry and ABI3730 sequencers, with the same primers employed for PCR amplification, except

for the 16S rRNA sequencing, for which an internal primer (16S-1080r) was used. Primers and PCR conditions are detailed in Table S2 (Supporting information). The 223 sequences obtained were deposited at the GenBank database and accession numbers are given in Table S3 (Supporting information).

Characterization of representative strains

After analyzing the initial results we performed a second selection, based on the groups formed in the phylogenetic trees. In order to refine their taxonomic position, we chose four other housekeeping genes - *gyrB*, *gltB*, *trpB* and *phaC*, intending to construct a tree based on a concatenated dataset and to clarify their phylogenetic relationships. Primers and PCR conditions are shown in Table S2 (Supporting information). PCR products were purified using the Purelink kit (Invitrogen®), following the manufacturer's instructions and sequenced on an ABI 3500xL (Applied Biosystems®) capillary sequencer analyzer at Embrapa Soja, Londrina. The 158 sequences obtained were deposited at the GenBank database, and accession numbers are listed in Table S3.

Canonical Analysis

To verify if soil pH was statistically related to bacterial diversity, we performed a Canonical Analysis based on the bacterial species and soil pH, selected by the Monte Carlo's test at 5% ($p < 0.005$). The analysis was developed with Canoco for Windows 4.5 (Braak and Smilauer 1998).

rep-PCR (BOX-PCR) genomic fingerprinting

In order to estimate the intraspecific diversity of representative strains, the genomic DNA of these isolates was extracted with DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen), following the manufacturer's instructions, and BOX elements were amplified with BOX-AIR primer (Versalovic *et al.* 1994; Koeuth *et al.* 1995; Velázquez *et al.* 2001) and analyzed in 1.5 % agarose gels. The analysis was conducted as described by Fernandes *et al.* (2003) and Kaschuk *et al.* (2006a), which included a molecular marker (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen®) on the left, right and center of each gel. Primers and PCR conditions are shown in Table S2 (Supporting information).

Molecular data analysis

2.5.1 rep-PCR (BOX-PCR) genomic fingerprinting

A dendrogram of BOX profiles was built with Bionumerics software (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 7.6), employing the UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean, Sneath and Sokal 1973) algorithm and the Jaccard coefficient (Jaccard 1912) with 3% of tolerance.

Phylogenetic analysis

DNA sequences obtained in the initial characterization were manually corrected using CHROMASPROv1.34 (Techn-elysium Pty Ltd), aligned with Muscle 3.6 (Edgar 2004) and curated with GENEDOC (Nicholas and Nicholas 1997).

DNA sequences of representative strains, selected after the first characterization, were corrected with Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 7.6).

The alignment of all DNA sequences and the construction of phylogenetic trees were performed using MEGA software version 6.0 (Tamura *et al.* 2013) with the maximum likelihood (ML) algorithm (Felsenstein 1981), Tamura Nei model (Tamura and Nei 1993) and bootstrapping statistical support of 1,000 re-samplings (Felsenstein 1985; Hedges 1992). A phylogenetic tree was built from a concatenated alignment of MLSA genes fragments, using the same parameters as describe above. Fragment size of each gene in the concatenated alignment is shown in Table S2. Nucleotide sequence identity was calculated with Bioedit v. 7.2.5.

Results

Preliminary characterization based on concatenated 16S rRNA-recA phylogeny

A total of 427 isolates were obtained from root nodules on *M. pudica* (219 isolates) and *P. vulgaris* (208 isolates). Each isolate was obtained from a single nodule. The first characterization was based on the 16S rRNA gene (794-length fragment), and the selection was performed according to the isolate haplotypes. In the first selection, 84 strains (Table S1, Supporting information) were chosen for subsequent analysis, which included the amplification and sequencing of a fragment of the *recA* gene, another effective and usually more variable taxonomic marker for discriminating bacterial species. According to 16S rRNA-*recA* phylogeny, most of the symbionts were grouped within the genus *Paraburkholderia* (Fig. 2, Table 2), but

Cupriavidus and *Mesorhizobium* (Fig. S1, Supporting information) strains were also present. β -rhizobia occurred predominantly in all soil samples when *M. pudica* was used as the trap-host plant and in four soil samples (soils 1, 2, 3 and 4) when *P. vulgaris* was used (Table 2).

α -rhizobia isolates

P. vulgaris nodules from soils 5 and 6 (both from site 4) contained only isolates showing high similarity with *Mesorhizobium plurifarium*, based on the 16S rRNA-*recA* phylogenetic tree (Fig. S1, Supporting information), except for two strains from soil 6 that fitted with *Cupriavidus*, STM 10995 and ABIP 210. A single *M. plurifarium* strain was isolated from *M. pudica*, STM 10687 (soil 5). Soil 5 resulted in the lowest level of nodulation for *M. pudica*, with only eight nodules collected from six replicates (data not shown). It is interesting to note that soils 5 and 6 had the highest pH, close to neutrality, compared to the other sites (Table 1).

β -rhizobia isolates

When *M. pudica* and *P. vulgaris* were grown in soils 1, 2, 3 and 4, all symbionts fit into the genus *Paraburkholderia*. As shown in Fig. 2, eight major clades of *Paraburkholderia* were observed, including *P. sabiae* and *P. nodosa* clusters, and six other clades—Psp1 (13 strains), Psp2 (3 strains), Psp3 (3 strains), Psp4 (1 strain), Psp5 (15 strains) and Psp6 (5 strains)—that were separated from known species, indicating potentially undescribed species of symbiotic *Paraburkholderia*.

Strains from these new clades were selected for additional analyses of their genomic diversity.

Since the soil samples used in our study have been collected and characterized before (Bournaud *et al.* 2013), we compared our *recA* sequences with those from this previous study in order to search for similarities. Indeed, some of our strains showed high identity with the *recA* sequences of strains STM 7296 (Bournaud *et al.* 2013) and STM 7183 (Bournaud *et al.*, in press), which clustered with strains of clades Psp2 and Psp5, respectively (Fig. 2).

One cluster was represented by strains of *Cupriavidus necator*, which was the predominant symbiont in *M. pudica* nodules in soil 6. As already mentioned, soil 6 had a neutral pH, in contrast with other acidic soils of this study (Table 1).

Canonical analysis of representative strains

In view of the fact that we found mainly *Paraburkholderia* strains in acidic soils and that other genera (*Cupriavidus*, *Mesorhizobium*) were trapped in areas with higher soil pH, we performed a canonical analysis with the representative strains to verify the influence of soil pH on bacterial diversity. The canonical analysis was significant for soil pH ($p < 0.05$, data not shown). Fig. 3 shows that the isolates were significantly separated by soil pH in axis Y. Acid soils trapped more *Paraburkholderia* species (Psp2, Psp5, Psp6 and *P. nodosa*) while neutral soils trapped more *Mesorhizobium* and *Cupriavidus*. Although some *Paraburkholderia* were also trapped in neutral soils, such as Psp1, Psp3 and Psp4, they were clearly separated by axis X and more related to site 1, while *Mesorhizobium* and *Cupriavidus* were related to site 4. *P. sabiae* was positioned in the center of axis X and seems to be less affected by soil pH.

BOX-PCR profiles of representative strains

Forty strains representing the six clades of potential new species of *Paraburkholderia*, according to the concatenated 16S rRNA-*recA* phylogeny, were selected for deeper analysis of their genomic diversity. Intra-genetic diversity was evaluated by the analysis of BOX-PCR, and 34 different profiles were obtained (Fig. 4). A cut-off value of 70.0% similarity, as suggested in previous studies when delineating groups in BOX-PCR analysis (Coenye *et al.* 2002; Grange and Hungria 2004; Kaschuk *et al.* 2006a,b; Menna *et al.* 2009) resulted in four major groups, in addition to strains occupying isolated positions. Strains also formed smaller subgroups with higher percentages of similarity and joined at a final level of similarity lower than 30%.

Multilocus sequence analysis (MLSA) of representative strains

To evaluate the taxonomic positions of the strains with higher accuracy, we selected more housekeeping genes and proceeded with a phylogenetic analysis and nucleotide-identity calculation. The selected taxonomic markers were *recA*, *gyrB*, *gltB*, *trpB* and *phaC*. Phylogenies were constructed with individual and concatenated gene fragments.

As shown in Figs. S2, S3, S4, S5 and S6 (Supporting information), the strains were clustered in six clades, supported by high bootstraps values. High nucleotide identities were observed within clades, contrasted by low nucleotide identities between the clades and the closest reference strains (Table S4, Supporting information). The groups formed with genes *recA* (Fig. S2, Supporting information), *gyrB* (Fig. S3, Supporting information), *gltB* (Fig. S4, Supporting information) *trpB* (Fig. S5, Supporting information) and *phaC* (Fig. S6, Supporting information) were the same as observed in the 16S rRNA-*recA* phylogeny (Fig. 2).

The concatenated tree (Fig. 5) was built with 39 strains (strain ABIP 242 was not included in the concatenated tree because we could not obtain its *gyrB* sequence) and the phylogeny resulted in the same six groups observed with each individual gene, with high bootstrap supports and high nucleotide identity (Table S4, Supporting information) among strains belonging to the same group. Strain STM 10739, isolated from a *P. vulgaris* nodule in soil 1, was the unique representative of Psp4.

Phylogeny of the *nodC* symbiotic gene

To infer the evolutionary relationships regarding symbiotic genes, a *nodC* phylogeny was constructed using partial sequences from all representative strains of *M. pudica* and *P. vulgaris* selected in the first characterization (α - and β -rhizobia). Again, phylogenies of α - and β -rhizobia are shown separately. As shown in the *nodC* phylogenetic tree in Fig. 6 (β -rhizobia) and Fig. S7 (α -rhizobia, Supporting information), the *nodC* sequences from almost all strains analyzed in our study formed the same clusters as in the 16S rRNA-*recA* and MLSA phylogenies, except for clade N1, which clustered strains from different species, and for *P. sabiae* strains, which clustered in different *nodC* clades.

Strains representing potential new species clustered in clades N1, N4 and N5 (Fig. 6). Clade N1 included strains from clades Psp1, Psp2, Psp3, Psp4 and *P. sabiae* strains; clade N4 strains from group Psp5 and clade N5 strains from group Psp6. Strains classified as *P. sabiae* in the 16S rRNA-*recA* phylogeny were positioned in clades N1, N2 and N6, and strains that belonged to the *P. nodosa* cluster were positioned in group N3. It is important to note that sequences from the *nodC* gene of *P. sabiae*, *P. nodosa*, *P. phenoliruptrix* and *C. necator* type strains were not available,

therefore, we used the partial sequences of strains STM 7319 (*P. sabiae*, Bontemps *et al.* 2010), BR3459a (*P. phenoliruptrix*, Zuleta *et al.* 2014), BR3470 (*P. nodosa*, Chen *et al.* 2007) and UFLA-0271 (*C. necator*, da Silva *et al.* 2012).

Discussion

An increasing number of studies with Legume-nodulating diazotrophic strains of bacteria has been performed in recent years, emphasizing their importance in terms of global N input, as well as other potential benefits such as degradation of xenobiotic compounds and production of phytohormones. In our survey, we used common bean (*P. vulgaris*) and mimosa (*M. pudica*) to trap rhizobia from six soil samples collected at different locations of the Mata Atlântica biome and we found that the majority belonged to *Paraburkholderia* species. *M. pudica* is a promiscuous legume from the Mimosoideae subfamily and has been successfully used to trap β -rhizobia (Bontemps *et al.* 2010; dos Reis *et al.* 2010; Bournaud *et al.* 2013; Bournaud *et al.* in press). Brazil is the main center of diversification of *Mimosa*, harboring more than 200 native and endemic species (Simon *et al.* 2011), therefore, it offers great potential for expanding our knowledge and understanding of symbiotic bacteria. Common bean is also a suitable model plant for studies of symbiotic bacteria, due to its promiscuity in nodulation with a variety of rhizobial species (Michiels *et al.* 1998; Grange and Hungria 2004; Alberton *et al.* 2006; Kaschuk *et al.* 2006b; Ribeiro *et al.* 2009, 2015; Oliveira *et al.* 2011; Aserse *et al.* 2012; Cardoso *et al.* 2012).

In our preliminary results, we identified 427 isolates at the genus level. We followed our investigation by selecting 84 representative strains that were

taxonomically characterized using a combined 16S-rRNA-*recA* phylogenetic analysis. At this point, we identified nine groups of β -rhizobia, represented by 67 strains of distinct *Paraburkholderia* species, seven of *Cupriavidus necator*, and one of α -rhizobia, represented by ten strains of *Mesorhizobium plurifarum*. It is noteworthy that *Mesorhizobium* was not found in fresh nodules collected from trees of the “*Piptadenia* group” in a previous study conducted in these areas (Bournaud *et al.* 2013).

A canonical analysis confirmed that soil pH significantly influenced bacterial diversity, especially in soils 1, 5 and 6. When comparing *M. pudica* and *P. vulgaris*, the most remarkable differences were observed in soils 5 and 6. The pHs of these soils were higher than at the other sites, and this may have contributed to the predominance of *C. necator* and *M. plurifarum* as reported before (Garau *et al.*, 2009; dos Reis *et al.* 2010; Klonowska *et al.* 2012; Mishra *et al.* 2012). Factors related to geographical conditions, soil disturbance, host plant and soil fertility can also affect species diversity, as seen in previous studies with leguminous plants in the tropics (Elliott *et al.* 2009; Garau *et al.* 2009; Bontemps *et al.* 2010; dos Reis Jr *et al.* 2010; Klonowska *et al.* 2012; Liu *et al.* 2012, 2014; Mishra *et al.* 2012; Lemaire *et al.* 2015; Dall’Agnol *et al.* 2016). In our study, the leguminous species originally grown in the bulk soil and the characteristics of site sampling (disturbed or undisturbed) may also have influenced bacterial diversity.

Mesorhizobium species are broadly distributed and adapted to various eco-climatic conditions, being able to nodulate and fix N₂ in root nodules of legumes of tropical, subtropical and temperate regions, and even in the Arctic (Chen *et al.* 2011). *M. plurifarum* has been found in legumes of distinct genera such as *Acacia*, *Leucaena*, *Prosopis*, *Chamaecrista* and *Lotus* (de Lajudie *et al.* 1998; Wang *et al.* 2003)

and also in the non-legume genus *Parasponia* (Op den Camp *et al.* 2012), but it has never been reported before as a symbiont of common bean. *M. plurifarium* has been reported as tolerant of several stressing conditions such as low soil pH and heat-shock (Laranjo and Oliveira 2011). The species can also be affected by rainfall distribution, as verified by Diouf *et al.* (2015) in their study of *Acacia*-symbiont diversity in Senegal, where *M. plurifarium* strains were found in regions of 500 to 900 mm of annual rainfall, but not under drought conditions.

In relation to *Cupriavidus*, we isolated 43 strains from one Mata Atlântica soil and, after building the concatenated 16S-rRNA-*recA* phylogeny with seven representative strains, we verified that they grouped with *C. necator* with 99% bootstrap support. There are few reports worldwide about *Cupriavidus* diversity. The genus has been isolated from *Mimosa* nodules in Taiwan (Chen *et al.* 2003a, 2005), India (Verma *et al.* 2004), Costa Rica (Barrett and Parker 2006), French Guiana (Mishra *et al.* 2012), New Caledonia (Klonowska *et al.* 2012) and in the USA (Andam *et al.* 2007), but in small percentage in comparison to *Paraburkholderia* species. There are only two reports of symbiotic *Cupriavidus* in Brazilian soils.

Florentino *et al.* (2009) isolated *Cupriavidus* strains from pastures in Minas Gerais State using common bean and *Leucaena leucocephala* as trapping hosts and a characterization of 32 of these isolates by da Silva *et al.* (2012) revealed that they belonged to the *C. necator* clade. *Cupriavidus* can tolerate high levels of copper (Cu) (Makkar and Casida 1987; Casida 1988) and its presence in soils of Minas Gerais State might be due to the high concentration of Cu in this region, resulting from mining activities (Oliveira and Costa 2004). According to Bontemps *et al.* (2010), da Silva *et al.* (2012) and Mishra *et al.* (2012), the association between *Cupriavidus* and

Mimosa represents an evolutionarily recent event and may have arisen due to horizontal gene transfer of nodulation genes from *Paraburkholderia*.

Regarding *Paraburkholderia*, we trapped *P. nodosa* and *P. sabiae*, which have also been found in previous studies in Brazilian soils, in the biomes of the Cerrado (Bontemps *et al.* 2010; dos Reis *et al.* 2010; Dall’Agnol *et al.* 2016) and Mata Atlântica (Bournaud *et al.* 2013). We also identified six potential new groups of *Paraburkholderia*—Psp1, Psp2, Psp3, Psp4, Psp5 and Psp6—highlighting how Mata Atlântica soils are richly diversified, albeit yet poorly known. Among these, Psp2 and Psp5 correspond to two new species isolated from nodules of *Piptadenia gonoacantha* at the same sites, for which the names *P. piptadeniae* and *P. ribeironis* have been proposed (Bournaud *et al.* in press). Curiously, *P. phymatum* and *P. tuberum*—which have been reported to nodulate common bean and *M. pudica* (Elliott *et al.* 2007; Talbi *et al.* 2010, 2013; Mishra *et al.* 2012) and are also found as free-living bacteria in soil—were not found in our survey.

To clarify the taxonomic positions of strains from the new clades, we selected other housekeeping genes and proceeded with an MLSA analysis. We used reference values suggested by Konstantinidis *et al.* (2006) for nucleotide identities and the same six groups were confirmed, exhibiting high nucleotide identity among them (>94% in single housekeeping gene phylogenies and > 96%, in concatenated phylogeny) and low nucleotide identity with reference strains, strongly indicating that these groups represent new species.

We have also analyzed the symbiotic relationships of representative strains through a *nodC* phylogeny. We observed that the majority of the clusters in the *nodC* phylogeny were congruent with the housekeeping gene-marker phylogenies, and all clusters had strong bootstrap support. As seen in previous studies (Bontemps *et al.*

2010, Mishra *et al.* 2012), most *nodC* phylogenies of *Paraburkholderia* showed congruence with taxonomic gene markers, indicating that nodulation in *Paraburkholderia* has a certain stability and vertical inheritance, with low levels of horizontal transfer. But we have also identified lateral transfer of *nodC* genes in *P. sabiae* strains, with *nodC* clustered in three different clades, as well as in several strains belonging to the putative new species identified (Psp1, Psp2=*P. piptadeniae*, Psp3, and some *P. sabiae*), which *nodC* clustered together in a new *nodC* clade (N1) in comparison to the study of Bournaud *et al.* (2013). Knowing that the Nod factors are key molecules, and that *nodC* is critical in the synthesis of these molecules, defining the specificity in the rhizobium-legume symbiosis (del Cerro *et al.*, 2015a,b), studies of *nodC* diversity are very important to help us understand aspects related to the co-evolution of microsymbionts and the host plants.

In our study, we have demonstrated that Mata Atlântica soils carry remarkable diversity in rhizobia, including potential new species of symbiotic *Paraburkholderia* and a new report on *Cupriavidus* occurrence in Brazilian soils. Mata Atlântica is amongst the biomes selected as priority for biodiversity protection, and by investigating symbiotic bacteria from this area we may be able to answer some questions about their frequency, predominance, evolution and compatible hosts. The diversity of β -rhizobia revealed in our study emphasizes how much remains to be discovered in terms of the diversity of these bacteria and their symbiotic relationships.

Funding

This work was funded by Institute of Research for development (IRD) through an internship at Laboratory of Tropical and Mediterranean Symbioses (Montpellier,

France), the French National Agency of Research ANR (ANR JCJC2009-BETASYM) and Embrapa (02.13.08.001.00.00).

Acknowledgements

R.F. Dall’Agnol acknowledges a PhD fellowships from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)-Embrapa. M. Hungria is also a research fellow from CNPq. The authors acknowledge LSTM staff for help in training and setting up experiments, Dr. Jesiane S. S. Batista, Renan A. Ribeiro, Jakeline R.M. Delamuta, Dafila S. L. Fagotti and Rubson N. R. Sibaldelli for helpful suggestions on the manuscript, and Dr. Allan R. J. Eaglesham for English review.

References

- Alavi P, Starcher MR, Thallinger GG, *et al.* *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC Genomics* 2014; **15**: 482.
- Andam CP, Mondo SJ, Parker MA. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texan and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts. *Appl Environ Microb*; 2007; **73**: 4686–4690.
- Angus AA, Agapakis CM, Fong S, *et al.* Plant-associated symbiotic *Burkholderia* species lack hallmark strategies required in mammalian pathogenesis. *PLoS One* 2014; **9**: e83779.
- Aserse AA. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Syst Appl Microb* 2012; **35**: 120–131.

- Barneby RC. Sensitivae Censitae: a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 1991; **65**: 1-835.
- Barrett CF, Parker MA. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 1198-1206.
- Braak CJF, Smilauer P. CANOCO Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows: Software for Canonical Community Ordination (version 4). Microcomputer Power, Ithaca, New York, 1998, 352 pp.
- Bontemps C, Elliott GN, Simon MF, et al. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Mol Ecol* 2010; **19**: 44-52.
- Bournaud C, de Faria SM, dos Santos JMF, et al. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the piptadenia group (tribe mimoseae). *PLoS One* 2013; **8**: e63478.
- Bournaud C, Moulin L, Cnockaert M, et al. *Paraburkholderia piptadeniae* sp. nov. and *Paraburkholderia ribeironis* sp. nov., two root-nodulating symbiotic species of *Piptadenia gonoacantha* in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol*, in press.
- Cardoso JD, Hungria M, Andrade DS. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Appl Microbiol Biotech* 2012; **93**: 2035-2049.
- Casida LE Jr. Response in soil of *Cupriavidus necator* and other copper-resistant bacterial predators of bacteria to addition of water, soluble nutrients, various bacterial species, or *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *Appl Environ Microbiol* 1988; **54**:2161-2166.

- Chen WM, Laevens S, Lee TM, *et al.* *Ralstonia taiwanensis* sp nov isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Micr* 2011; **51**: 1729–1735.
- Chen WM, de Faria SM, Chou JH, *et al.* *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *Int J Syst Evol Micr* 2008; **58**: 2174–2179.
- Chen WM, Moulin M, Bontemps C, *et al.* Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol* 2003b; **185**: 7266–7272.
- Chen WM, James EK, Chou JH, *et al.* β -Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytol* 2005; **168**: 661–675.
- Chen WM, James EK, Prescott AR, *et al.* Nodulation of *Mimosa* spp. by the β -proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2003a; **16**: 1051–1061.
- Chen WM, James EK, Coenye T, *et al.* *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; **56**: 1847–1851.
- Chen WM, De Faria SM, James EK, *et al.* *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007; **57**: 1055–1059.
- Chen WM, Zhu WF, Bontemps C, *et al.* *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011; **61**: 574–579.
- Chen Y, Schröder I, French CT, *et al.* Characterization and analysis of the *Burkholderia pseudomallei* BsaN virulence regulon. *BMC Microbiol* 2014; **14**: 1.

Climate-Data.org - Dados climáticos para cidades mundiais. Available at <http://pt.climate-data.org/>. Accessed on Jul 2016.

Coenye T, Henry D, Speert DP, *et al.* *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. *Syst Appl MicrobSyst Appl Microb* 2004; **27**: 623-627.

Dall'Agnol RF, Plotegher F, Souza RC, *et al.* *Paraburkholderia nodosa* is the main N₂ - fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian "Cerradão." *FEMS Microbiol Ecol* 2016; **92**. fiw108. <http://doi.org/10.1093/femsec/fiw108>.

da Silva K, Florentino LA, da Silva KB, *et al.* *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. *Syst Appl Microbiol* 2012; **35**: 175–182.

de Lajudie P, Willems A, Nick G, *et al.* Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1998; **48**: 369–382.

de Meyer SE, Cnockaert M, Ardley JK, *et al.* *Burkholderia rhynchosiae* sp. nov., isolated from *Rhynchosia ferulifolia* root nodules. *J Syst Evol Microb* 2013; **63**: 3944-3949.

de Meyer SE, Cnockaert M, Ardley JK, *et al.* *Burkholderia sprentiae* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. *Int J Syst Evol Microb* 2013; **63**: 3950–7.

de Meyer SE, Cnockaert M, Ardley JK, *et al.* *Burkholderia dilworthii* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. *J Syst Evol Microb* 2014; **64**: 1090-1095.

del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF, *et al.* Regulatory nodD1 and nodD2 genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. *BMC Genomics* 2015a; **16**: 1.

- del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF, *et al.* Opening the “black box” of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. *BMC Genomics* 2015b; **16**: 864.
- Dhillion SS, Camargo-Ricalde SL. The cultural and ecological roles of *Mimosa* species in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Economic Botany* 2005; **59**: 390 – 394.
- Diouf F, Diouf D, Klonowska A, *et al.* Genetic and genomic diversity studies of *Acacia* symbionts in Senegal reveal new species of *Mesorhizobium* with a putative geographical pattern. *PLoS ONE* 2015; **10**: 1-20.
- Dobritsa AP, Samadpour M. Transfer of eleven *Burkholderia* species to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov., a new genus to accommodate twelve species of *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *Int J System Evol Microb* 2016. doi: 10.1099/ijsem.0.001065.
- dos Reis Jr FB, Simon MF, Gross E, *et al.* Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytol* 2010; **186**: 934-946.
- Eberl L, Vandamme P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Res.* 2016 May 26;5. pii: F1000 Faculty Rev-1007. doi: 10.12688/f1000research.8221.1. e Collection 2016. Review.
- Edgar R. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 1792–1797.
- Elliott GN, Chou JH, Chen WM, *et al.* *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. *Environ Microbiol* 2009; **11**: 762-778.
- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 1981; **17**: 368-376.

- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 783-791.
- Fernandes MF, Fernandes RPM, Hungria M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. *Pesq Agropec Bras* 2003; **38**: 911-920.
- Florentino LA, Guimarães AP, Rufini M, *et al.* *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. *Sci Agric* 2009; **66**: 667-676.
- Estrada-de Los Santos P, Vinuesa P, Martínez-Aguilar L, *et al.* Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Curr Microbiol* 2013; **67**: 51-60.
- Fonseca GAB. The vanishing Brazilian Atlantic forest. *Biol Cons* 1985; **34**: 17-43.
- Franco AA, Faria SM. The contribution of N₂ - fixing legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biol Biochem* 1997; **29**: 897 - 903.
- Garau G, Yates RJ, Deiana P, *et al.* Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. *Soil Biol Biochem* 2009; **41**: 125-134.
- Gonçalves NZ, Diniz S. Diversidade de interações micróbio-planta e processos ecossistêmicos. In: Seminário de Ecologia de Comunidades e Ecossistemas, 2008, Campinas. UNICAMP.
- Grange L, Hungria M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biol Biochem* 2004; **36**: 1389-1398.
- Grether R. Nomenclatural changes in the genus *Mimosa* (Fabaceae, Mimosoideae) in southern Mexico and Central America. *Novon* 2000; **10**: 29-37.

- Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, *et al.* Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol Plant Microbe Interact* 2011; **24**: 1276-1288.
- Hedges SB. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol Biol Evol* 1992; **9**: 366-369.
- Jaccard P. The distribution of flora in the alpine zone. *New Phytologist* 1912; **11**: 37– 50.
- Jobson RW, Luckow M. Phylogenetic Study of the genus *Piptadenia* (Mimosoideae: Leguminosae) using plastid *trnL-F* and *trnK/matK* sequence data. *Syst Bot* 2007; **32**: 569–575.
- Kaschuk G, Hungria M, Andrade D, *et al.* Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *App Soil Ecol* 2006a; **32**: 210-220.
- Kaschuk G, Hungria M, Santos JCP, *et al.* Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. *Soil Till Res* 2006b **87**: 205-217.
- Klonowska A, Chaintreuil C, Tisseyre P, *et al.* Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. *FEMS Microbiol Ecol* 2012; **81**: 618–635.
- Koeth T, Versalovic J, Lupski JR. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res* 1995; **5**: 408-418.

- Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 7286-7293.
- Laranjo M, Oliveira S. Tolerance of *Mesorhizobium* type strains to different environmental stresses. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 2011; **99**: 651–662.
- Liu XY, Wu W, Wang ET, *et al.* Phylogenetic relationships and diversity of β -rhizobia associated with *Mimosa* species grown in Sishuangbanna, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011; **61**: 334–342.
- Liu X, Wei S, Wang F, *et al.* *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in southern China. *FEMS Microbiol Ecol* 2012; **80**: 417-426.
- Liu WYY, Ridgway HJ, James TK, *et al.* *Burkholderia* sp. induces functional nodules on the South African invasive legume *Dipogon lignosus* (Phaseoleae) in New Zealand soils. *Microb Ecol* 2014; **68**: 542–555.
- Luckow M. Tribe Mimoseae. IN: Lewis G, Schrire BD, Mackender B, Lock M. (Eds.). Legumes of the World. *Roy Bot Gard* 2005: 163-183.
- Makkar NS, Casida LEJr. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int J Syst Bacteriol* 1987; **37**: 323–326.
- Martínez-Aguilar L, Salazar-Salazar C, Méndez RD, *et al.* *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2014; **104**: 1063-1071.
- Martinez-Romero E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil* 2003; **252**: 11–23.

- Mavengere NR, Ellis AG, Le Roux JJ. *Burkholderia aspalathi* sp. nov., isolated from root nodules of the South African legume *Aspalathus abietina* Thunb. *Int J Syst Bacteriol* 2014; **64**: 1906-1912.
- Menna P, Pereira AA, Bangel EV, et al. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis* 2009; **48**: 120-130.
- Michiels J, Dombrecht B, Vermeiren N, et al. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiol Ecol* 1998; **26**: 193-205.
- Mishra RP, Tisseyre P, Melkonian R, et al. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. *FEMS Microbiol Ecol* 2012; **79**: 487-503.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. Available at: <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>. Accessed on March 2015.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B, et al. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 2001; **411**: 948-950.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000; **403**: 853-858.
- Nicholas K, Nicholas B. *Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments*. Distributed by the authors. n.d.
- Oliveria TS, Costa LM. Metais pesados em solos de uma topolitossequência do triângulo mineiro. *Rev Bras Ci Solo* 2004; **28**:785-796.
- Op den Camp RHM, Polone E, Fedorova E, et al. Non-legume *Parasponia andersonii* deploys a broad rhizobium host range strategy resulting in largely variable symbiotic effectiveness. *Mol Plant Microbe Interact* 2012; **25**: 954-963.

- Oren A, Garrity GM. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; **65**: 2028-2029.
- Ribeiro RA, Barcellos FG, Thompson FL, *et al.* Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res Microbiol* 2009; **160**: 297-306.
- Ribeiro RA, Martins TB, Ormeño-Orrillo E, *et al.* *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; **65**: 3162-3169.
- Sawana A, Adeolu M, Gupta RS. 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. *Front Genetics* 2014; **5**: 1-22.
- Sheu SY, Chou JH, Bontemps C, *et al.* *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; **63**: 435-441.
- Sheu SY, Chou JH, Bontemps C, *et al.* *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil *Int J Syst Evol Microbiol* 2012; **62**: 2272-2278.
- Simon MF. *Systematics and evolution of Mimosa L. (Leguminosae) and the assembly of a Neotropical plant diversity hotspot*. Doctoral Thesis, University of Oxford, Oxford, 2008.
- Simon MF, Grether R, Queiroz LP, *et al.* The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): towards a phylogeny of the sensitive plants. *Am J Bot* 2011; **98**: 1201-1221.

- Sneath PHA, Sokal RR. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W.H. Freeman & Co, 1973. 573 p.
- Talbi C, Delgado MJ, Girard L, *et al.* *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. *Appl Environ Microb* 2010; **76**: 4587–4591.
- Talbi C, Argandona M, Salvador M, *et al.* *Burkholderia phymatum* improves salt tolerance of symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Soil* 2013; **367**: 673–685.
- Tamura K, Nei M Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993; **10**: 512-526.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; mst197.
- Velázquez E, Martínez-Romero E, Rodríguez-Navarro DN, *et al.* Characterization of rhizobial isolates of *Phaseolus vulgaris* by staircase electrophoresis of low-molecular-weight RNA. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**: 1008-1010.
- Vandamme P, Goris J, Chen WM, *et al.* *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst Appl Microb* 2002; **25**: 507-512.
- Vandamme P, Peeters C. Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2014; **106**: 57–65.
- Verma SC, Chowdhury SP, Tripathi AK. Phylogeny based on 16S rDNA and *nifH* sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica*, in India. *Can J Microbiol* 2004; **50**: 313–322.

- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn F, *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* 1994; **5**: 25-40.
- Wang ET, Kan FL, Tan ZY, *et al.* Diverse *Mesorhizobium plurifarum* populations native to Mexican soils. *Arch Microbiol* 2003; **180**: 444–454.
- WCMC-World Conservation Monitoring Centre. *Global biodiversity: status of the Earths living resources*. London: Chapman, Hall, 1992.
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, p. 241–245. New York, USA: John Wiley & Sons, 1987.
- Zuleta LF, de Cunha C, de Carvalho FM, *et al.* The complete genome of *Burkholderia phenoliruptrix* strain BR3459a, a symbiont of *Mimosa flocculosa*: highlighting the coexistence of symbiotic and pathogenic genes. *BMC Genomics* 2014; **15**: 535.

Table 1

Site sampling characteristics of soils chosen for this study.

Species originally grown in the bulk soil	Soil	pH	Site	Location	Forest Fragment
<i>Piptadenia paniculata</i>	1	6,5	1	Rio das Ostras	Undisturbed
<i>Parapiptadenia pterosperma</i>	2	5,1	2	Búzios	Undisturbed
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	3	5,5	3	Búzios	Undisturbed
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	4	5,0	3	Búzios	Undisturbed
<i>Anadenanthera peregrina</i>	5	6,8	4	Seropédica	Disturbed
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	6	7,1	4	Seropédica	Disturbed

Table 2

Number of isolates and percentage of strains genus trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica).

Soils	<i>M. pudica</i> = 219 isolates			<i>P. vulgaris</i> = 208 isolates		
	<i>Paraburkholderia</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Paraburkholderia</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>Mesorhizobium</i>
1	47	0	0	44	0	0
2	38	0	0	36	0	0
3	41	0	0	37	0	0
4	46	0	0	34	0	0
5	5	0	1	0	0	18
6	0	41	0	0	2	37
Total	177 (80.8%)	41 (18.7%)	1 (0.5%)	151 (72.6%)	2 (0.9%)	55 (26.4%)

Legend of Figures

Fig. 1. Map of Rio de Janeiro State, showing the four sites of soil sampling.

Fig. 2. Concatenated phylogenetic tree of 16S rDNA-*recA* genes based on a 1197 bp alignment of *Paraburkholderia* strains trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica) and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. Soil number is indicated in parenthesis. Species originally grown in the bulk soil: Ppan= *Piptadenia paniculata*; Pg = *Piptadenia gonoacantha*; Ppt = *Parapiptadenia pterosperma*; Ap = *Anadenantera peregrina*; Trap-host plant: Mp = *Mimosa pudica*; Phv = *Phaseolus vulgaris*.

Figure 3: A) Canonical analysis based on bacterial species, soil pH and the sampling sites (soils 1 to 6, trapped with *Mimosa pudica*, MP and *Phaseolus vulgaris*, PV). Axis 1 = 18.4 %; Axis 2 = 23.2 %. B) Ordination plot showing pH values. White and grey circles represent *M. pudica* and *P. vulgaris* symbionts, respectively. Plots were built with Canoco for Windows 4.5.

Fig. 4. BOX-PCR profiles of representative strains of *Paraburkholderia* trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). Dendogram was built with the Bionumerics software using the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient with 3% of tolerance. PGI, PGII, PGIII and PGIV = *Paraburkholderia* Group I to IV.

Fig. 5. Concatenated phylogenetic tree of *recA*, *gyrB*, *trpB*, *gltB* and *phaC* genes, based on 2865 bp alignment of representative strains of *Paraburkholderia* trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica) and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of

nucleotide substitutions. Soil number is indicated in parenthesis. Species originally grown in the bulk soil: Ppan= *Piptadenia paniculata*; Pg = *Piptadenia gonoacantha*; Ppt = *Parapiptadenia pterosperma*; Ap = *Anadenantera peregrina*; Trap-host plant: Mp = *Mimosa pudica*; Phv = *Phaseolus vulgaris*.

Fig. 6. Phylogenetic tree of *nodC* gene based on a 426 bp alignment of representative strains of *Paraburkholderia* trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica) and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. Soil number is indicated in parenthesis. Species originally grown in the bulk soil: Ppan= *Piptadenia paniculata*; Pg = *Piptadenia gonoacantha*; Ppt = *Parapiptadenia pterosperma*; Ap = *Anadenantera peregrina*; Trap-host plant: Mp = *Mimosa pudica*; Phv = *Phaseolus vulgaris*. *not type strains.

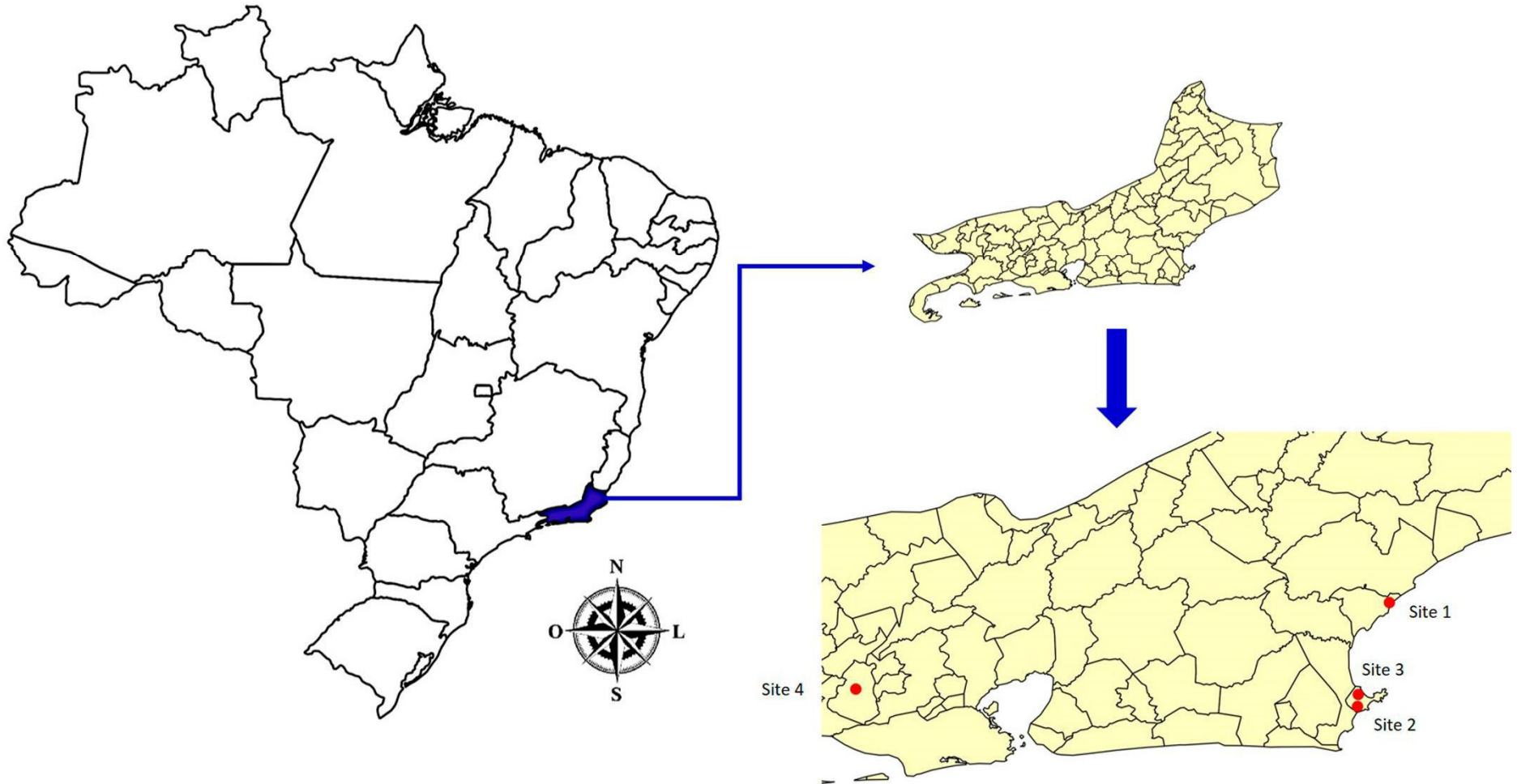


Fig. 1

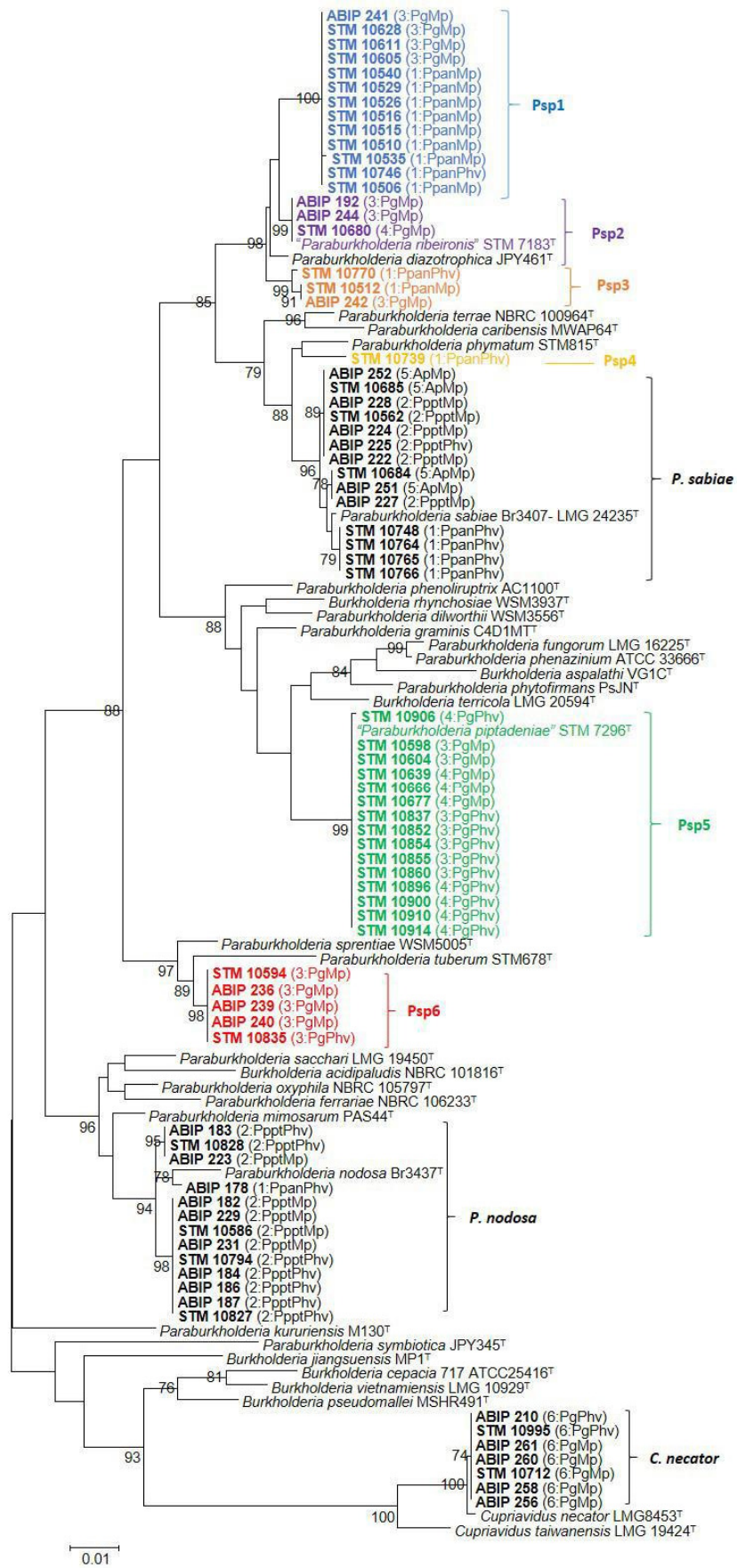


Fig. 2

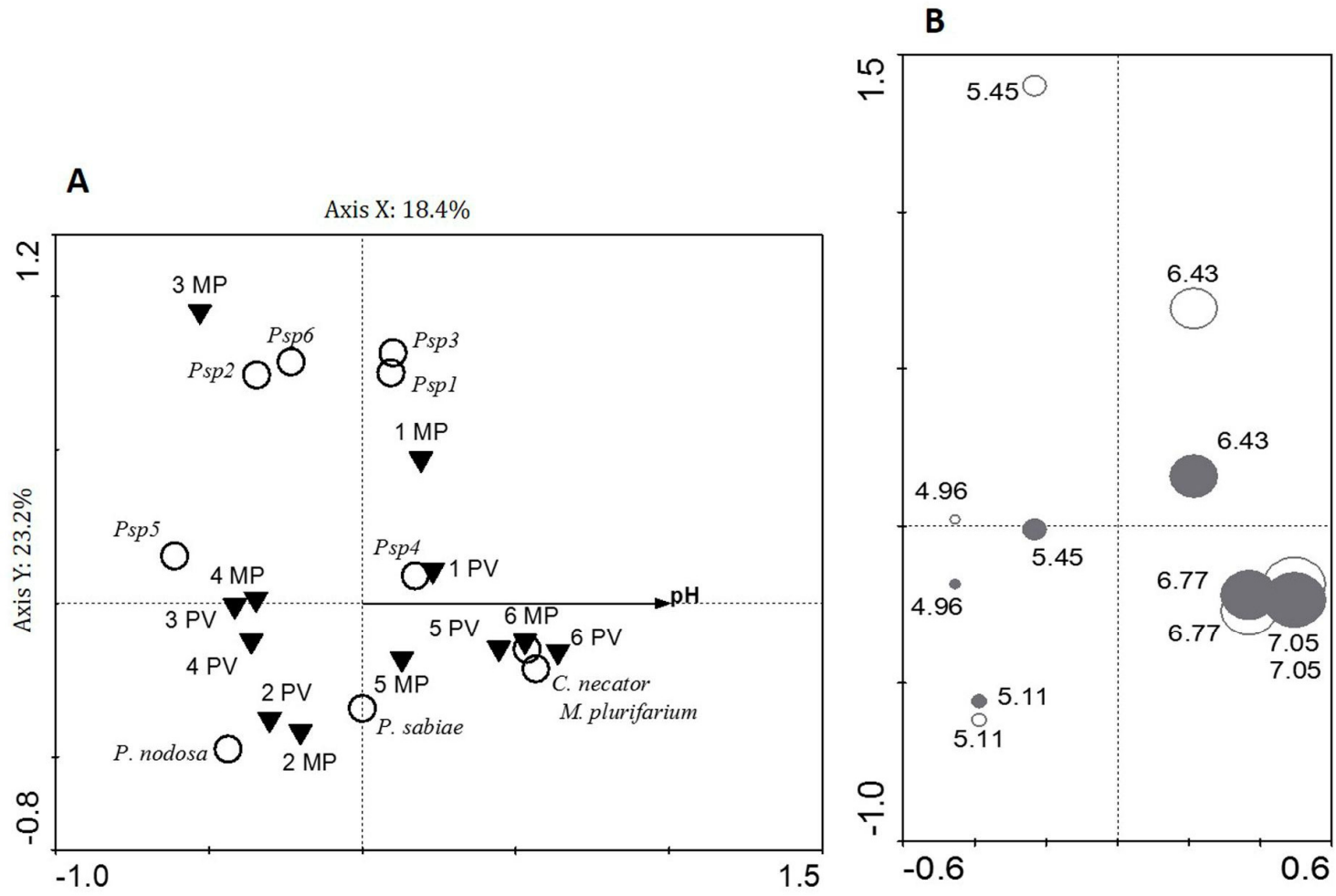


Fig. 3

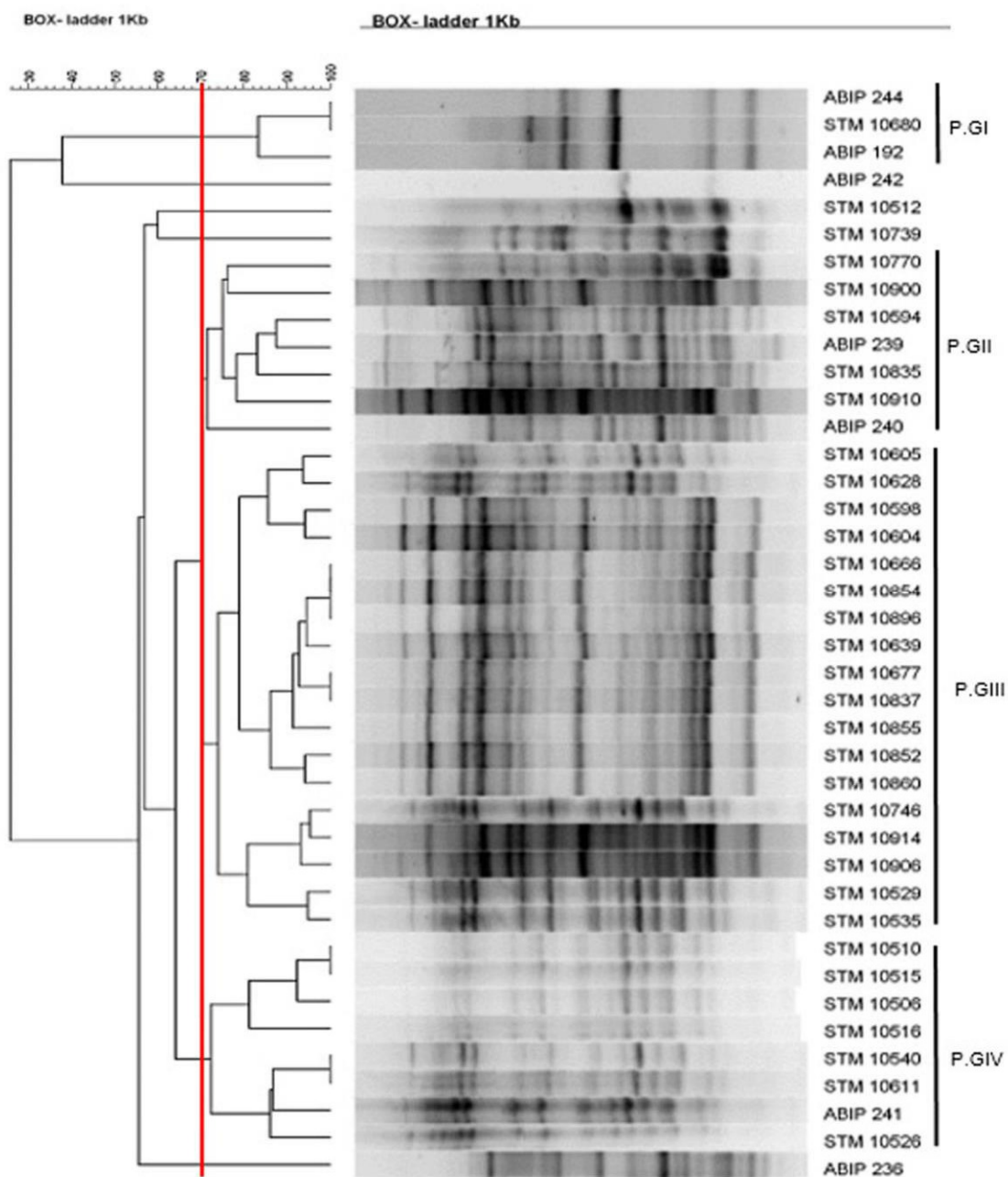


Fig. 4

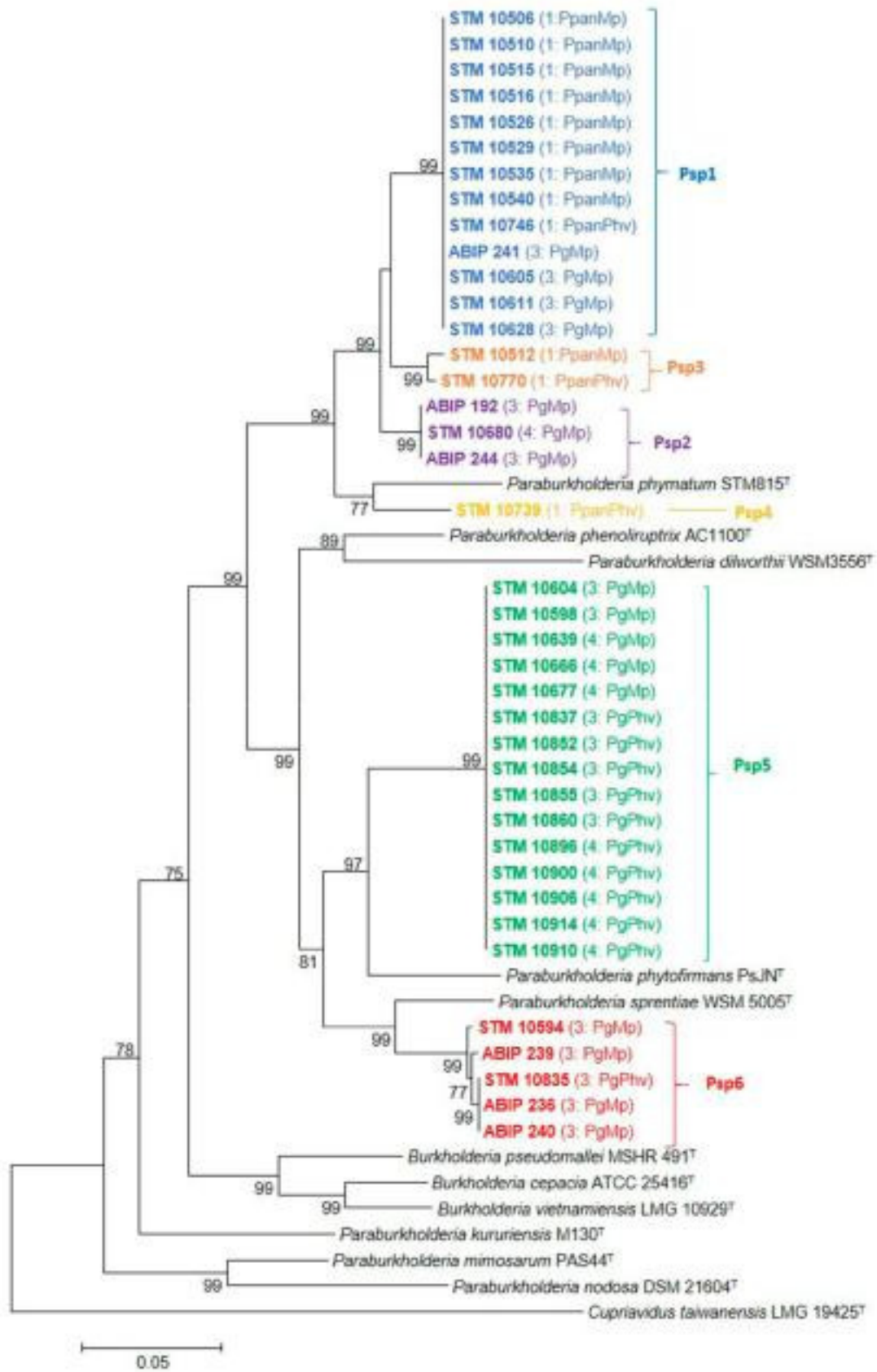


Fig. 5

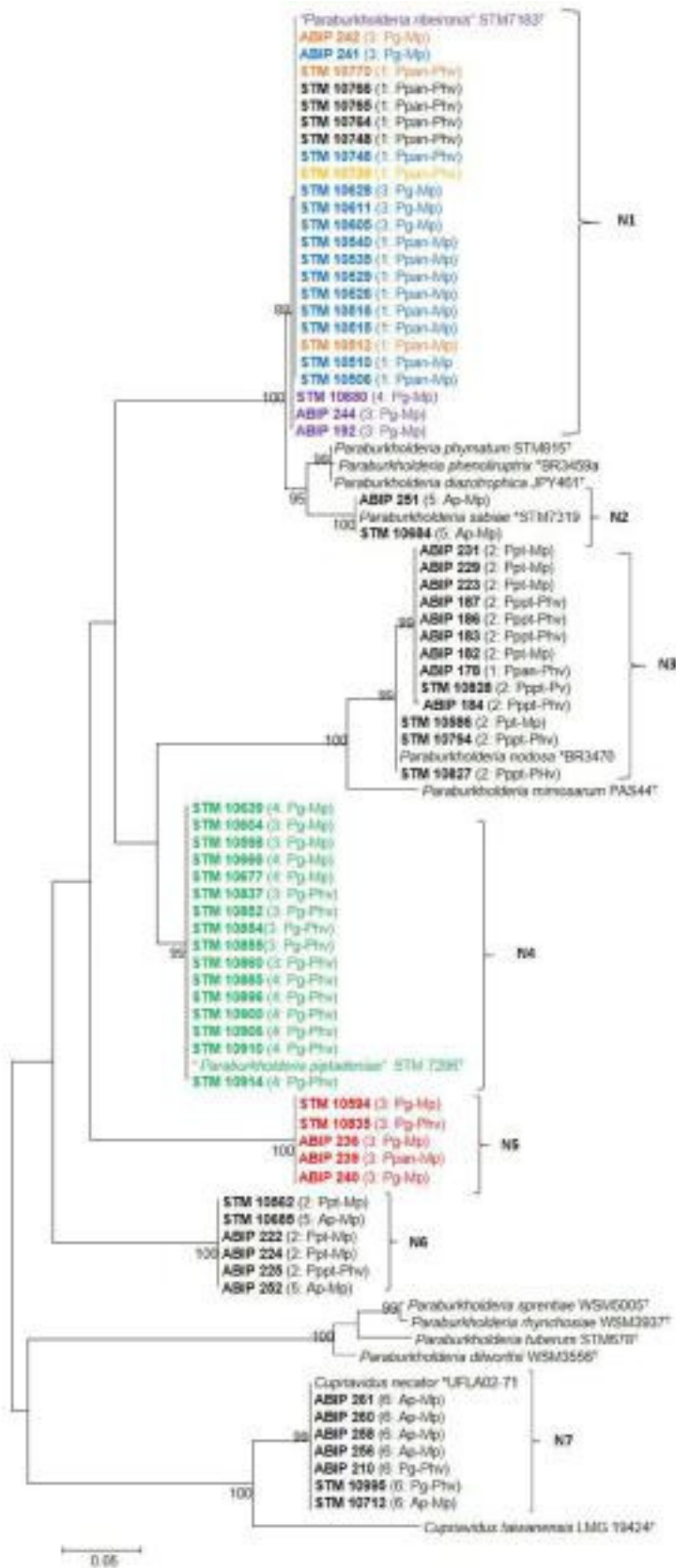


Fig. 6

Table S1

Bacterial collection, taxonomic classification and site sampling of strains used in this study.

STRAIN	CLASSIFICATION (16SrRNA- <i>recA</i>)	NODC CLADE	SPECIES ORIGINALLY GROWN IN BULK SOIL	TRAPPING	SOIL/ SITE	LOCATION	PH	REFERENCE
STM 10506	Psp1	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>M. pudica</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10510	Psp1	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>M. pudica</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10512	Psp3	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>M. pudica</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10515	Psp1	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>M. pudica</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10516	Psp1	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>M. pudica</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10526	Psp1	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>M. pudica</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10529	Psp1	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>M. pudica</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10535	Psp1	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>M. pudica</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10540	Psp1	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>M. pudica</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10739	Psp4	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>P. vulgaris</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10746	Psp1	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>P. vulgaris</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10748	<i>P. sabiae</i>	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>P. vulgaris</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10764	<i>P. sabiae</i>	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>P. vulgaris</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10765	<i>P. sabiae</i>	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>P. vulgaris</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10766	<i>P. sabiae</i>	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>P. vulgaris</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
ABIP 178	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. paniculata</i>	<i>P. vulgaris</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
STM 10770	Psp3	N1	<i>P. paniculata</i>	<i>P. vulgaris</i>	1/1	Rio das Ostras	6,4	this study
ABIP 222	<i>P. sabiae</i>	N6	<i>P. pterosperma</i>	<i>M. pudica</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 223	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>M. pudica</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 224	<i>P. sabiae</i>	N6	<i>P. pterosperma</i>	<i>M. pudica</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 182	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>M. pudica</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
STM 10562	<i>P. sabiae</i>	N6	<i>P. pterosperma</i>	<i>M. pudica</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 227	<i>P. sabiae</i>	-	<i>P. pterosperma</i>	<i>M. pudica</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 228	<i>P. sabiae</i>	-	<i>P. pterosperma</i>	<i>M. pudica</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 229	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>M. pudica</i>	2/2	Búzios	5,1	this study

STM 10586	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>M. pudica</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 231	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>M. pudica</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
STM 10794	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>P. vulgaris</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 225	<i>P. sabiae</i>	N6	<i>P. pterosperma</i>	<i>P. vulgaris</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 183	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>P. vulgaris</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 184	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>P. vulgaris</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 186	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>P. vulgaris</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
ABIP 187	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>P. vulgaris</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
STM 10827	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>P. vulgaris</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
STM 10828	<i>P. nodosa</i>	N3	<i>P. pterosperma</i>	<i>P. vulgaris</i>	2/2	Búzios	5,1	this study
STM 10594	Psp6	N5	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10598	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10604	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10605	Psp1	N1	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
ABIP 236	Psp6	N5	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
ABIP 192	Psp2	N1	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10611	Psp1	N1	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
ABIP 239	Psp6	N5	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
ABIP 240	Psp6	N5	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
ABIP 241	Psp1	N1	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
ABIP 242	Psp3	N1	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10628	Psp1	N1	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
ABIP 244	Psp2	N1	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10835	Psp6	N5	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10837	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10852	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10854	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10855	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10860	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	3/3	Búzios	5,5	this study
STM 10639	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	4/3	Búzios	5,0	this study

STM 10666	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	4/3	Búzios	5,0	this study
STM 10677	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	4/3	Búzios	5,0	this study
STM 10680	Psp2	N1	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	4/3	Búzios	5,0	this study
STM 10896	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	4/3	Búzios	5,0	this study
STM 10900	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	4/3	Búzios	5,0	this study
STM 10906	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	4/3	Búzios	5,0	this study
STM 10910	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	4/3	Búzios	5,0	this study
STM 10914	Psp5	N4	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	4/3	Búzios	5,0	this study
ABIP 256	<i>C. necator</i>	N7	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
ABIP 258	<i>C. necator</i>	N7	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
STM 10712	<i>C. necator</i>	N7	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
ABIP 260	<i>C. necator</i>	N7	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
ABIP 261	<i>C. necator</i>	N7	<i>P. gonoacantha</i>	<i>M. pudica</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
ABIP 210	<i>C. necator</i>	N7	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
STM 10995	<i>C. necator</i>	N7	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
STM 10976	<i>M. plurifarium</i>	MP	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
STM 10981	<i>M. plurifarium</i>	MP	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
STM 10997	<i>M. plurifarium</i>	MP	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
STM 11005	<i>M. plurifarium</i>	-	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
STM 11006	<i>M. plurifarium</i>	MP	<i>P. gonoacantha</i>	<i>P. vulgaris</i>	6/4	Seropédica	7,1	this study
ABIP 251	<i>P. sabiae</i>	N2	<i>A. peregrina</i>	<i>M. pudica</i>	5/4	Seropédica	6,8	this study
ABIP 252	<i>P. sabiae</i>	N6	<i>A. peregrina</i>	<i>M. pudica</i>	5/4	Seropédica	6,8	this study
STM 10684	<i>P. sabiae</i>	N2	<i>A. peregrina</i>	<i>M. pudica</i>	5/4	Seropédica	6,8	this study
STM 10685	<i>P. sabiae</i>	N6	<i>A. peregrina</i>	<i>M. pudica</i>	5/4	Seropédica	6,8	this study
STM 10687	<i>M. plurifarium</i>	MP	<i>A. peregrina</i>	<i>M. pudica</i>	5/4	Seropédica	6,8	this study
STM 10942	<i>M. plurifarium</i>	-	<i>A. peregrina</i>	<i>P. vulgaris</i>	5/4	Seropédica	6,8	this study
ABIP 206	<i>M. plurifarium</i>	MP	<i>A. peregrina</i>	<i>P. vulgaris</i>	5/4	Seropédica	6,8	this study
STM 10949	<i>M. plurifarium</i>	MP	<i>A. peregrina</i>	<i>P. vulgaris</i>	5/4	Seropédica	6,8	this study
STM 10960	<i>M. plurifarium</i>	-	<i>A. peregrina</i>	<i>P. vulgaris</i>	5/4	Seropédica	6,8	this study

Table S2. Primers and PCR conditions used in this study.

GENE	PRIMER	SEQUENCE 5'-3'	*LENGTH	PCR CONDITIONS	REFERENCE
16S rDNA	FGPS-1509	5' - GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG -	764 bp	5 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 56°C, 1 min 72°C), 7 min 72°C	Normand <i>et al.</i> (1992)
	FGPS-6	3' 5' - AAGGAGGGGATCCAGCCGCA - 3'			
<i>recA</i>	recA-Burk1F	5' - GATCGARAAGCAGTTCGGCAA - 3'	443 bp	5 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C, 45 72°C), 7 min 72°C	Bontemps <i>et al.</i> (2010)
	recA-Burk1R	5' - TTGTCCTTGCCTGRCCGAT - 3'			
	recA-BurkF	5' - AGGACGATTCATGGAAGAWAGC - 3'			
	recA-BurkR	5' - GACGCACYGAYGMRTAGAACTT - 3'			
	recA-Meso41F	5' - TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG - 3 3'			
	recA-Meso640R	- ACATSACRCCGATCTTCATGC - 3	353 bp	Vinuesa <i>et al.</i> (2005)	
<i>gyrB</i>	gyrB-BurkF	5' - ACCGGTCTGCAYCACCTCGT - 3'	587 bp	2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C, 1min 72°C), 5 min 72°C	Spilker <i>et al.</i> (2009)
	gyrB-BurkR	5' - YTCGTTGWARCTGTCTCCACTGC - 3'			
<i>gltB</i>	gltB-BurkF	5' - CTGCATCATGATGCGCAAGTG - 3'	624 bp	2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C, 1min 72°C), 5 min 72°C	Spilker <i>et al.</i> (2009)
	gltB-BurkR	5' - CITGCCGCGGAARTCGTTGG - 3'			
<i>trpB</i>	trpB-BurkF	5' - CGCGYTTCCGGVATGGARTG - 3'	703 bp	2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C, 1min 72°C), 5 min 72°C	Spilker <i>et al.</i> (2009)
	trpB-BurkR	5' - ACSGTRTGCATGTCCTTGTCG -			
<i>phaC</i>	phaC-BurkF	3' 5' - GCACSAGYATYTGCCAGCG - 3'	507 bp	2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C, 1min 72°C), 5 min 72°C	Spilker <i>et al.</i> (2009)
	phaC-BurkR	5' - CCATSTCSGTRCCRATGTAGCC - 3'			
<i>nodC</i>	nodC-BurkPipF	5' - T(GA)AT(CT)GA(TC)ATGGAATACTGGC - 3'	426 bp	5 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 55°C, 45s 72°C), 7 min 72°C	Bournaud <i>et al.</i> (2013)
	nodC-BurkPipR	5' - CAGCGGA(CT)AT(CA)GTCATTGA - 3'			
	Cuptaiw-nodC468F	5' - TACTCAAGATGCGGGACAGA - 3'			
	Cuptaiw-nodC1231R	5' - CCGGAGATTCGGATGATGGA - 3'			
	nodC-Meso540F	5' - TGATYGAYATGGARTAYTGGCT - 3'			
	nodC-Meso1160R	5' - CGYGACARCCARTCGCTRRTG - 3'	494 bp	Sarita <i>et al.</i> (2005)	
BOX-PCR	AIR1	5' - ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC - 3'	-	7 min 94°C, 35 x (1min 94°C, 1min 52°C, 8 min 72°C) 16min 65°C	Versalovic <i>et al.</i> (1994)

*Sequence alignment length.

References

- Bontemps C, Elliott GN, Simon MF, *et al.* *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Mol Ecol* 2010; 19: 44-52.
- Bournaud C, de Faria SM, dos Santos JMF, *et al.* *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the *Piptadenia* group (tribe Mimoseae). *PLoS One* 2013; **8**: e63478.
- Normand P, Cournoyer B, Simonet P, *et al.*. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete Frankia. *Gene* 1992; **111**: 119-124.
- Sarita S, Sharma PK, Priefer UB, *et al.* Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 2005; **54**: 1-11.
- Spilker T, Baldwin A, Bumford A, *et al.* Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 2607-2610.
- Vinuesa P, Silva C, Lorite MJ, *et al.* Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst Appl Microbiol* 2005; **28**: 702-716.

Table S3

GenBank accession numbers for sequences of beta-rhizobia (*Paraburkholderia* and *Cupriavidus*) and alpha-rhizobia (*Mesorhizobium*) strains used in this study and of reference/type strains.

	ACCESSION NUMBERS						
	16SrRNA	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gltB</i>	<i>trpB</i>	<i>phaC</i>	<i>nodC</i>
BETA-RHIZOBIA STRAINS							
ABIP 178	KX814539	KX814821	-	-	-	-	KX814697
ABIP 182	KX814468	KX814750	-	-	-	-	KX814631
ABIP 183	KX814510	KX814792	-	-	-	-	KX814671
ABIP 184	KX814511	KX814793	-	-	-	-	KX814672
ABIP 186	KX814512	KX814794	-	-	-	-	KX814673
ABIP 187	KX814513	KX814795	-	-	-	-	KX814674
ABIP 192	KX814479	KX814761	KX814618	KX814579	KX814861	KX814737	KX814640
ABIP 210	KX814528	KX814810	-	-	-	-	KX814689
ABIP 222	KX814465	KX814747	-	-	-	-	KX814628
ABIP 223	KX814466	KX814748	-	-	-	-	KX814629
ABIP 224	KX814467	KX814749	-	-	-	-	KX814630
ABIP 225	KX814509	KX814791	-	-	-	-	KX814670
ABIP 227	KX814474	KX814756	-	-	-	-	-
ABIP 228	KX814469	KX814752	-	-	-	-	-
ABIP 229	KX814471	KX814753	-	-	-	-	KX814633
ABIP 231	KX814472	KX814755	-	-	-	-	KX814635
ABIP 236	KX814478	KX814760	KX814592	KX814552	KX814834	KX814710	KX814639
ABIP 239	KX814482	KX814764	KX814595	KX814555	KX814837	KX814713	KX814643
ABIP 240	KX814483	KX814765	KX814596	KX814556	KX814838	KX814714	KX814644
ABIP 241	KX814484	KX814766	KX814597	KX814557	KX814839	KX814715	KX814645
ABIP 242	KX814485	KX814767	-	KX814558	KX814840	KX814716	KX814646
ABIP 244	KX814487	KX814769	KX814599	KX814560	KX814842	KX814718	KX814648
ABIP 251	KX814495	KX814777	-	-	-	-	KX814656
ABIP 252	KX814493	KX814775	-	-	-	-	KX814654
ABIP 256	KX814496	KX814778	-	-	-	-	KX814657
ABIP 258	KX814497	KX814779	-	-	-	-	KX814658
ABIP 260	KX814499	KX814781	-	-	-	-	KX814660
ABIP 261	KX814500	KX814782	-	-	-	-	KX814661
STM 10506	KX814456	KX814738	KX814580	KX814540	KX814822	KX814698	KX814619
STM 10510	KX814457	KX814739	KX814581	KX814541	KX814823	KX814699	KX814620

STM 10512	KX814458	KX814740	KX814582	KX814542	KX814824	KX814700	KX814621
STM 10515	KX814459	KX814741	KX814583	KX814543	KX814825	KX814701	KX814622
STM 10516	KX814460	KX814742	KX814584	KX814544	KX814826	KX814702	KX814623
STM 10526	KX814461	KX814743	KX814585	KX814545	KX814827	KX814703	KX814624
STM 10529	KX814462	KX814744	KX814586	KX814546	KX814828	KX814704	KX814625
STM 10535	KX814463	KX814745	KX814587	KX814547	KX814829	KX814705	KX814626
STM 10540	KX814464	KX814746	KX814588	KX814548	KX814830	KX814706	KX814627
STM 10562	KX814469	KX814751	-	-	-	-	KX814632
STM 10586	KX814472	KX814754	-	-	-	-	KX814634
STM 10594	KX814475	KX814757	KX814589	KX814549	KX814831	KX814707	KX814636
STM 10598	KX814476	KX814758	KX814590	KX814550	KX814832	KX814708	KX814637
STM 10604	KX814477	KX814759	KX814591	KX814551	KX814833	KX814709	KX814638
STM 10605	KX814480	KX814762	KX814593	KX814553	KX814835	KX814711	KX814641
STM 10611	KX814481	KX814763	KX814594	KX814554	KX814836	KX814712	KX814642
STM 10628	KX814486	KX814768	KX814598	KX814559	KX814841	KX814717	KX814647
STM 10639	KX814488	KX814770	KX814600	KX814561	KX814843	KX814719	KX814649
STM 10666	KX814489	KX814771	KX814601	KX814562	KX814844	KX814720	KX814650
STM 10677	KX814490	KX814772	KX814602	KX814563	KX814845	KX814721	KX814651
STM 10680	KX814491	KX814773	KX814603	KX814564	KX814846	KX814722	KX814652
STM 10684	KX814492	KX814774	-	-	-	-	KX814653
STM 10685	KX814494	KX814776	-	-	-	-	KX814655
STM 10712	KX814498	KX814780	-	-	-	-	KX814659
STM 10739	KX814501	KX814783	KX814604	KX814565	KX814847	KX814723	KX814662
STM 10746	KX814502	KX814784	KX814605	KX814566	KX814848	KX814724	KX814663
STM 10748	KX814503	KX814785	-	-	-	-	KX814664
STM 10764	KX814504	KX814786	-	-	-	-	KX814665
STM 10765	KX814505	KX814787	-	-	-	-	KX814666
STM 10766	KX814506	KX814788	-	-	-	-	KX814667
STM 10770	KX814507	KX814789	KX814606	KX814567	KX814849	KX814725	KX814668
STM 10794	KX814508	KX814790	-	-	-	-	KX814669
STM 10827	KX814515	KX814797	-	-	-	-	KX814676
STM 10828	KX814514	KX814796	-	-	-	-	KX814675
STM 10835	KX814516	KX814798	KX814607	KX814568	KX814850	KX814726	KX814677
STM 10837	KX814517	KX814799	KX814608	KX814569	KX814851	KX814727	KX814678
STM 10852	KX814518	KX814800	KX814609	KX814570	KX814852	KX814728	KX814679
STM 10854	KX814519	KX814801	KX814610	KX814571	KX814853	KX814729	KX814680
STM 10855	KX814520	KX814802	KX814611	KX814572	KX814854	KX814730	KX814681
STM 10860	KX814521	KX814803	KX814612	KX814573	KX814855	KX814731	KX814682
STM 10896	KX814522	KX814804	KX814613	KX814574	KX814856	KX814732	KX814683

STM 10900	KX814523	KX814805	KX814614	KX814575	KX814857	KX814733	KX814684
STM 10906	KX814524	KX814806	KX814615	KX814576	KX814858	KX814734	KX814685
STM 10910	KX814525	KX814807	KX814616	KX814577	KX814859	KX814735	KX814686
STM 10914	KX814526	KX814808	KX814617	KX814578	KX814860	KX814736	KX814687
STM 10995	KX814527	KX814809	-	-	-	-	KX814688
<i>B. acidipaludis</i> NBRC 101816 ^T	AB513180.1	NZ_BAXZ01000005.1	KM655753.1	NZ_BAXZ01000027.1	-	-	-
<i>B. aspalathi</i> VG1C ^T	KC817488.1	KF356197.1	KU723579.1	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416 ^T	U96927.1	CP012981.1	CP012981.1	NZ_CP012981.1	CP012982.1	CP007746.1	-
<i>B. jiangsuensis</i> MP-1 ^T	NR_133991.1	JFHF01000001.1	NZ_JFHF01000052.1	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> MSHR491	CP009485.1	CP009485.1	CP009485.1	NZ_CP009485.1	CP009484.1	CP009485.1	-
<i>B. rhynchosiae</i> WSM 3937 ^T	EU219865.1	HE994064.1	HE994045.2	-	-	-	HG425184.1
<i>B. vietnamiensis</i> LMG 10929 ^T	AF097534.1	AF143793.1	CP009631.1	NZ_CP009631.1	CP009630.1	CP009631.1	-
<i>P. caribensis</i> MWAP64 ^T	NZ_CP012746.1	NZ_CP013102.1	CP013102.1	-	CP013103.1	CP013102.1	-
<i>P. diazotrophica</i> JPY 461 ^T	HM366717.1	FN543898.1	KM655754.1	-	-	-FN543616.1	-
<i>P. dilworthii</i> WSM3556 ^T	HQ698908.1	NZ_AWZT01000011.1	NZ_AWZT01000082.1	NZ_AWZT01000013.1	NZ_AWZT01000049.1	NZ_AWZT01000034.1	HG425185.1
<i>P. ferrariae</i> LMG 23612 ^T	DQ514537.1	NZ_BAYB01000011.1	NZ_BAYB01000021.1	-	-	-	-
<i>P. fungorum</i> LMG 16225 ^T	AF215705.1	AJ549505.1	KU723574.1	NZ_BAYC01000064.1	-	-	-
<i>P. graminis</i> C4D1M ^T	U96939.1	AY619653.1	-	-	-	-	-
<i>P. kururiensis</i> M130	NZ_ANSK01000009.1	NZ_ANSK01000001.1	NZ_ANSK01000001.1	NZ_ANSK01000008.1	NZ_ANSK01000001.1	NZ_ANSK01000003.1	-
<i>P. mimosarum</i> LMG 23256 ^T	AY752958.1	EU294396.1	NZ_AXAN01000006.1	NZ_BBJJ01000029.1	NZ_BBJJ01000001.1	NZ_AXAN01000003.1	EU386155.1
<i>P. nodosa</i> DM21604 ^T	AY773189.1	NZ_JAFA01000018.1	NZ_JAFA01000005.1	NZ_JAFA01000023.1	NZ_JAFA01000004.1	NZ_JAFA01000006.1	-
* <i>P. nodosa</i> BR3470	AY773198.1	-	-	-	-	-	HE983823.1
<i>P. oxyphila</i> NBRC 105797 ^T	AB488693.1	NZ_BAYD01000014.1	-	-	-	-	-
<i>P. phenazinium</i> LMG 2247 ^T	U96936.1	HQ398588.1	HQ849206.1	-	-	-	-
<i>P. phenoliruptrix</i> AC1100 ^T	AY435213.1	HQ398589.1	NZ_ASXI01000168.1	NZ_ASXI01000039.1	NZ_ASXI01000031.1	NZ_ASXI01000019.1	-
* <i>P. phenoliruptrix</i> BR3459a	NC_018695.1	-	-	-	-	-NC_018696.1	-
<i>P. phymatum</i> STM 815 ^T	AJ302312.1	NC_010622.1	NC_010622.1	NC_010622.1	NC_010623.1	CP001043.1	CP001046.1
<i>P. phytofirmans</i> PsJN ^T	AY497470.1	NC_010681.1	NC_010681.1	CP001052.1	CP001053.1	CP001052.1	-
<i>P. piptadeniae</i> STM 7296 ^T	LN875221	HE983711	-	-	-	-	HE983787
<i>P. rhynchosiae</i> WSM3937 ^T	NR_116248.1	HE994064.1	HE994045.2	-	-	-	HG425184.1
<i>P. ribeironis</i> STM 7183 ^T	LN875219	LN875227	-	-	-	-	LN875242
<i>P. sabiae</i> LMG 24235 ^T	AY773186.1	HQ398591.1	-	-	-	-	*HE983805.1
<i>P. sacchari</i> LMG 19450 ^T	AF263278.1	NZ_JTDB01000022.1	NZ_JTDB01000003.1	-	-	-	-
<i>P. sprentiae</i> WSM 5005 ^T	HF549035.1	NZ_KI421534.1	NZ_KI421534.1	NZ_KI421534.1	NZ_KI421531.1	NZ_KI421534.1	HG425185.1
<i>P. symbiotica</i> JPY 345 ^T	HM357233.1	FN543850.1	HF952726.1	-	-	-	-
<i>P. terrae</i> NBRC 100964 ^T	AB201285.1	NZ_BBJK01000060.1	NZ_BBJK01000006.1	NZ_BBJK01000103.1	NZ_BBJK01000137.1	NZ_BBJK01000016.1	-
<i>P. terricola</i> LMG 20594 ^T	AY040362.1	HQ398599.1	-	-	-	-	-
<i>P. tuberum</i> STM 678 ^T	AJ302311.1	AY619674.1	HQ849217.1	-	-	-	AJ306730.1
<i>C. necator</i> N-1 ^T	AF191737.1	CP002877.1	-	-	-	-	-

<i>*C. necator</i> UFLA02-71	HQ684034.1	-	-	-	-	-	HQ684066.1
<i>C. twayanenses</i> LMG 19424 ^T	AF300324.2	HE687279.1	CU633749.1	CU633749.1	CU633749.1	CU633749.1	CU633749.1
ALFA-RHIZOBIA STRAINS							
ABIP 206	KX814529	KX814811	-	-	-	-	KX814690
STM 10687	KX814532	KX814814	-	-	-	-	KX814692
STM 10942	KX814530	KX814812	-	-	-	-	-
STM 10949	KX814531	KX814813	-	-	-	-	KX814691
STM 10960	KX814533	KX814815	-	-	-	-	-
STM 10976	KX814534	KX814816	-	-	-	-	KX814693
STM 10981	KX814535	KX814817	-	-	-	-	KX814694
STM 10997	KX814536	KX814818	-	-	-	-	KX814695
STM 11005	KX814537	KX814819	-	-	-	-	-
STM 11006	KX814538	KX814820	-	-	-	-	KX814696
<i>M. albiziae</i> CCBAU 61158	DQ100066.1	EU249396.1	-	-	-	-	DQ311092.1
<i>M. alhagi</i> CCNWXJ122 ^T	EU169578.1	FJ481878.1	-	-	-	-	-
<i>M. amorphae</i> ACCC 19665 ^T	AF041442.1	AY494816.1	-	-	-	-	AF217261.1
<i>M. camelthorni</i> CCNWXJ404 ^T	EU169581.1	GU220798.1	-	-	-	-	-
<i>M. caraganae</i> CCBAU 11299 ^T	EF149003.1	EU249394.1	-	-	-	-	EU130405.2
<i>M. chacoense</i> LMG 19008 ^T	AJ278249.1	AY494825.1	-	-	-	-	-
<i>M. ciceri</i> CC1192 ^T	CP015062.1	CP015062.1	-	-	-	-	DQ407292.1
<i>M. gobiense</i> CCBAU 83330 ^T	EF035064.1	AJ294367.1	-	-	-	-	EF050784.1
<i>M. huakuii</i> CCBAU 2609 ^T	D13431.1	EU249391.1	-	-	-	-	KC854806.1
<i>M. loti</i> LMG 6125 ^T	X67229.2	AM076372.1	-	-	-	-	*NC_002678.2
<i>M. mediterraneum</i> UPMCa36 ^T	L38825.1	AJ294369.1	-	-	-	-	DQ407293.1
<i>M. metallidurans</i> STM 2683 ^T	AM930381.2	AM930382.1	-	-	-	-	-
<i>M. muleiense</i> CCBAU 83963 ^T	HQ316710.3	HQ316782.1	-	-	-	-	-
<i>M. plurifarium</i> LMG 11892 ^T	Y14158.1	AY494824.1	-	-	-	-	FJ745283.1
<i>M. qingshengii</i> CCBAU 33460 ^T	JQ339788.1	JQ339757.1	-	-	-	-	JQ339881.1
<i>M. robiniae</i> CCNWCY 115 ^T	EU849582.1	GQ856501.1	-	-	-	-	EU849563.1
<i>M. septentrionale</i> SDW 014 ^T	AF508207.1	DQ444304.1	-	-	-	-	KP251787.1
<i>M. silamurunense</i> CCBAU 01550 ^T	EU399698.1	EU518358.1	-	-	-	-	EU418404.1
<i>M. tamadayense</i> Ala3 ^T	AM491621.1	HE608972.1	-	-	-	-	-
<i>M. tarimense</i> CCBAU 83306 ^T	EF035058.1	EF549482.1	-	-	-	-	EF549524.1
<i>M. temperatum</i> SDW 018 ^T	AF508208.1	DQ444305.1	-	-	-	-	GQ167238.1
<i>M. tianshanense</i> A1BS ^T	AF041447.1	EU249392.1	-	-	-	-	KP251785.1
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	CP011360.1	BA000040.2	-	-	-	-	CP011360.1

*not type strains

Table S4

Percentage of nucleotide identity among representative strains trapped by trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica) and between reference type strains.

	NUCLEOTIDE SEQUENCE IDENTITY						
	16SrRNA- <i>recA</i>	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gltB</i>	<i>trpB</i>	<i>phaC</i>	concatenated
Among strains	99.8-100	100	100	100	100	100	100
Psp1							
Between strains and reference type strains							
<i>P. asphalathi</i> VG1C ^T	93.2-93.8	89.5	86.5	X	X	X	X
<i>P. diazotrophica</i> JPY 461 ^T	97.9-98	96.8	96.3	X	X	X	X
<i>P. dilworthii</i> WSM3556 ^T	94.3-94.4	90	87.5	88.8	88.3	72.7	85.8
<i>P. mimosarum</i> LMG 23256 ^T	94-94.2	88	84.4	86.4	86.4	82.7	85.6
<i>P. nodosa</i> DM21604 ^T	93.2	89.1	84.7	85.6	88.1	60.7	83.1
<i>P. phenoliruptrix</i> AC1100 ^T	94.4-94.5	90.4	87.2	90.5	89.6	90	89.5
<i>P. phymatum</i> STM 815 ^T	95.8	94.3	91.4	94.2	89.6	93.3	92.3
<i>P. rhynchosiae</i> WSM3937 ^T	94.1-94.3	89.5	87	X	X	X	X
<i>P. sabiae</i> LMG 24235 ^T	95.7-95.8	93.8	X	X	X	X	X
<i>P. sprentiae</i> WSM 5005 ^T	95.2-95.3	90.2	85.9	89.2	87.6	89.	88.3
<i>P. symbiotica</i> JPY 345 ^T	92.5-92.7	86.8	86.8	X	X	X	X
<i>P. tuberum</i> STM 678 ^T	93.6-93.7	86.4	X	X	X	X	X
Psp2							
Among strains	100	100	100	100	100	99.7-100	99.9-100
Between strains and reference type strains							
<i>P. asphalathi</i> VG1C ^T	93.3	90	87.2	X	X	X	X
<i>P. diazotrophica</i> JPY 461 ^T	98.5	98.6	95.6	X	X	X	X
<i>P. dilworthii</i> WSM3556 ^T	94.5	90.9	95.6	88.8	87.6	72.5-72.7	85.9-86
<i>P. mimosarum</i> LMG 23256 ^T	94.9	88.4	85.6	86.2	86.6	82-82.2	85.8
<i>P. nodosa</i> DM21604 ^T	94	90.4	85.2	86.2	87	60.5-60.7	83.2-83.3

<i>P. phenoliruptrix</i> AC1100 ^T	95	91.1	87.9	90.6	89.1	89.3-89.5	89.6
<i>P. phymatum</i> STM 815 ^T	96.3	94.7	90.8	93.7	90.3	92.9	92.3
<i>P. rhynchosiae</i> WSM3937 ^T	94.9	90.9	88.1	X	X	X	X
<i>P. sabiae</i> LMG 24235 ^T	95.8	94.1	X	X	X	X	X
<i>P. sprentiae</i> WSM 5005 ^T	96.1	91.6	87.2	89.8	86.7	90.4-90.6	88.9
<i>P. symbiotica</i> JPY 345 ^T	92.9	87.3	X	X	X	X	X
<i>P. tuberum</i> STM 678 ^T	94.4	87.7	88	X	X	X	X
Psp3							
Among strains	99.7-100	99.3-100	99.4	98.2-100	99.7	98.9-99.1	99.1
Between strains and reference type strains							
<i>P. asphalathi</i> VG1C ^T	93.8	89.8-90	86.6-87.2	X	X	X	X
<i>P. diazotrophica</i> JPY 461 ^T	98.8-98.9	97.2-97.5	96.1-96.3	X	X	X	X
<i>P. dilworthii</i> WSM3556 ^T	94.8	90.7-90.9	87.9-88.4	88.5-88.7	88.4-88.6	71.8-72	85.9-86
<i>P. mimosarum</i> LMG 23256 ^T	94.3-94	88.6-88	84.7-85.2	85.4-85.6	87-87.1	81.4-81.8	85.5-85.6
<i>P. nodosa</i> DM21604 ^T	93.3-93.4	89.5-89.8	85.2-85.8	85.2-85.4	88.7-88.9	60.7-61.2	83.4-83.5
<i>P. phenoliruptrix</i> AC1100 ^T	94.5-94.6	90.2-90.4	85.2-85.8	89.8-90.1	89.7-89.9	88.9-89.3	89.3-89.4
<i>P. phymatum</i> STM 815 ^T	96.4-96.5	94.7-95	91.1-91.2	92.4-92.9	90.6	92.5-93.1	92.1-92.3
<i>P. rhynchosiae</i> WSM3937 ^T	94.7-94.8	90.4-90.7	87.5-88.1	X	X	X	X
<i>P. sabiae</i> LMG 24235 ^T	96.2-96.3	93.4-93.6	X	X	X	X	X
<i>P. sprentiae</i> WSM 5005 ^T	95.6-95.7	90.9-91.1	85.9-86.5	87.9-88.3	87.1-87.3	89.3-89.5	88.2
<i>P. symbiotica</i> JPY 345 ^T	92.9-93	87.7-88	X	X	X	X	X
<i>P. tuberum</i> STM 678 ^T	93.8	86.8-87.1	88-88.6	X	X	X	X
Psp4							
Between Psp4 and reference type strains							
<i>P. asphalathi</i> VG1C ^T	94.5	91.6	86.6	X	X	X	X
<i>P. diazotrophica</i> JPY 461 ^T	96.6	95	93.3	X	X	X	X
<i>P. dilworthii</i> WSM3556 ^T	95.3	91.1	88.2	87.7	88.3	74.3	86.2
<i>P. mimosarum</i> LMG 23256 ^T	93.4	88.6	84.5	86.6	85	82	85.3
<i>P. nodosa</i> DM21604 ^T	93.9	90.2	85.1	86.4	85.4	59.7	82.6
<i>P. phenoliruptrix</i> AC1100 ^T	95.4	90.7	87.3	89.8	89	90	89.3

<i>P. phymatum</i> STM 815 ^T	97.9	95.4	90.8	94.6	90.3	95.8	93.1
<i>P. rhynchosiae</i> WSM3937 ^T	95.6	91.1	87.7	X	X	X	X
<i>P. sabiae</i> LMG 24235 ^T	97.9	95	X	X	X	X	X
<i>P. sprentiae</i> WSM 5005 ^T	95.1	92	87	89.3	85.7	90.4	88.6
<i>P. symbiotica</i> JPY 345 ^T	92.9	86.4	X	X	X	X	X
<i>P. tuberum</i> STM 678 ^T	93.5	88.2	87.3	X	X	X	X
Psp5							
Among strains	99.5-100	100	100	100	100	100	100
Between strains and reference type strains							
<i>P. asphalathi</i> VG1C ^T	95.5-95.8	94.3	91	X	X	X	X
<i>P. diazotrophica</i> JPY 461 ^T	95.2-95.5	91.8	86.5	X	X	X	X
<i>P. dilworthii</i> WSM3556 ^T	95.8-96.2	93.63	91.4	91.6	85.3	74.7	87.4
<i>P. mimosarum</i> LMG 23256 ^T	94.1-94.3	89.8	83.1	86.4	82.5	83.9	84.9
<i>P. nodosa</i> DM21604 ^T	93.7-94	91.8	84	86.7	82.3	61.8	82.3
<i>P. phenoliruptrix</i> AC1100 ^T	95.7-95.8	92.9	88.6	93.7	86.6	90.8	90.3
<i>P. phymatum</i> STM 815 ^T	94.9-95.2	91.4	84	89.8	85.2	89.7	87.7
<i>P. rhynchosiae</i> WSM3937 ^T	95.7-96	93.4	91.6	X	X	X	X
<i>P. sabiae</i> LMG 24235 ^T	95-95.3	91.4	X	X	X	X	X
<i>P. sprentiae</i> WSM 5005 ^T	95.8-96	95.2	87.9	93.4	86.3	90.2	90.2
<i>P. symbiotica</i> JPY 345 ^T	92.5-92.8	88	X	X	X	X	X
<i>P. tuberum</i> STM 678 ^T	94.1-94.4	90.9	89.4	X	X	X	X
Psp6							
Among strains	99.4-100	100	99.2-100	99.3-100	98.8-100	99.7-100	99.4-100
Between strains and reference type strains							
<i>P. asphalathi</i> VG1C ^T	93.9-94.1	92.3	89.6-90.1	X	X	X	X
<i>P. diazotrophica</i> JPY 461 ^T	95.3-95.7	91.4	86.8-87.3	X	X	X	X
<i>P. dilworthii</i> WSM3556 ^T	94.8-95.1	91.8	89.8-90.3	90.8-91.1	84.6-84.9	73.3-73.5	86.3-86.4
<i>P. mimosarum</i> LMG 23256 ^T	95.5-95.8	90.9	84.7-85.1	87-87.5	83.2-83.7	83.1-83.5	85.6-85.8
<i>P. nodosa</i> DM21604 ^T	94.7-95	92.9	84.7-84.9	87.2-87.5	83.6-84	62-62.2	83-83.1
<i>P. phenoliruptrix</i> AC1100 ^T	95.3-95.6	93.4	91.2-91.7	92.6-92.9	88.1-88.4	91.4-91.6	91.2-91.3
<i>P. phymatum</i> STM 815 ^T	94.3-94.7	91.6	83.7-84.2	90-90.5	85.7-85.9	89.3-89.5	87.8-87.9

<i>P. rhynchosiae</i> WSM3937 ^T	94.9-95.1	92.3	89.1-89.6	X	X	X	X
<i>P. sabiae</i> LMG 24235 ^T	94.3-94.6	91.6	X	X	X	X	X
<i>P. sprengiae</i> WSM 5005 ^T	97.8-98.1	97.5	92.1-92.4	96.2-96.7	90-90.4	94.7-95.2	93.9
<i>P. symbiotica</i> JPY 345 ^T	93.2-93.5	88.9	X	X	X	X	X
<i>P. tuberum</i> STM 678 ^T	96.8-97.1	93.8	95-95.6	X	X	X	X

Legend of Supplementary Figures

Fig. S1. Concatenated phylogenetic tree of 16S rDNA-*recA* genes based on a 1199 bp alignment of *Mesorhizobium* strains trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica) and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. Soil number is indicated in parenthesis. Species originally grown in the bulk soil: Pg = *Piptadenia gonoacantha*; Ap = *Anadenantera peregrina*; Trap-host plant: Mp = *Mimosa pudica*; Phv = *Phaseolus vulgaris*.

Fig. S2. Phylogenetic tree of *recA* gene based on a 443 bp alignment of representative strains of *Paraburkholderia* trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica) and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. Soil number is indicated in parenthesis. Species originally grown in the bulk soil: Ppan= *Piptadenia paniculata*; Pg = *Piptadenia gonoacantha*; Ppt = *Parapiptadenia pterosperma*; Trap-host plant: Mp = *Mimosa pudica*; Phv = *Phaseolus vulgaris*..

Figure S3: Phylogenetic tree of *gyrB* gene based on a 587 bp alignment of representative strains of *Paraburkholderia* trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica) and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. Soil number is indicated in parenthesis. Species originally grown in the bulk soil: Ppan= *Piptadenia paniculata*; Pg = *Piptadenia gonoacantha*; Ppt = *Parapiptadenia pterosperma*; Trap-host plant: Mp = *Mimosa pudica*; Phv = *Phaseolus vulgaris*.

Fig. S4. Phylogenetic tree of *gltB* gene based on a 624 bp alignment of representative strains of *Paraburkholderia* trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica) and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. Soil number is indicated in parenthesis. Species originally grown in the bulk soil: Ppan= *Piptadenia paniculata*; Pg = *Piptadenia gonoacantha*; Ppt = *Parapiptadenia pterosperma*; Trap-host plant: Mp = *Mimosa pudica*; Phv = *Phaseolus vulgaris*.

Fig. S5. Phylogenetic tree of *trpB* gene based on a 703 bp alignment of representative strains of *Paraburkholderia* trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica) and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. Soil number is indicated in parenthesis. Species originally grown in the bulk soil: Ppan= *Piptadenia paniculata*; Pg = *Piptadenia gonoacantha*; Ppt = *Parapiptadenia pterosperma*; Ap = *Anadenantera peregrina*; Trap-host plant: Mp = *Mimosa pudica*; Phv = *Phaseolus vulgaris*. *not type strains.

Fig. S6. Phylogenetic tree of *phaC* gene based on a 507 bp alignment of representative strains of *Paraburkholderia* trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica) and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. Soil number is indicated in parenthesis. Species originally grown in the bulk soil: Ppan= *Piptadenia paniculata*; Pg = *Piptadenia gonoacantha*; Ppt = *Parapiptadenia pterosperma*; Trap-host plant: Mp = *Mimosa pudica*; Phv = *Phaseolus vulgaris*.

Fig. S7. Phylogenetic tree of *nodC* gene based on a 494 bp alignment of representative strains of *Mesorhizobium* trapped by *M. pudica* and *P. vulgaris* from

soils of Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica) and of reference strains. Phylogeny was built with MEGA v.6 using the Maximum Likelihood statistical method with Tamura Nei model and 1,000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 70\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. Soil number is indicated in parenthesis. Species originally grown in the bulk soil: Pg = *Piptadenia gonoacantha*; Ap = *Anadenantera peregrina*; Trap-host plant: Mp = *Mimosa pudica*; Phv = *Phaseolus vulgaris*.

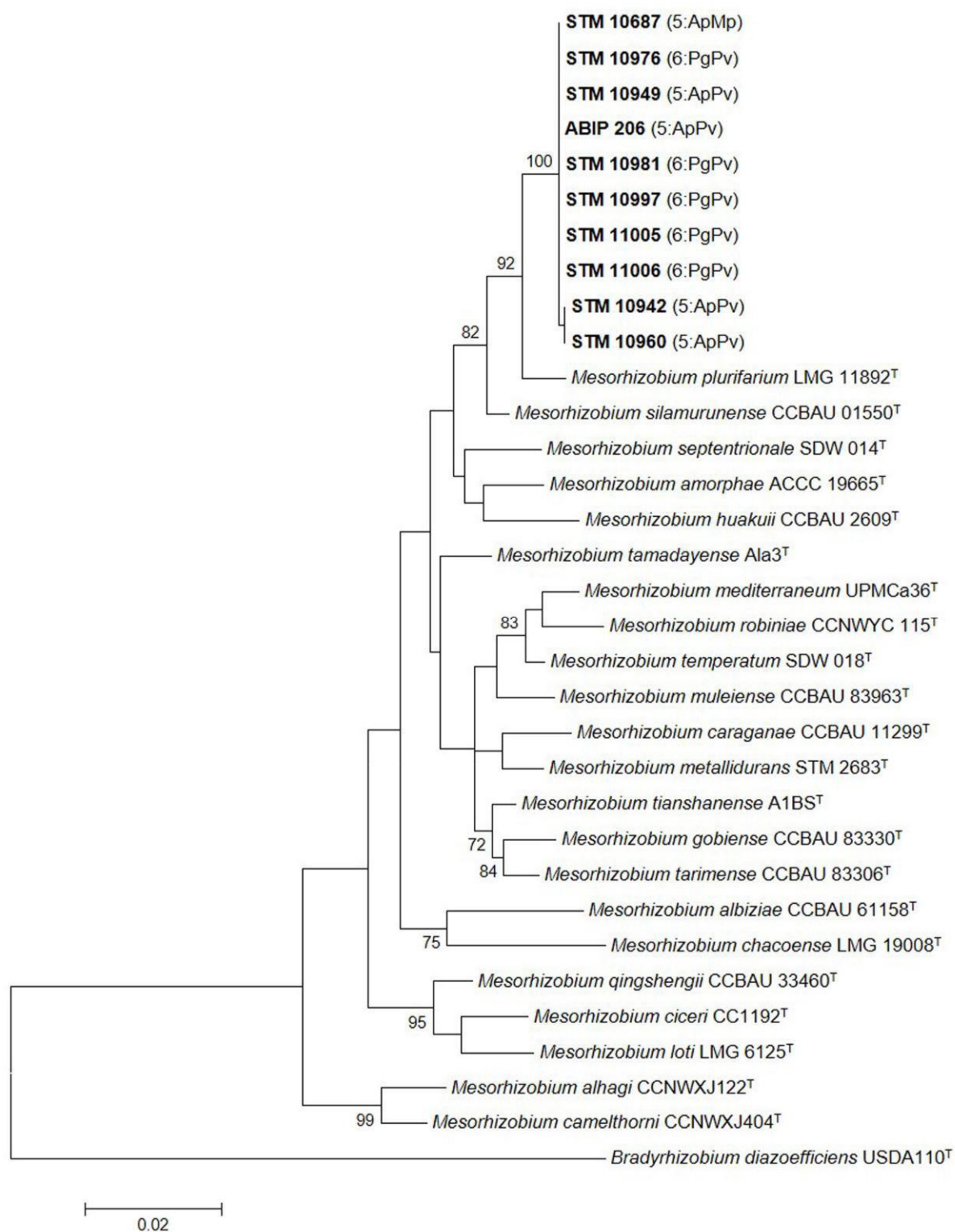


Fig S1

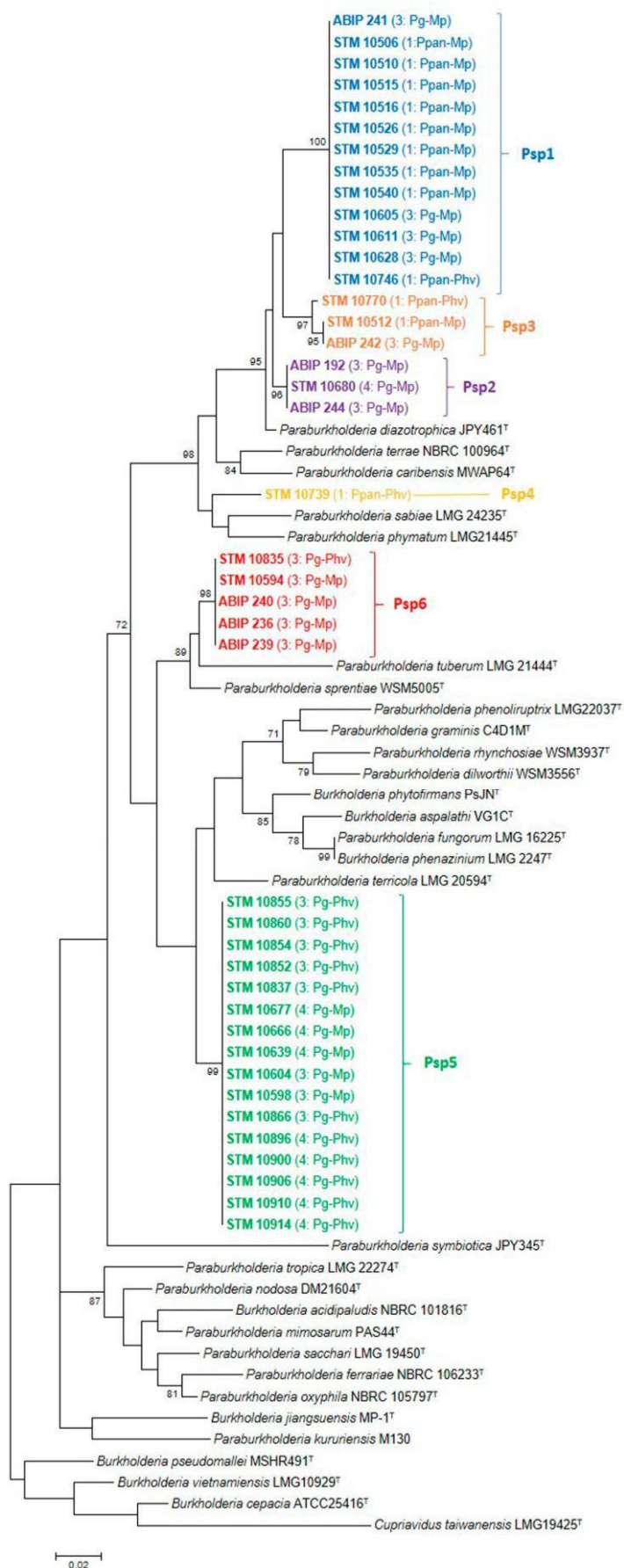


Fig. S2

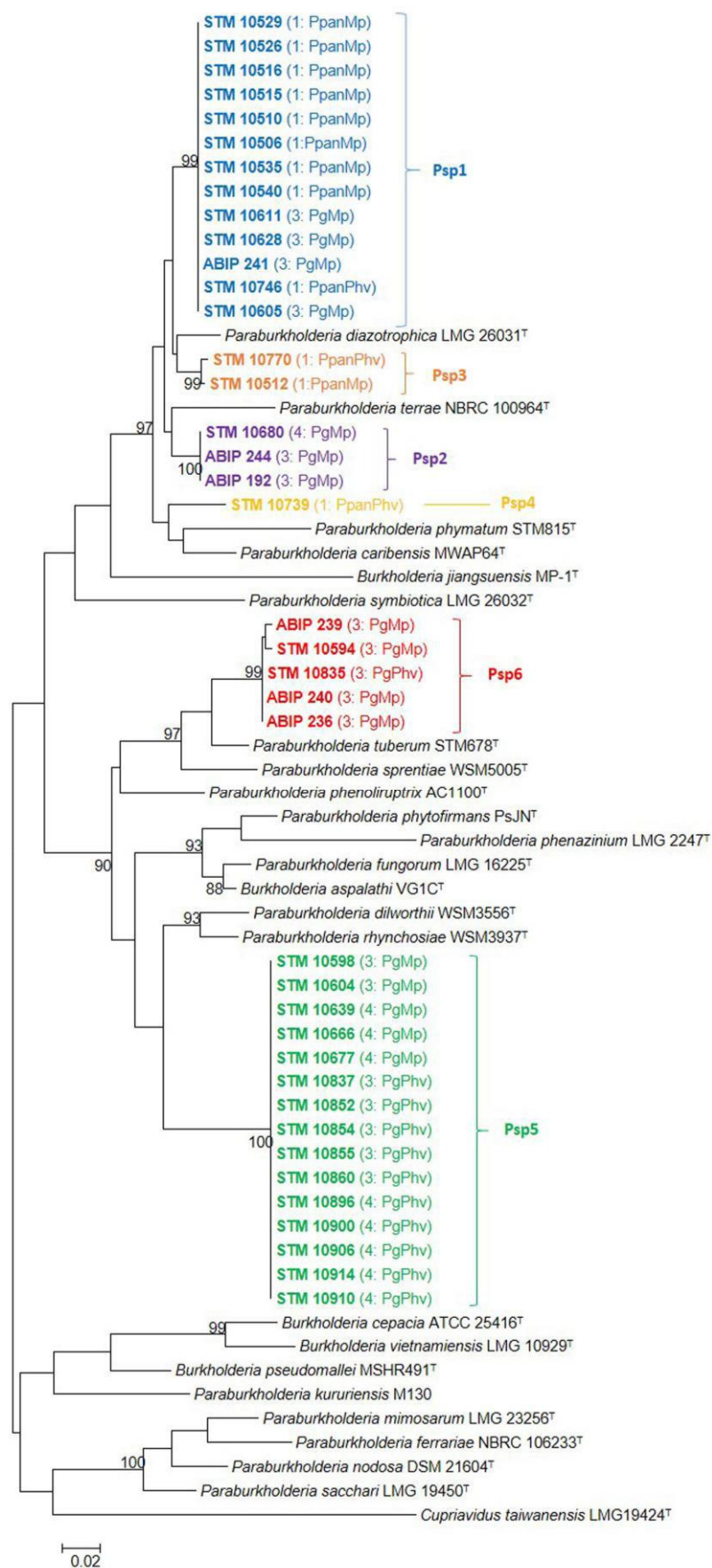


Fig. S3

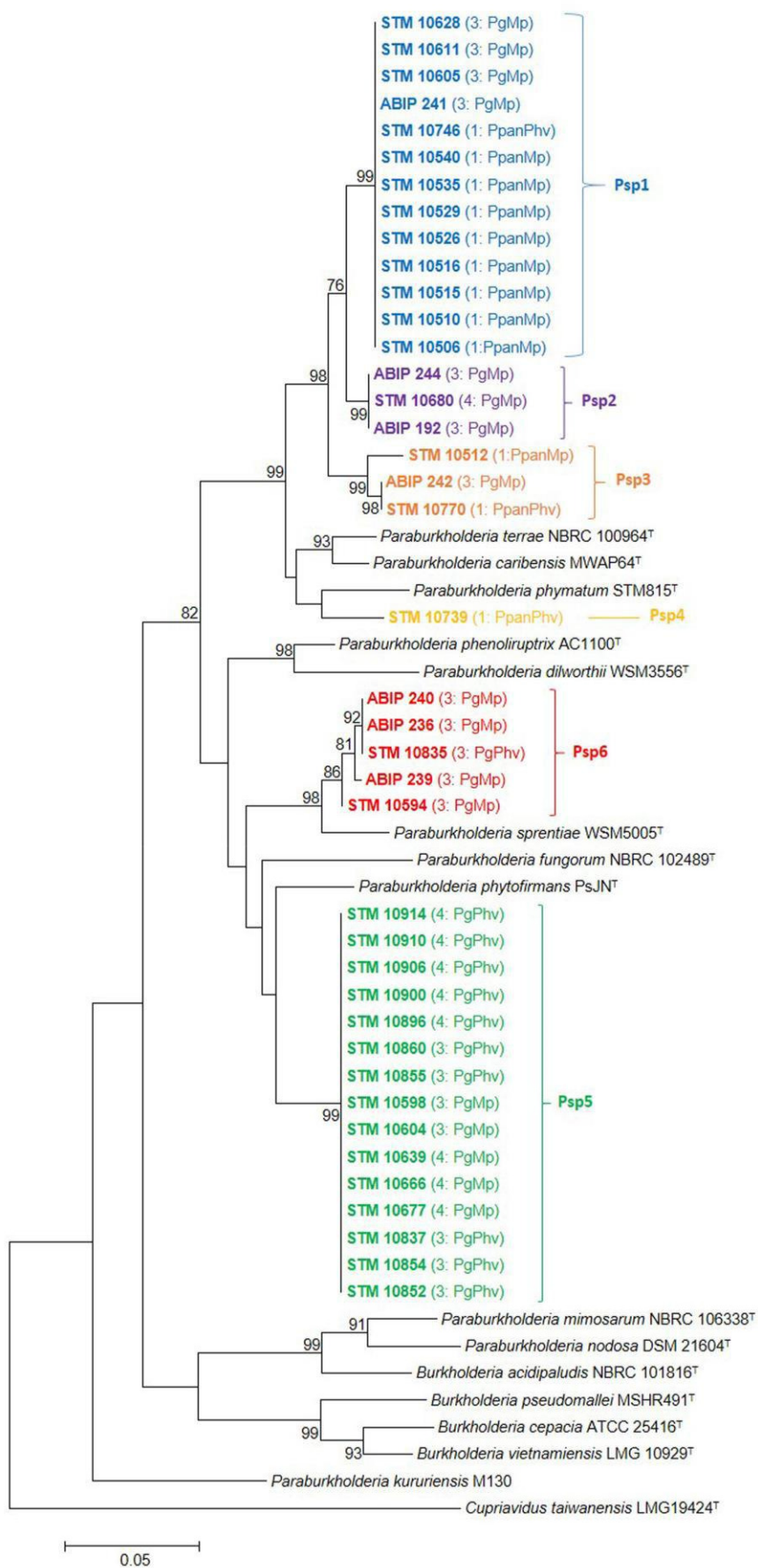


Fig. S4

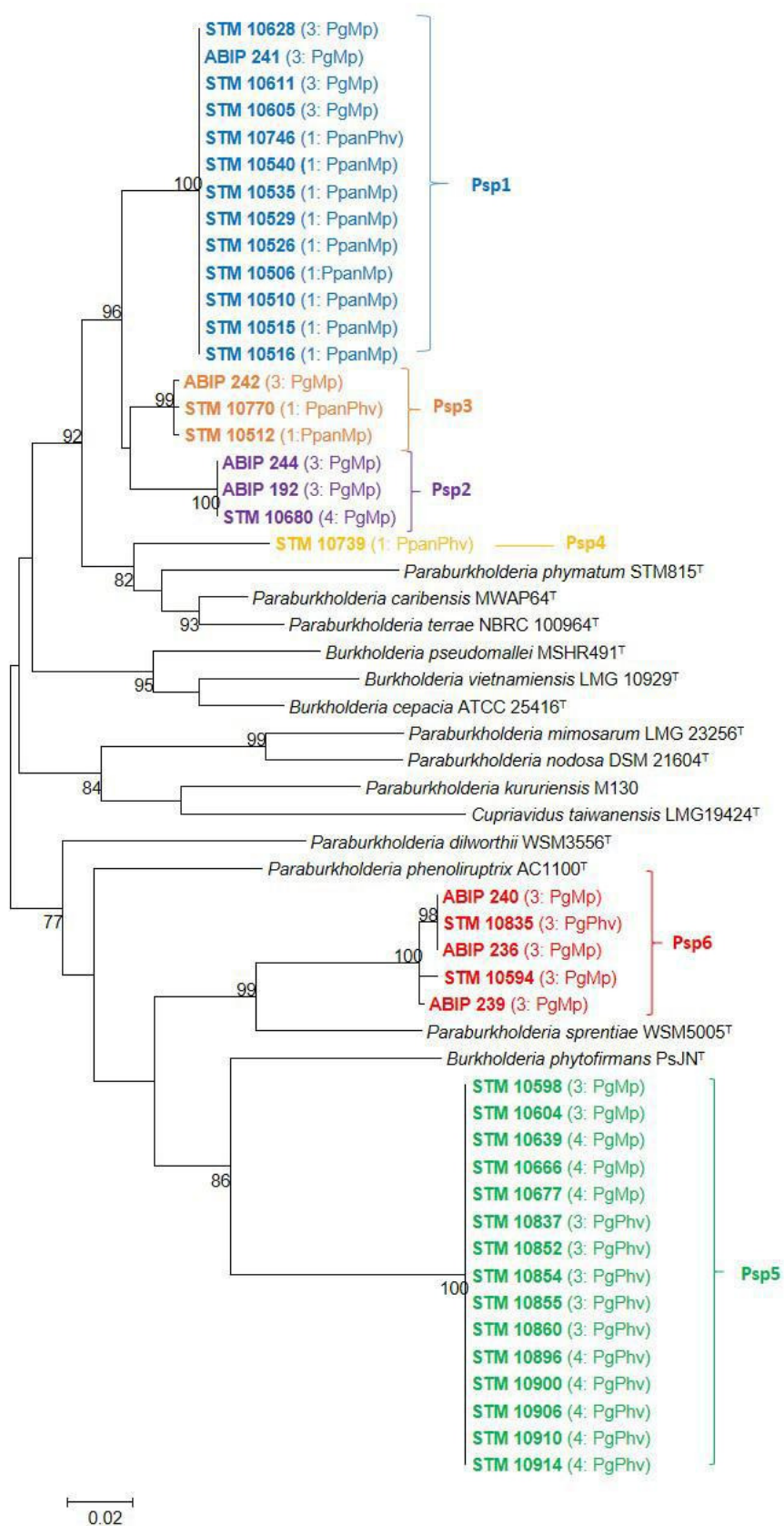


Fig. S5

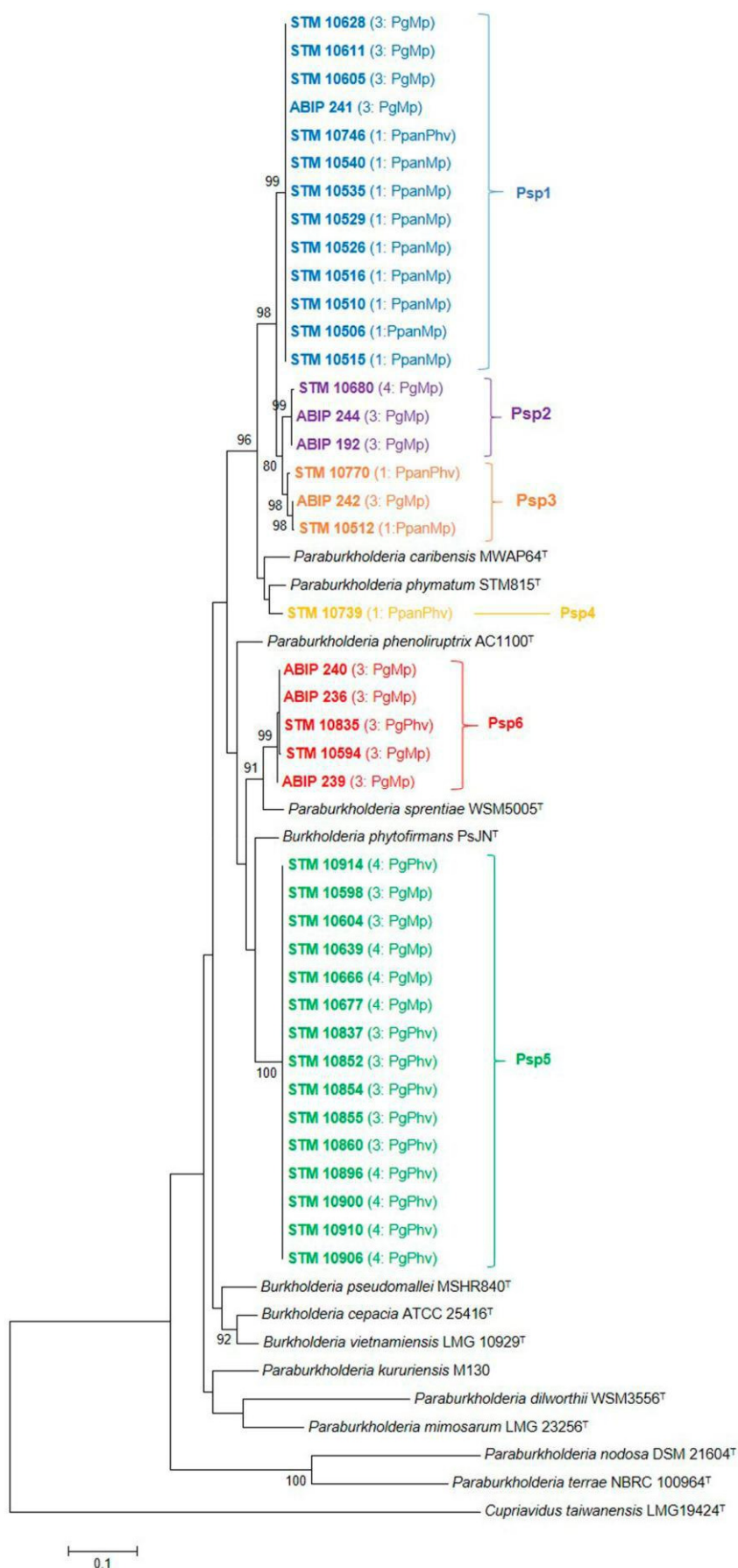


Fig. S6

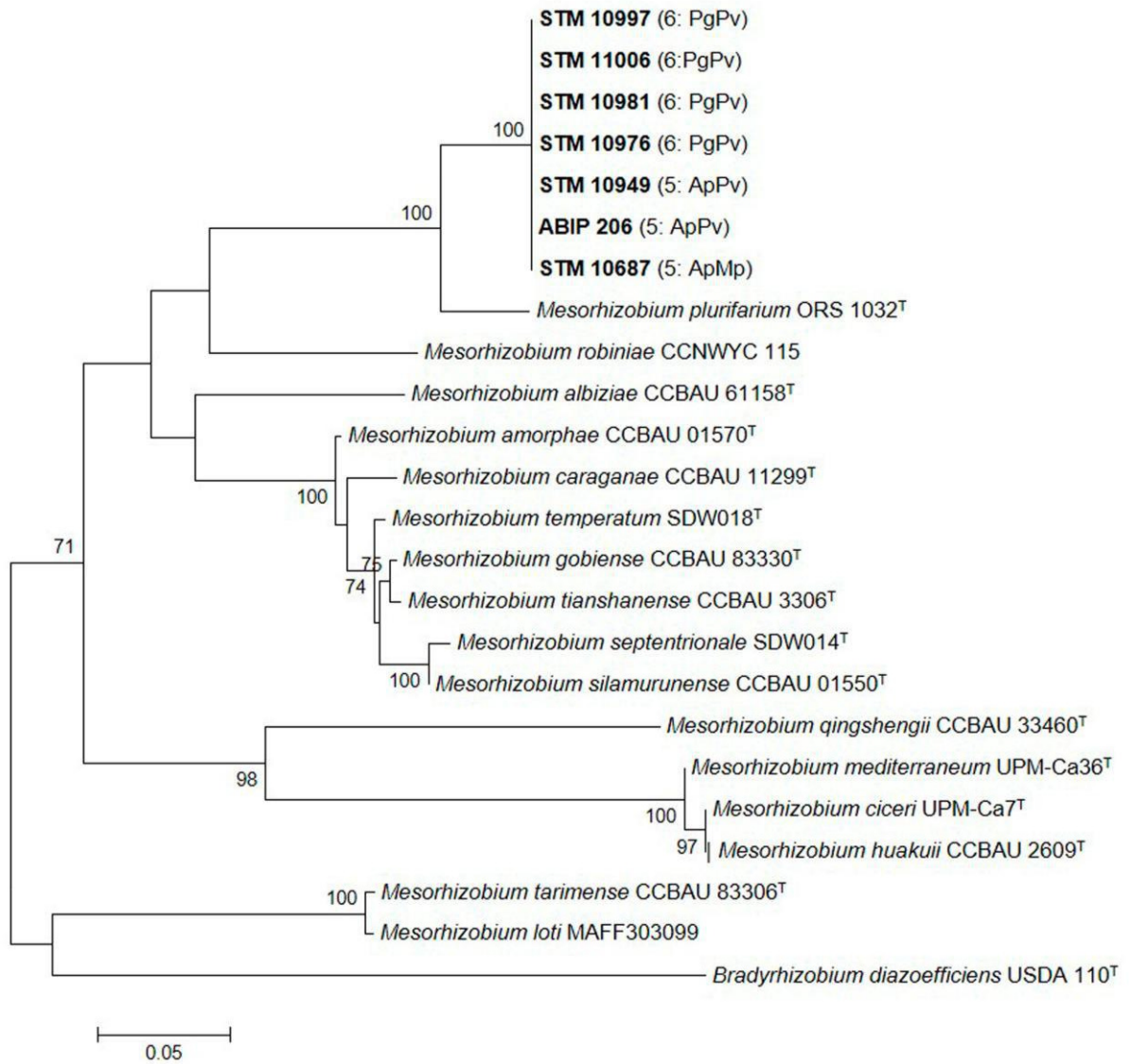


Fig. S7

9. CONCLUSÃO GERAL

BFN simbióticas são notórias por sua habilidade em disponibilizar nitrogênio de maneira ecológica e com baixo custo para o agricultor. Dessa forma, estudos que procurem explorar a diversidade dessas bactérias, bem como sua relação com a planta-hospedeira e seus atributos benéficos ao meio ambiente são preciosos para compreender como tais microrganismos se comportam e de que maneira poderiam ser utilizados visando benefícios agronômicos e ambientais. Estirpes eficientes de rizóbios da classe alfa-Proteobacteria já vêm sendo utilizadas e recomendadas como inoculantes agrícolas, substituindo total ou parcialmente o uso de fertilizantes nitrogenados nas culturas, o que contribui significativamente para a manutenção da qualidade do solo, além de reduzir os gastos com fertilizantes nitrogenados. Caracterizações genéticas e filogenéticas têm sido empregadas em estudos de diversidade bacteriana com a finalidade de identificar corretamente os isolados ou estirpes de uma determinada área, bem como suas características de interesse, que podem estar relacionadas à produção de proteínas, enzimas, EPS ou quaisquer outros compostos de interesse biotecnológico. Com o avanço das técnicas de biologia molecular e bioinformática é possível realizar essa caracterização com maior precisão, e obtendo informações cada vez mais claras e valiosas para aplicações futuras.

Neste trabalho, utilizamos ferramentas de biologia molecular para caracterizar geneticamente e taxonomicamente estirpes de rizóbios isoladas de dois biomas importantes para a ecologia e economia do país. Descrevemos uma nova espécie de *Rhizobium* através de análise polifásica e obtivemos resultados relevantes em relação aos beta-rizóbios, incluindo estirpes eficientes de *Paraburkolderia nodosa* na nodulação e fixação de nitrogênio com o feijoeiro, e identificação de potenciais novas espécies desse mesmo gênero. Os beta-rizóbios são um grupo relativamente novo, com poucas espécies descritas quando comparados aos alfa-rizóbios. Tendo em vista o benefício que esses microrganismos trazem ao meio ambiente e o potencial que os mesmos apresentam para aplicações nos mais diversos setores da agroindústria, estudos que procurem explorar a diversidade e as propriedades dos rizóbios são imprescindíveis para elucidar nosso entendimento acerca dos mesmos e para selecionar estirpes eficientes em nodular e fixar nitrogênio em leguminosas.