



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

LUIZA CAROLINE FERRAZ HELENE

**DIVERSIDADE ENTRE ESTIRPES DO GÊNERO
BRADYRHIZOBIUM AVALIADA POR *MULTILOCUS*
SEQUENCE ANALYSIS (MLSA) E ANÁLISE
POLIFÁSICA**

Londrina
2015

LUISA CAROLINE FERRAZ HELENE

**DIVERSIDADE ENTRE ESTIRPES DO GÊNERO
BRADYRHIZOBIUM AVALIADA POR *MULTILOCUS*
SEQUENCE ANALYSIS (MLSA) E ANÁLISE
POLIFÁSICA**

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

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

H474d Helene, Luisa Caroline Ferraz.

Diversidade entre estirpes do gênero *Bradyrhizobium* avaliada por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e análise polifásica / Luisa Caroline Ferraz Helene. – Londrina, 2015.

74 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015. Inclui bibliografia.

1. Rizóbio – Teses. 2. Microorganismos fixadores de nitrogênio – Teses. 3. Genética bacteriana – Teses. 4. Microorganismos do solo – Teses. 5. Filogenia – Teses. I. Hungria, Mariangela. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.841.3

LUISA CAROLINE FERRAZ HELENE

**DIVERSIDADE ENTRE ESTIRPES DO GÊNERO
BRADYRHIZOBIUM AVALIADA POR *MULTILOCUS*
SEQUENCE ANALYSIS (MLSA) E ANÁLISE POLIFÁSICA**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Renan Augusto Ribeiro
Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária – EMBRAPA/Soja

Dr. Jerri Edson Zilli
Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária – EMBRAPA/Agrobiologia

Londrina, 04 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço de todo coração a minha mãe Hylea Ferraz e aos meus avós Dona Walkyria e Dr. Alceu Ferraz, que incondicionalmente me incentivaram e se esforçaram para me oferecer boa educação e as melhores oportunidades de estudos. Além disso, vocês sempre estiveram ao meu lado nos momentos difíceis e me orientaram nos momentos de decisões. Amo vocês.

Agradeço também ao meu namorado, Tiago Bana, que desde o início acompanhou minha jornada, tendo paciência nos momentos complicados, me incentivando a continuar sempre, com muito amor, compreensão e bom humor. Você foi muito importante em todos os momentos.

A minha orientadora Mariangela Hungria, que me orientou e proporcionou que essa etapa da minha formação se tornasse realidade. Muito obrigada por todos os momentos com você e com sua maravilhosa equipe. Você é um grande exemplo, profissional e pessoal, te admiro muito.

A minha amiga de laboratório, Jakeline Delamuta, que me ensinou com muita calma e paciência cada passo que executei em minha pesquisa. Jake, você é uma pessoa muito importante pra mim nesse meio acadêmico e profissional, devo muito dessa etapa a você, obrigada por tudo.

Ao Dr. Marco Antonio Nogueira e a todos os colegas de laboratório, principalmente ao Renan, Ligia e Eduara, que também me acompanharam e me ajudaram nos momentos requeridos. Sem vocês, tudo seria mais difícil.

Aos meus amigos mais próximos, as “Capivaras Voadoras”, pois cada um de vocês acabou por tornar essa etapa mais alegre, descontraída, e divertida.

Agradeço também à Embrapa Soja e seus funcionários, que disponibilizaram a estrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia da UEL e principalmente a todos os professores que compartilharam suas experiências e seus conhecimentos.

A CAPES, pela bolsa de mestrado.

E a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a realização dessa etapa em minha vida.

Muito obrigada!

HELENE, Luisa Caroline Ferraz. **Diversidade entre estirpes do gênero *Bradyrhizobium* avaliada por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e análise polifásica.** 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio, também denominadas popularmente de rizóbios, têm grande relevância agrônômica, pois fornecem quantidades significativas de nitrogênio para as plantas e colaboram para a recuperação de solos e ambientes degradados. Nos últimos anos, com o avanço das técnicas moleculares, diversos trabalhos têm demonstrado que essas bactérias apresentam uma elevada diversidade genética, resultando em reclassificações taxonômicas e na descrição de novas espécies. Apesar de o gene ribossomal 16S (16S RNAr) ainda ser utilizado em análises filogenéticas de procariotos, sua alta conservação não é capaz de revelar diferenças entre espécies de diversos gêneros, incluindo *Bradyrhizobium*. Outras metodologias, como o MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*), estão sendo utilizadas para elucidar esses casos, com bons resultados. Neste trabalho, 15 estirpes de *Bradyrhizobium* sem posicionamento taxonômico claro foram utilizadas em estudos de filogenia e taxonomia com base na técnica de MLSA e análise polifásica. Para isso, três genes *housekeeping*—*glnII*, *gyrB* e *recA*—foram sequenciados e suas sequências foram concatenadas e utilizadas para a construção de uma árvore filogenética. Das 15 estirpes, sete agruparam com a espécie *Bradyrhizobium pachyrhizi*, enquanto as SEMIAS 6159, 6405 e 6408 ocuparam posições isoladas, e dois grupos (SEMIAS 6399 e 6404, e SEMIAS 690, 6387 e 6428) não apresentaram similaridade filogenética com nenhuma espécie descrita. Esses grupos merecem estudos mais detalhados, pois apresentam grande potencial de representarem espécies novas. As estirpes SEMIA 690 (isolada de *Centrosema pubescens*), SEMIA 6387 e SEMIA 6428, (isoladas de *Acacia* spp.) foram selecionadas para análises complementares, visando à descrição de uma nova espécie, tendo início um estudo polifásico (análises genéticas, fenotípicas e filogenéticas). O perfil de BOX-PCR agrupou as estirpes com mais de 73% de similaridade entre si, e inferiores a 66% com as espécies de *Bradyrhizobium* já descritas. Os ácidos graxos identificados como principais na SEMIA 690 foram a fração molecular total 8 e a fração individual C19:0 ciclo ω 8c. A SEMIA 690 apresentou identidade nucleotídica média do genoma inferior a 91% com todas as estirpes tipo das espécies relacionadas. O conteúdo G + C da SEMIA 690 foi determinado em 63,46%. Os testes fenotípicos (fontes de carbono utilizadas, características morfológicas, condições de crescimento) foram congruentes entre as estirpes representantes da provável nova espécie. Os resultados obtidos confirmam que a técnica de MLSA é eficiente para estudos filogenéticos de procariotos, mostrando ser uma ferramenta

segura e rápida de análise da diversidade dos gêneros e identificação de possíveis novas espécies. Os resultados suportam a descrição de uma nova espécie de *Bradyrhizobium*.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium*. Filogenia de procariotos. Fixação biológica do nitrogênio. MLSA. Taxonomia de procariotos.

HELENE, Luisa Caroline Ferraz. **Diversity among strains belonging to the genus *Bradyrhizobium* evaluated by Multilocus Sequence Analysis (MLSA) and Polyphasic Analyses.** 2015. 74 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Symbiotic nitrogen-fixing bacteria, also commonly called rhizobia, have great agronomic relevance because they can provide significant amounts of nitrogen to plants and help in the recovery of soils and degraded environments. In recent years, with the advances in molecular techniques, several studies have shown that these bacteria have a high level of genetic diversity, resulting in taxonomic reclassifications and description of new species. Although the 16S ribosomal genes (16S rRNA) are still used in phylogenetic analyses of prokaryotes, their high conservation do not allow to reveal differences between species of several genera, including *Bradyrhizobium*. Other methodologies such as the MLSA (Multilocus Sequence Analysis) are being used to elucidate these cases, with good results. In this study, 15 strains of *Bradyrhizobium* without clear taxonomic position were used in studies of phylogeny and taxonomy based on the MLSA technique. Tree housekeeping genes—*glnII*, *gyrB* and *recA*—were sequenced and their sequences were concatenated and used for the construction of a phylogenetic tree. Of the 15 strains, seven grouped with the species *Bradyrhizobium pachyrhizi*, while the SEMIAS 6159, 6405 and 6408 strains occupied isolated locations, and two groups (SEMIAS 6399 and 6404, and SEMIAS 690, 6387 and 6428) showed no genetic similarity with any described species. These groups deserve more detailed studies, since they have great potential to represent new species. Strains SEMIA 690 (isolated from *Centrosema pubescens*), SEMIA 6387 and SEMIA 6428, (isolated from *Acacia* spp.) were selected for a polyphasic study (genetic, phenotypic and phylogenetic analyzes) aimed at the description of a new species. The BOX-PCR profile clustered the strains with more than 73% of similarity, and less than 66% with closer *Bradyrhizobium* described species. Fatty acids identified as key in SEMIA 690 were summed features 8 and individual fraction C19:0 cycle ω 8c. The genomic analysis of ANI (average nucleotide identity) between SEMIA 690 and closer type strains of *Bradyrhizobium* species was less than 91%. The G + C content from SEMIA 690 was of 63.46%. The phenotypic tests (carbon sources used, morphological characteristics, growth conditions) were congruent among the strains representative of the new putative species. The results confirm that the MLSA technique is efficient for phylogenetic studies of prokaryotes, representing a reliable and fast tool to analyze the diversity of genes and to identify possible new rhizobial species. The results obtained in this study also support the description of a new species of *Bradyrhizobium*.

Keywords: *Bradyrhizobium*. Phylogeny of prokaryotes. Biological nitrogen fixation. MLSA. Taxonomy of prokaryotes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Relações filogenéticas entre as 15 estirpes em estudo baseadas apenas no gene 16S RNAr	45
Figura 2	– Relações filogenéticas das estirpes em estudo baseadas apenas no gene <i>housekeeping glnII</i>	48
Figura 3	– Relações filogenéticas entre as 15 estirpes em estudo baseadas apenas no gene <i>housekeeping gyrB</i>	49
Figura 4	– Relações filogenéticas entre as 15 estirpes em estudo baseadas apenas no gene <i>housekeeping recA</i>	50
Figura 5	– Relações filogenéticas das 15 estirpes em estudo baseadas no MLSA das sequências concatenadas dos genes <i>housekeeping (glnII, gyrB e recA)</i>	52
Figura 6	– Dendrograma baseado no <i>fingerprinting</i> pela metodologia de BOX-PCR, aplicado às SEMIAs 690, 6387 e 6428	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Denominação das estirpes analisadas, suas respectivas plantas hospedeiras e designações na coleção de origem	34
Tabela 2	- Sequências de cada iniciador utilizado para amplificação e sequenciamento dos genes de interesse e seus respectivos ciclos de amplificação	36
Tabela 3	- Números de acesso das sequências utilizadas na árvore de MLSA.....	53
Tabela 4	- Identidade nucleotídica (%) entre as SEMIAs 690, 6387 e 6428; e entre as SEMIAs 690, 6387 e 6428 e as estirpes tipo das espécies de <i>Bradyrhizobium</i> relacionadas	55
Tabela 5	- Perfis de ácidos graxos (%) obtidos para as estirpes em estudo, avaliados pelo sistema MIDI utilizando banco de dados FAME TSBA6.	57
Tabela 6	- Identidade nucleotídica (%) do genoma entre a SEMIA 690 e as estirpes de referência das espécies relacionadas	58
Tabela 7	- Diferenças quanto a capacidade de uso de fontes de carbono, por meio do teste API, entre as estirpes em estudo e estirpes tipo.....	61
Tabela 8	- Tolerância a antibióticos (antibiograma) das estirpes em estudo e estirpes tipo.	62
Tabela 9	- Capacidade de crescimento das estirpes em estudo e estirpes tipo em estudo em diferentes valores de pH e com 2% de ureia no meio	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	IMPORTÂNCIA E DISTRIBUIÇÃO DO NITROGÊNIO NA ATMOSFERA	17
3.2	FBN, MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS E ASSOCIAÇÕES SIMBIÓTICAS	19
3.3	PROCESSOS DE INFECÇÃO, NODULAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM LEGUMINOSAS.....	21
3.4	TAXONOMIA E FILOGENIA DE PROCARIOTOS	22
3.5	GRUPOS TAXONÔMICOS DE RIZÓBIOS	24
3.6	REQUISITOS PARA DESCRIÇÃO DE ESPÉCIES NOVAS DE PROCARIOTOS.....	26
3.7	METODOLOGIAS DE ANÁLISES TAXONÔMICAS.....	27
3.7.1	RNA Ribossomal 16S e Genes <i>Housekeeping</i>	27
3.7.2	<i>Multilocus Sequence Typing</i> – MLST e <i>Multilocus Sequence Analysis</i> – MLSA	28
3.7.3	PCR-BOX, Hibridação DNA-DNA, e <i>Average Nucleotide Identity</i> – ANI29	
3.8	TESTES FENOTÍPICOS	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	ESTIRPES ESTUDADAS	33
4.2	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA.....	35
4.2.1	Extração do DNA Total.....	35
4.2.2	Amplificação por PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>).....	35
4.2.3	Reações de Sequenciamento e Análises Filogenéticas.....	37

4.3	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	38
4.4	AVERAGE NUCLEOTIDE IDENTITY E CONTEÚDO G + C.....	38
4.5	TESTES MORFOFISIOLÓGICOS	38
4.5.1	Avaliação do Crescimento e Diâmetro das Colônias.....	39
4.5.2	Forma, Elevação, Borda e Superfície das Colônias.....	39
4.5.3	Alteração no pH do meio.....	39
4.5.4	Produção de Muco e Consistência da Massa de Crescimento	40
4.5.5	Cromogênese das colônias em meio com Azul de Bromotimol e Vermelho Congo.....	40
4.5.6	Detalhes Ópticos.....	40
4.5.7	Capacidade de Utilização de Fontes de Carbono (C)	41
4.5.8	Tolerância a Antibióticos	42
4.5.9	Avaliação do Crescimento em Diferentes Condições	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE 16S RNAR.....	44
5.2	ANÁLISE FILOGENÉTICA INDIVIDUAL DOS GENES <i>GLNII</i> , <i>GYRB</i> E <i>RECA</i>	46
5.3	ANÁLISE FILOGENÉTICA POR MLSA.....	51
5.4	IDENTIDADE DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES 16S RNAR E <i>HOUSEKEEPING</i> DAS ESTIRPES CANDIDATAS A UMA NOVA ESPÉCIE.....	54
5.5	BOX-PCR	55
5.6	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	56
5.7	AVERAGE NUCLEOTIDE IDENTITY E CONTEÚDO G + C.....	57
5.8	TESTES MORFOFISIOLÓGICOS	58
5.8.1	Manifestação de Crescimento e Diâmetro das Colônias	58
5.8.2	Forma, Elevação, Borda e Superfície das Colônias.....	59
5.8.3	Alteração no pH.....	59
5.8.4	Produção de Muco e Consistência da Massa de Crescimento	59
5.8.5	Cromogênese das Colônias em Azul de Bromotimol e Vermelho Congo	60
5.8.6	Detalhes Ópticos.....	60

5.8.7	Utilização de Fontes de Carbono.....	60
5.8.8	Tolerância a Antibióticos	61
5.8.9	Avaliação de Crescimento em Diferentes Condições	62
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
7	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio está presente em diferentes formas no nosso planeta e faz parte da composição de muitas moléculas biológicas, sendo por isso um elemento essencial para a vida na Terra (HUNGRIA *et al.*, 2007; BASI *et al.*, 2011). Os animais e plantas são capazes de retirar nitrogênio de poucas substâncias para seu próprio uso. No caso das plantas, o nitrogênio necessário ao crescimento pode ser obtido a partir de quatro fontes principais, dentre elas, a FBN é considerada como a de maior eficiência, quando comparada com a utilização de insumos químicos e causa menor impacto ambiental além de ser mais barata (HUNGRIA *et al.*, 2001).

A FBN é realizada exclusivamente por um grupo de procariotos, muitos capazes de se associarem com as plantas de diversas formas (VAN BERKUM *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2010). Se ambos, planta e microrganismo, estão presentes no solo e há baixa concentração de nitrogênio, eles se comunicam por sinais moleculares que estimulam a aproximação e a interação entre esses organismos. Cada tipo de substância exsudada da planta pode atrair tipos específicos de microrganismos, promovendo uma associação funcional (HUNGRIA *et al.*, 2001; TAIZ e ZEIGER, 2004).

Muitos trabalhos abordam a identificação e classificação desse grupo de microrganismos, utilizando técnicas de sequenciamento de DNA e análises filogenéticas (GILLIS *et al.*, 1995; COENYE *et al.*, 2001; WILLEMS, 2006; MENNA *et al.*, 2009; RIVAS *et al.*, 2009; ROMA NETO *et al.*, 2010; DALL'AGNOL *et al.*, 2013, DELAMUTA *et al.*, 2013). Esses estudos são muito importantes, não só para o conhecimento da evolução dessas bactérias e da relação filogenética com outros procariotos, como também para o uso de estirpes de interesse biotecnológico na agricultura ou meio ambiente. Hoje, existem mais de 200 espécies de microrganismos diazotróficos simbióticos descritas, mas a cada ano novas espécies são adicionadas a esse grupo (*List of Prokaryotic Names with*

Standing in Nomenclature - LPSN). A taxonomia é a ciência que aborda a classificação, nomenclatura e identificação dos seres vivos, baseada em informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas de cada organismo, organizando-os em grupos de acordo com ancestrais em comum (VANDAMME *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1999; GEVERS *et al.*, 2005).

Aproximadamente uma década após Zuckerkandl e Pauling (1965) sugerirem a utilização de moléculas biológicas amplamente distribuídas nos seres vivos como parâmetros evolutivos, Woese e Fox (1977) propuseram o uso de genes ribossomais como marcadores filogenéticos universais. Esses genes evoluem lentamente, e outro fator relevante é que, por esses genes codificarem informações fundamentais para a sobrevivência das espécies, acreditava-se que eles não sofriam recombinações. Contudo, estudos posteriores (SNEATH, 1993; GAUNT *et al.*, 2001; VAN BERKUM *et al.*, 2003) apontaram a existência de recombinação nos genes 16S e 18S RNAr, concluindo que a construção de árvores filogenéticas, com base apenas nesses genes poderia não apontar a filogenia correta dos indivíduos (EARDLY *et al.*, 2005; MARTENS *et al.*, 2007). A solução para esse problema foi a utilização complementar com genes que codificam proteínas como marcadores alternativos. Os chamados genes *housekeeping* mostram um maior grau de divergência entre os grupos, mas são suficientemente conservados para manterem as relações filogenéticas das espécies em estudo (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; MARTENS *et al.*, 2007).

Muitos trabalhos já fizeram uso de genes *housekeeping* para a construção de árvores filogenéticas, mas algumas árvores geradas apontavam uma filogenia diferente daquela construída com o gene 16S RNAr (WERNEGREN e RILEY, 1999; TURNER e YOUNG, 2000; GAUNT *et al.*, 2001; STEPKOWSKI *et al.*, 2003; HERNANDEZ-LUCAS *et al.*, 2004). Visando um aprimoramento no uso de sequências *housekeeping*, os pesquisadores começaram a utilizar sequências concatenadas de no mínimo cinco genes *housekeeping* para elucidar a posição filogenética de bactérias. Essa sequência concatenada oferece um efeito tampão contra

erros gerados na análise por recombinação de genes isolados (STACKEBRANDT *et al.*, 2002).

Com os avanços tecnológicos, sequenciadores automáticos de DNA foram desenvolvidos favorecendo muito os estudos taxonômicos e filogenéticos, esses avanços das técnicas de análises genéticas e biomoleculares incentivaram a criação de metodologias de classificação e identificação de procariotos, confiáveis e relativamente rápidas. A taxonomia polifásica garante que características relevantes sejam analisadas antes de inferir uma posição taxonômica a qualquer indivíduo. As pesquisas que abordam a classificação dos rizóbios cooperam para que espécies de interesse sejam descobertas e que suas características sejam elucidadas, a fim de um melhor aproveitamento agronômico e biotecnológico das estirpes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os grupos taxonômicos e as relações filogenéticas de 15 estirpes de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* que estabelecem simbiose com leguminosas, através da técnica *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e identificar possíveis novas espécies.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sequenciar os genes 16S RNAr e *housekeeping glnII*, *gyrB* e *recA*;
- b) Constatar as relações evolutivas das estirpes pela análise de árvores filogenéticas construídas com cada gene e por MLSA;
- c) Analisar e identificar a presença de possíveis novas espécies no grupo em estudo;
- d) Aplicar testes morfofisiológicos que visem à descrição de novas espécies;
- e) Conduzir uma análise polifásica dos dados genéticos e morfofisiológicos obtidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 IMPORTÂNCIA E DISTRIBUIÇÃO DO NITROGÊNIO NA ATMOSFERA

O nitrogênio (N) é um elemento extremamente importante para a vida na Terra, por participar da síntese de diversas substâncias essenciais para os seres vivos, como proteínas e aminoácidos, DNA e bases nitrogenadas, clorofila, hormônios, entre outras moléculas. No caso das plantas, ele é um nutriente limitante, uma vez que elas necessitam de altas quantidades de nitrogênio para obterem desenvolvimento pleno e realizarem seus processos fisiológicos essenciais (HUNGRIA *et al.*, 2007; BASI *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2014).

No nitrogênio molecular (N_2), os átomos de N estão unidos por uma tripla ligação covalente, uma das ligações mais fortes conhecidas na natureza, conferindo alta estabilidade à molécula. Desse modo, embora o N_2 represente aproximadamente 80% dos gases da atmosfera, poucos seres vivos são capazes de utilizá-lo. Para servir de nutriente para as plantas, ele precisa ser convertido em formas assimiláveis, como o nitrato (NO_3^-) e o íon amônio (NH_4^+) (HUNGRIA *et al.*, 2001; HUNGRIA *et al.*, 2007).

A fixação biológica do N_2 (FBN) é realizada exclusivamente por procariotos, também conhecidos como bactérias diazotróficas (MOREIRA *et al.*, 2010). Alguns grupos desses microrganismos podem se associar a determinadas espécies vegetais, oferecendo o N necessário para a planta em troca de carboidratos para seu crescimento. Em ambientes pobres em N, essa associação permite que as plantas hospedeiras recebam o N necessário para se desenvolverem. As demais plantas, incapazes dessa associação, necessitam captar o N assimilável diretamente do ambiente, o que pode suprimir seu desenvolvimento em ambientes pobres do nutriente. Os vegetais podem obter o N que necessitam de quatro principais fontes: o solo, que o disponibiliza principalmente pela decomposição da matéria orgânica; a fixação não-biológica de nitrogênio,

decorrente de vulcanismo, combustão e descargas elétricas naturais; fertilizantes químicos nitrogenados; e a FBN (HUNGRIA *et al.*, 2001).

O processo não biológico representa apenas 10% de todo nitrogênio fixado na terra. O uso de fertilizantes químicos nitrogenados representa 25% do mesmo total, porém, há diversos inconvenientes relacionados ao seu uso (HUNGRIA *et al.*, 2001; HUNGRIA *et al.*, 2007). O processo necessário para produção dos fertilizantes nitrogenados é conhecido como Haber-Bosch e requer hidrogênio derivado do petróleo, altas temperaturas (400°C a 600°C) e alta pressão (200 a 800 atm), o que encarece muito o produto (TAIZ e ZEIGER, 2004). Outro aspecto negativo é que apenas 50% do que é aplicado no solo é de fato utilizado pelos vegetais, havendo muita perda do produto por dois fatores principais: transformação para formas gasosas (volatilização na forma de amônia ou desnitrificação pela ação de microrganismos produzindo N_2 , NO ou N_2O); e lixiviação (perda pelas águas da chuva e/ou irrigação). Um agravante é que a lixiviação carrega o nitrogênio da superfície do solo para os rios, lagos e lençóis freáticos, fazendo com que o uso indiscriminado dos fertilizantes acabe por acumular substâncias nitrogenadas, contaminando o ambiente, podendo atingir níveis tóxicos para o homem, peixes e outros animais (HUNGRIA *et al.*, 2007). Ou seja, os benefícios da utilização dos fertilizantes químicos nas culturas vêm acompanhados de altos custos energéticos e diversos danos ao meio ambiente (CARVALHO *et al.*, 2014).

De todo nitrogênio fixado na Terra por essas quatro fontes, estima-se que a fixação biológica seja a mais relevante, contribuindo com 65% do aporte total (HUNGRIA *et al.*, 2001). Outras vantagens de se fazer uso da FBN são: a economia de derivados de petróleo e gás natural (fontes energéticas não renováveis) e, também, a menor poluição de lagos, rios e lençóis freáticos, devido à não utilização de insumos químicos (HUNGRIA *et al.*, 1994; BERRADA e FIKRI-BENBRAHIN, 2014).

3.2 FBN, MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS E ASSOCIAÇÕES SIMBIÓTICAS

Grande parte de todo N que uma leguminosa necessita para se desenvolver pode ser provido pela simbiose com rizóbios. Além de suprir o N para algumas espécies de importância agrícola, as quais podem ser inoculadas no plantio para estimular tal processo (VAN BERKUM *et al.*, 2012), a FBN também pode enriquecer solos de áreas degradadas, pobres em matéria orgânica (MOREIRA *et al.*, 2010; BERRADA e FIKRI-BENBRAHIN, 2014).

As plantas são capazes de germinar e se desenvolver até o final do ciclo de vida sem a associação com os microrganismos diazotróficos, desde que recebam N assimilável de outras fontes, assim como as bactérias, que também se desenvolvem sem a associação com as plantas. Mas, dependendo das condições do ambiente, como a limitação de N, esses organismos se comunicam por uma elaborada série de sinais moleculares que culmina na interação entre eles (TAIZ e ZEIGER, 2004).

As plantas podem se beneficiar do processo de FBN de duas maneiras: diretamente, estabelecendo associações ou simbiose com microrganismos diazotróficos, ou indiretamente, com a mineralização do nutriente após a morte dessas bactérias, ou das plantas associadas a essas bactérias (REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998). Microrganismos diazotróficos não beneficiam as plantas apenas com a FBN, eles também produzem substâncias, como fitohormônios, que podem estimular o crescimento radicular do vegetal, assumindo um importante papel na interação com as plantas e com a ciclagem de nutrientes (MOREIRA *et al.*, 2010).

A FBN é exclusiva das bactérias chamadas de diazotróficas, incluindo espécies de eubactérias Gram-positivas e Gram-negativas e arqueobactérias, todas com grande diversidade morfológica, fisiológica e genética. Estes microrganismos são capazes de quebrar a forte tripla ligação do N₂ e convertê-lo em amônia (NH₃), graças a um complexo

enzimático chamado nitrogenase (VAN BERKUM *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2010).

Essas bactérias podem viver livremente no ambiente, ou se associar a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade, podendo, em termos acadêmicos, ser divididas em três grupos: associativas, endofíticas e simbióticas (HUNGRIA *et al.*, 2007). As bactérias associativas colonizam apenas a rizosfera e a superfície de raízes e folhas. As endofíticas são aquelas capazes de infectar as plantas e viver no seu interior sem causar danos. Já as simbióticas se associam com o hospedeiro formando estruturas especializadas externas, denominadas nódulos, onde ficam alojadas (GRAY e SMITH, 2005).

As estirpes em estudo no presente trabalho se encontram no grupo das bactérias simbióticas, mais especificamente do gênero *Bradyrhizobium*, que se associam com algumas espécies de leguminosas. As relações entre as bactérias simbióticas e as leguminosas nodulíferas são as mais complexas, evoluídas e organizadas do que os outros tipos de associações; essa característica confere aos simbiontes a vantagem de haver mínimas perdas de nutrientes por interferência de fatores externos (MOREIRA *et al.*, 2010; OLDROYD, 2013). Sendo esse tipo de associação uma alternativa eficiente das culturas leguminosas receberem N, tal processo se mostra como uma promissora alternativa para reduzir a administração de fertilizantes químicos nitrogenados no ambiente (CARVALHO *et al.*, 2014).

Os estudos sobre a diversidade dos rizóbios têm grande valor para as pesquisas e procuram descrever espécies com características capazes de maximizar a produtividade agrícola (DAI *et al.*, 2012). Esses estudos não só nos permitem encontrar estirpes de grande interesse biotecnológico, como também apoiam pesquisas que procuram selecionar combinações associativas eficientes entre rizóbio-planta (BERRADA e FIKRI-BENBRAHIN, 2014).

3.3 PROCESSOS DE INFECÇÃO, NODULAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM LEGUMINOSAS

Antes que o processo de FBN propriamente dito inicie, interações e trocas de sinais entre os organismos simbiotes têm que ocorrer. A primeira etapa para o estabelecimento da associação ocorre pelo contato entre os organismos e, para isso, os rizóbios do ambiente circunvizinho precisam migrar em direção às raízes da planta hospedeira. Esse contato é estimulado por substâncias químicas atrativas exsudadas pela planta. Cada tipo de exsudato é capaz de atrair microrganismos específicos para hospedeiros apropriados, incentivando uma associação eficiente (HUNGRIA *et al.*, 2001; TAIZ e ZEIGER, 2006; OLDROYD *et al.*, 2013).

As plantas liberam no solo diversas substâncias orgânicas, muitas das quais propiciam o crescimento e atraem microrganismos na rizosfera (SANTOS e REIS, 2008; CARVALHO *et al.*, 2014). Após os primeiros rizóbios atraídos se aderirem aos tricomas radiculares, outras bactérias se acumulam e se prendem a estas, até que haja um grande número de células. Os simbiotes continuam a produzir moléculas, que induzem a transcrição de vários genes que promovem alterações em ambos os organismos (HUNGRIA *et al.*, 1994; BROUGHTON *et al.*, 2006). As moléculas liberadas pelos rizóbios, denominadas fatores de nodulação, ou fatores Nod, induzem o alongamento e enrolamento do tricoma colonizado, formando um pequeno compartimento onde os microrganismos ficam alojados. Nessa célula, a parede é degradada em resposta ao mesmo fator, permitindo que os rizóbios acessem o córtex da raiz. Juntamente com esta etapa, a planta inicia a formação de um primórdio nodular, onde as bactérias ficarão instaladas para realizar o processo de FBN (TAIZ e ZEIGER, 2006).

Na próxima etapa, um canal de infecção é formado pelo alongamento do tricoma radicular e das células corticais, levando os microrganismos até o primórdio nodular (HUNGRIA *et al.*, 1994). Dentro do nódulo, os rizóbios ficam alojados em uma bolsa membranosa

proveniente da planta, onde continuam se multiplicando até que sinais do hospedeiro sinalizem para a interrupção da multiplicação, tendo início a transformação das bactérias em bacteroides (TAIZ e ZEIGER, 2006).

Os bacteroides são bactérias simbióticas especializadas na FBN e executarão todo processo de FBN até que a planta não necessite mais do nutriente. O nódulo é dotado de um sistema vascular, que favorece a troca do nitrogênio fixado pelos bacteroides por nutrientes ofertados pela planta; além disso, ele tem como função manter os microrganismos protegidos do fluxo livre de oxigênio. No processo de FBN, o N_2 é reduzido pela nitrogenase para que possa reagir com H^+ e formar o gás amônia (NH_3). O processo ocorre em baixa concentração de oxigênio, pois o complexo da enzima necessário para as reações é facilmente inativado por esse elemento (TAIZ e ZEIGER, 2006; OLDROYD, 2013).

3.4 TAXONOMIA E FILOGENIA DE PROCARIOTOS

Os métodos de classificação de organismos permitem com que os cientistas e pesquisadores estudem as espécies e suas relações evolutivas, e as organizem em grupos (classes, ordens, famílias, espécies) relacionados, de acordo com suas características. A taxonomia é o ramo da ciência responsável por essa organização e aborda três seguimentos: classificação, nomenclatura e identificação dos organismos vivos. Com relação aos microrganismos, das características que podem ser visualizadas, ou seja, fenotípicas, poucas servem como parâmetro de classificação, mas graças aos avanços tecnológicos nas áreas de sequenciamento de DNA, outras técnicas de classificações puderam ser elaboradas e têm sido muito utilizadas (VANDAMME *et al.*, 1996).

A taxonomia polifásica classifica os procariotos com base na integração de suas informações genotípicas, fenotípicas e filogenéticas. As características genotípicas são baseadas nos parâmetros genéticos dos indivíduos; as fenotípicas são baseadas em funções e características expressas pelos genes; e a filogenia representa o estudo das relações

evolutivas de cada grupo, posicionando-os sistematicamente de acordo com ancestrais em comum (VANDAMME *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1999; GEVERS *et al.*, 2005). A filogenética molecular é caracterizada como o estudo das relações evolucionárias entre os organismos utilizando dados moleculares, como DNA, RNAr e sequências proteicas (DAI *et al.*, 2012).

Zuckerkindl e Pauling (1965) iniciaram esta revolução tecnológica, inferindo que as biomoléculas dos seres vivos poderiam ser utilizadas como parâmetros evolutivos. Posteriormente, Woese e Fox (1977) concluíram que, para determinar relações de um grande grupo de indivíduos, seria necessário que a molécula utilizada fosse amplamente distribuída nos seres vivos. A fim de definir um marcador filogenético universal, os autores propuseram que se fizesse uso das sequências de RNA ribossomal, mais precisamente da menor subunidade ribossômica, 16S para procariotos e 18S para eucariotos. Como estes genes evoluem muito lentamente, podem mostrar derivações muito antigas entre espécies, o que genes que sofrem alterações mais rápidas não conseguem apontar. Além disso, por sua função essencial, acreditava-se que não ocorria recombinação e nem transferência horizontal nesses genes, a fim de não comprometer as funções de tradução do indivíduo. O desenvolvimento de métodos para análises dos genes ribossomais permitiu que os pesquisadores desenvolvessem a classificação filogenética de procariotos, independentemente das características fenotípicas ou simbióticas (RIVAS *et al.*, 2009).

Com os avanços nos estudos com genes ribossomais, uma árvore filogenética universal pôde ser construída, agrupando os organismos em três domínios: Bacteria, Archaea e Eucaria (WOESE *et al.*, 1990). As árvores filogenéticas representam uma maneira legítima de se analisar, estudar e entender os processos biológicos e a evolução dos seres vivos (PINTEIRO e VIANA, 2005). Em uma árvore filogenética as extremidades são os nós externos, e representam as espécies em estudo. Os nós internos representam ancestrais hipotéticos, cujas informações só são inferidas com base nas informações passadas por seus descendentes, os

organismos em estudo. Os ramos conectados aos nós representam tal descendente e o comprimento desses ramos representa as diferenças entre os ancestrais e os descendentes. Observando os ramos de uma mesma árvore vemos ramos curtos, que representam grande similaridade entre os representantes e ramos longos, que representam maior diversidade. Ao se analisar uma árvore filogenética é importante lembrar que os dados ali presentes não são fatos comprovados, e sim estimativas geradas pelas análises (Hall, 2011).

Hoje, com as técnicas mais avançadas, não se faz uso apenas dos genes ribossomais para a construção de árvores filogenéticas, mas também de outros genes, denominados *housekeeping*, envolvidos em funções essenciais e amplamente distribuídos nos grupos de indivíduos em estudo.

3.5 GRUPOS TAXONÔMICOS DE RIZÓBIOS

Toda a evolução no campo da sistemática bacteriana refletiu em contínuas modificações na taxonomia de bactérias. Com os rizóbios não foi diferente; as divisões dos níveis taxonômicos passaram por muitas alterações (STRALIOTTO, 2006). Bactérias capazes de se associarem às leguminosas e fixarem N_2 foram descobertas no século XIX e, inicialmente, foram classificadas no gênero *Rhizobium* e nomeadas de acordo com as plantas às quais se associavam, utilizando o sistema de classificação por inoculação cruzada (RIVAS *et al.*, 2009). Esse conceito entrou em desuso após pesquisadores constatarem que uma mesma planta pode conter diferentes bactérias simbióticas. Assim, características morfológicas, metabólicas e genéticas passaram a ser inseridas nos processos de identificação e classificação desses microrganismos (WILLEMS, 2006), levando à conclusão de que os integrantes do gênero *Rhizobium* deveriam ser divididos em dois grupos, um com as estirpes de crescimento rápido e outro com as de crescimento lento em meio de

cultura contendo manitol como fonte de carbono, o YMA (*yeast manitol agar*) (RIVAS *et al.*, 2009).

Atualmente, os rizóbios estão divididos em cinco gêneros dentro da subclasse α -proteobacteria. De acordo com informações dos bancos de dados do bioportal *StrainInfo*, o gênero *Rhizobium* é o maior dos cinco, incorporando 71 espécies de bactérias. O segundo maior gênero é o *Mesorhizobium*, com 29 espécies descritas até o momento. O gênero *Bradyrhizobium* é caracterizado por ter crescimento mais lento que as estirpes dos outros gêneros e, em compilação recente, inclui 20 espécies (PEIX *et al.*, 2015). Cabe comentar que nos sites especializados, no LPSN (2014) ainda não consta *B. diazoefficiens*, enquanto que no *StrainInfo* (2014), *B. elkanii* não está incluído. Além disso, é necessária uma atualização contínua, pois novas espécies vêm sendo descritas, por exemplo, *Bradyrhizobium manauense* (SILVA *et al.*, 2014). Os últimos dois gêneros são *Sinorhizobium*, com 11 espécies e *Azorhizobium*, com três espécies (*StrainInfo*, 2014). Ainda dentro dessa subclasse, outros dois gêneros foram inicialmente propostos e descritos, *Agrobacterium* e *Allorhizobium*. Young *et al.*, (2001) propuseram que essas duas espécies fossem inseridas no gênero *Rhizobium*. Recentemente, porém, outros autores propuseram que o gênero *Agrobacterium* englobasse as bactérias patogênicas de plantas (FARRAND *et al.*, 2003), e um novo gênero foi proposto para as não patogênicas, *Neorhizobium* (MOUSAVI *et al.*, 2014). Existem ainda, outros gêneros de microrganismos com espécies nodulíferas, tanto entre as α -proteobacterias, quanto entre as β -proteobacterias. Dentre estes gêneros estão *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Shinella*, *Microvirga*, *Phyllobacterium*, *Cupriavidus* (previamente *Ralstonia*) e *Gluconacetobacter*, entre outros (ARDLEY *et al.*, 2012; RIVAS *et al.*, 2009).

3.6 REQUISITOS PARA DESCRIÇÃO DE ESPÉCIES NOVAS DE PROCARIOTOS

A revista científica *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM), é publicada pela *Society for General Microbiology* (SGM) e estimula a publicação de artigos que envolvam, dentre outras coisas, a sistemática da classificação de procariotos. Os requisitos necessários para publicar a descrição de espécies novas devem ser seguidos de acordo com os padrões dessa revista, que apresenta os padrões definidos pelo comitê internacional, e envolvem diversas análises que podem variar com o gênero do organismo.

Para qualquer publicação de nova espécie, uma estirpe tipo deve ser designada e depositada em duas coleções de cultura de países diferentes, e os números de acesso das estirpes devem estar descritos no artigo. Essa estirpe deve ser estudada com abordagem polifásica, incluindo características genéticas e fenotípicas. Estirpes dessa espécie precisam ser estudadas intimamente, a fim de se descobrir suas diversidades intraespecíficas. Análises como hibridação DNA-DNA e *fingerprinting* devem ser realizadas entre as espécies novas e estirpes-tipo de grupos relacionados; atualmente, a revista tem encorajado a substituição da técnica de hibridação DNA-DNA pela *Average Nucleotide Identity* (ANI). O Gene 16S RNAr deve ser sequenciado (pelo menos 1300 nucleotídeos), estudado e disponibilizado em algum banco de dados público. Estirpes de grupos relacionados devem ser estudadas juntamente com a espécie nova, e as diferenças entre elas devem ser apontadas.

É recomendado que o estudo contenha dados de marcadores quimiotaxonômicos, como perfil de ácidos graxos. O conteúdo G + C da nova espécie deve ser definido, e um estudo de MLSA pode ser conduzido (todas as sequências e números de acesso devem ser publicados). Os alinhamentos devem ser utilizados para a construção de árvores filogenéticas que devem ser analisadas no estudo. Um nome deve ser proposto à espécie, bem como uma descrição com toda informação necessária para a identificação da nova espécie (IJSEM, 2014).

3.7 METODOLOGIAS DE ANÁLISES TAXONÔMICAS

3.7.1 RNA Ribossomal 16S e Genes *Housekeeping*

As análises do gene ribossomal 16S consistem em uma comparação nucleotídica de similaridade entre as espécies em estudo. Inicialmente, foi definido que isolados que apresentavam sequências com similaridade inferior a 97% em relação à estirpe-tipo, representariam possíveis novas espécies (VANDAMME *et al.*, 1996). Esses genes conservados podem servir como parâmetros evolutivos, porque as substituições de bases no DNA são proporcionais ao tempo de evolução que a espécie sofreu a partir de seus ancestrais. Assim, é possível estimar o tempo e o nível de diferenciação das espécies em estudo (LLORET e MARTÍNEZ-ROMERO, 2005). Hoje, com o avanço dos bancos de dados, é possível comparar sequências de estirpes desconhecidas com sequências de todas espécies descritas, facilitando a identificação das espécies já descritas e de possíveis novas espécies.

Depois que a utilização do RNAr como relógio molecular se mostrou eficiente, diversos laboratórios começaram a estudar com maior profundidade as características dos genes ribossomais. Inicialmente, por serem genes envolvidos na síntese de proteínas, não se acreditava que eles sofriam recombinações ou transferências horizontais, mas hoje alguns trabalhos sugerem a existência dessa recombinação em populações naturais (SNEATH, 1993; GAUNT *et al.*, 2001; VAN BERKUM *et al.*, 2003). Outro detalhe importante é o alto nível de conservação desses genes, não permitindo, em alguns casos, a diferenciação de espécies bastante relacionadas filogeneticamente. Sendo assim, árvores filogenéticas baseadas apenas nas análises do gene 16S RNAr podem não representar a filogenia correta, ou não diferenciar algumas espécies relacionadas (EARDLY *et al.*, 2005; MARTENS *et al.*, 2007; LARANJO *et al.*, 2012).

Com a intenção de solucionar este problema, pesquisadores sugeriram genes que codificam proteínas conservadas, chamados de

genes *housekeeping*, como marcadores filogenéticos alternativos. Esses genes apresentam um maior grau de divergência entre as espécies, uma vez que evoluem em uma taxa mais rápida que o 16S RNAr, mas são conservados o suficiente para manterem as relações filogenéticas das espécies (MARTENS *et al.*, 2007; STACKEBRANDT *et al.*, 2002; LARANJO *et al.*, 2012; BERRADA e FIKRI-BENBRAHIN, 2014). Alguns critérios são estabelecidos para a escolha desses genes: eles devem ter uma distância mínima no genoma de 100 kb; precisam estar em uma única cópia no genoma; devem ter tamanho apropriado para serem sequenciados e conterem informações suficientes para as análises (ZEIGLER, 2003).

Alguns desses genes já foram utilizados como marcadores alternativos em estudos com rizóbios, como por exemplo: *atpD*, *recA*, *glnA*, *glnB*, *glnII*, *dnaK*, *gltA*, *rpoA*, *rpoB* e *gyrB* (WERNEGREEN e RILEY, 1999; TURNER e YOUNG, 2000; GAUNT *et al.*, 2001; STEPKOWSKI *et al.*, 2003; HERNANDEZ-LUCAS *et al.*, 2004; MENNA *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009; DEGEFU *et al.*, 2011; DELAMUTA *et al.*, 2012; DALL'AGNOL *et al.*, 2013). Curiosamente, as árvores formadas em alguns desses estudos nem sempre confirmam a filogenia mostrada pela árvore do 16S RNAr, reafirmando a limitação de se fazer uso de apenas um gene para construção de árvores filogenéticas. Para eliminar esses erros, os cientistas começaram a fazer uso de uma sequência concatenada de pelo menos cinco genes *housekeeping* para analisar e elucidar as relações filogenéticas entre os microrganismos (STACKEBRANDT *et al.*, 2002).

3.7.2 *Multilocus Sequence Typing* – MLST e *Multilocus Sequence Analysis* – MLSA

Ambas as técnicas utilizam uma sequência concatenada dos genes organizados sequencialmente e em mesma ordem para todas as linhagens em estudo, o que fornece um tampão contra os erros gerados por recombinação genética de um ou outro gene analisado isoladamente

(STACKEBRANDT *et al.*, 2002; KONSTANTINIDIS *et al.*, 2006; VAN BERKUM *et al.*, 2012; DAI *et al.*, 2012).

Com base nesse tipo de análise, duas metodologias foram desenvolvidas. A primeira delas é o *Multilocus Sequence Typing* (MLST), método de caracterização genotípica de procariotos em nível infraespecífico, com base no sequenciamento e análise de alguns genes específicos formando uma sequência concatenada, utilizada para comparar similaridade alélica entre espécies (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; GEVERS *et al.*, 2005; KONSTANTINIDIS *et al.*, 2006). O MLST é uma ferramenta específica designada para epidemiologia molecular, a fim de diferenciar linhagens de mesma espécie (GEVERS *et al.*, 2005), contudo, pode ser utilizada para determinar a ocupação de microrganismos no nódulo e, também, para ajudar a determinar a influência de diversos fatores, como localização geográfica, temperatura, tipo de solo, planta hospedeira e na distribuição do genótipo entre as bactérias (VAN BERKUM *et al.*, 2012).

A metodologia MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) foi desenvolvida com base no MLST. Ela é utilizada na classificação de espécies e organização dos microrganismos em seus grupos específicos baseados em suas relações taxonômicas com base na filogenia, e tem se mostrado uma ferramenta poderosa nas pesquisas de diversidade de espécies (RONG e HUANG, 2012). Para isso, a técnica utiliza genes amplamente distribuídos em todo o grupo em estudo e em uma única cópia por indivíduo. Esta técnica pode diferenciar estirpes que inicialmente eram identificadas apenas quanto ao gênero ou família por outras técnicas, como análise do 16S, diferenciando e classificando-as em suas respectivas espécies (GEVERS *et al.*, 2005).

3.7.3 PCR-BOX, Hibridação DNA-DNA, *Average Nucleotide Identity* – ANI

Uma das formas de se avaliar características genéticas entre as espécies procarióticas é por meio de um perfil da identidade do genoma

das estirpes em estudo, utilizando-se técnicas de *fingerprinting*. O genoma das bactérias contém sequências que se repetem diversas vezes e estão distribuídas por toda molécula de DNA, mas a localização dessas sequências e o número de vezes que se apresentam no genoma são característicos de cada estirpe (VERSALOVIC *et al.*, 1994). Ainda não se sabe exatamente a função dessas sequências repetidas no genoma, mas a presença delas pode ser explorada para algumas aplicações da genética molecular (LUPSKI e WEINSTOCK, 1992). O perfil de BOX-PCR pode ser obtido utilizando-se um iniciador específico capaz de alinhar-se com essas regiões (BOX) e amplificar o genoma a partir de cada pareamento (KASCHUK *et al.*, 2006). O produto final da reação é composto por diversos fragmentos amplificados do genoma, de diversos tamanhos diferentes, que quando aplicados em gel e submetidos à eletroforese se separam identificando o perfil genômico da espécie. Os fragmentos pequenos correm mais no gel de eletroforese, enquanto que os fragmentos grandes correm pouco pela malha do gel.

A análise de hibridação DNA-DNA permite que dois genomas sejam comparados por pareamento de bases, definindo uma porcentagem de similaridade entre eles. Para isso, dois genomas distintos devem ser desnaturados, misturados e, depois, induzidos à reassociação das fitas, formando uma molécula híbrida que contém uma fita de cada genoma. Quanto maior a similaridade dos genomas, maior é a interação das fitas para formar a fita híbrida, assim, maior deverá ser a temperatura (T_m , temperatura de *melting*) para desnaturar e separar novamente as fitas. Para que uma estirpe seja classificada em uma espécie, é necessário que a mesma tenha pelo menos 70% de similaridade de genoma na hibridação DNA-DNA com a estirpe-tipo, e no máximo 5°C de diferença entre as T_m da molécula híbrida e dos homólogos (STRALIOTO, 2006; GEVERS *et al.*, 2005).

Esta técnica é amplamente utilizada entre os laboratórios e apresenta resultados fidedignos, mas também trás alguns inconvenientes, como alto custo. Além disso, diversas metodologias podem ser utilizadas

para se aplicar esta técnica, o que faz com que muitos laboratórios tenham dificuldade de reproduzir resultados de outros pesquisadores. Uma das maiores críticas à técnica é que o resultado não pode ser disponibilizado em bancos de dados para análises posteriores, ou comparações com outros genomas (RAMOS *et al.*, 2011). Cada vez que se deseja obter este tipo de resultado, os dois genomas precisam passar por todo processamento de hibridação DNA-DNA.

Baseado nesse problema, a hibridação passará a ser cada vez menos utilizada. Outras técnicas têm sido sugeridas para substituir a hibridização DNA-DNA, sendo uma delas a determinação do ANI (*Average Nucleotide Identity*). A metodologia de ANI consiste no sequenciamento dos genomas das estirpes em estudo. A seguir, é realizada a comparação das sequências por bioinformática, e o resultado representa uma porcentagem de similaridade entre as espécies, que pode ser considerada próxima da hibridação em, aproximadamente, 95-96% (KONSTANTINIDIS *et al.*, 2006). A vantagem desta técnica é que as sequências podem ser armazenadas e comparadas com qualquer outra estirpe, nova ou já descrita. Uma vez sequenciado, não é mais necessário que as amostras passem por novo processamento.

3.8 TESTES FENOTÍPICOS

As análises fenotípicas realizadas envolvem caracterização morfofisiológica e os testes incluem a capacidade de uso de diferentes fontes de carbono pelas estirpes; resistência ou sensibilidade a diversos antibióticos; observação da manifestação do crescimento das colônias, tamanho, forma, cor, alterações no pH do meio; dados de crescimento da estirpe em meio com NaCl, ureia, diversos valores de pH e temperaturas, entre outros detalhes (VANDAMME *et al.*, 1996).

Outra maneira de se avaliar perfis característicos de células bacterianas é baseada no princípio de que muitos microrganismos são bastante enriquecidos com diferentes ácidos graxos, podendo ser

avaliados qualitativamente. Esses compostos se apresentam em diferentes concentrações e composições nas células, mas podem apresentar um padrão para grupos de bactérias relacionadas, podendo ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos. Definir o perfil de ácidos graxos resulta em um dado que pode confirmar a relação taxonômica entre as estirpes em estudo (VANDAMME *et al.*, 1996).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos do MLSA e análises fenotípicas foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Solos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja), no distrito da Warta, Londrina, Paraná. O sequenciamento dos genomas foi conduzido no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) em Petrópolis – Rio de Janeiro e na Embrapa Soja. A análise de perfil de ácidos graxos foi realizada na Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna, São Paulo.

4.1 ESTIRPES ESTUDADAS

Todas as estirpes foram isoladas no Brasil e foram, originalmente, depositadas na Coleção Nacional de Rizóbios (SEMIA, Seção de Microbiologia Agrícola) do banco da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO). Hoje estão depositadas também na Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas (Coleção WFCC # 1213, WDCC # 1054) (Tabela 1).

As estirpes foram crescidas em meio YMA (extrato de levedura, manitol e ágar) e incubadas por sete dias a 28°C até a formação de colônias visíveis (VINCENT, 1970). O indicador vermelho Congo (VC) foi adicionado ao meio a fim de apontar contaminações. As estirpes foram estocadas em tubos inclinados com meio YMA.

Tabela 1 – Denominação das estirpes analisadas, suas respectivas plantas hospedeiras e designações na coleção de origem.

Identificações da estirpe (SEMIA - CNPso)	Planta hospedeira ¹	Nome comum da planta hospedeira	Coleção provedora ²	Designações ²
690 - 991	<i>Centrosema pubescens</i>	Centro, Jetirana	IPEACS	C 100a; BR 1804
6096 - 1104	<i>Bowdichia virgilioides</i>	Sucupira-preto, Cutíúba	EMBRAPA / UAPNPBS	BR 8601
6159 -1122	<i>Enterolobium ellipticum</i>	Timburi	EMBRAPA / UAPNPBS	BR 4406
6387 - 1153	<i>Acacia auriculiformis</i>	Acacia auriculada	EMBRAPA / CNPBS	BR 3609
6399 - 1165	<i>Lonchocarpus costatus</i>	Embira de carrapato, Pau de carrapato	EMBRAPA / CNPBS	BR 6010; CVRD-4-III
6400 - 1166	<i>Dimorphandra exaltata</i>	Faveiro do Paraná	EMBRAPA / CNPBS	BR 5005; PT-1-II
6403 - 1169	<i>Albizia saman</i>	Árvore da chuva	EMBRAPA / UAPNPBS	BR 6205
6404 - 1169	<i>Lonchocarpus costatus</i>	Embira de carrapato, Pau de carrapato	EMBRAPA / CNPBS	BR 6009
6405 - 1171	<i>Albizia saman</i>	Árvore da chuva	EMBRAPA / CNPBS	BR 6212; PNPBS 105-1
6408 - 1174	<i>Pithecellobium pedicellare</i>	Jaguarana	EMBRAPA / CNPBS	BR 6815
6414 - 1108	<i>Bowdichia virgilioides</i>	Sucupira-preto, Cutíúba	EMBRAPA / CNPBS	BR 8602
6416 - 1182	<i>Piptadenia pterosperma</i>	Angico roxo	EMBRAPA / CNPBS	BR 9004; CVRD-13-II
6428 - 1190	<i>Acacia saligna</i>	Acácia das dunas	CNPAB / EMBRAPA	BR 3628
6432 - 1193	<i>Albizia falcata</i>	Albícia	CNPAB / EMBRAPA	BR 5611
6433 - 1194	<i>Inga sessilis</i>	Ingazeiro, Ingá banana	CNPAB / EMBRAPA	BR 6609

Fonte: FEPAGRO.

¹ Nomenclatura segundo ILDIS (2014).

² De acordo com a Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO).

4.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

4.2.1 Extração do DNA Total

As estirpes foram inoculadas em YM líquido por sete dias. Posteriormente, as suspensões bacterianas foram utilizadas para extração do DNA total. A extração foi realizada utilizando-se o kit *AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep* da Axygen Biosciences, seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.2 Amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

As amostras de DNA de cada estirpe foram submetidas a reações de amplificação por PCR do gene 16S RNAr e de quatro genes *housekeeping*: *glnII*, *gyrB* e *recA*. O gene *glnII* está envolvido na produção de glutamina sintetase, o *gyrB* tem informações para produção da subunidade B da enzima DNA-girase, e o *recA* está envolvido na produção de recombinase A (MARTENS *et. al.*, 2008; RIVAS *et. al.*, 2009).

Para cada reação foi preparado um *mix* contendo tampão 10X (Tris-base a 200 mM, pH 8,4, KCl a 500 mM), dNTPs (0,3 mM de cada base), MgCl₂ (1,5 mM), enzima Taq DNA polimerase (1 U), iniciadores referentes a cada gene a ser amplificado (10 pmol/reação), DNA (de 10 a 20 ng/μL) e água ultrapura esterilizada até completar o volume final de 50 μL. As amostras foram submetidas aos ciclos de tempo e temperatura determinados, a fim de que ocorram os processos de desnaturação das fitas duplas, anelamento dos iniciadores e amplificação dos genes de interesse. A sequência de cada iniciador e os ciclos utilizados estão descritos na Tabela 2. Após a amplificação, as amostras foram purificadas com o *kit* de purificação *PureLink Quick PCR Purification* (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante.

Tabela 2 – Sequências de cada iniciador utilizado para amplificação e sequenciamento dos genes de interesse e seus respectivos ciclos de amplificação.

Gene	Iniciador	Sequência 5' - 3'	Ciclos (referência)
16S	fd1*	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	
	rD1*	CTTAAGGAGGTGATCCAGCC	
	Y2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	2 min 95°C, 30 X (15s 94°C, 45 s 93°C, 45 s 55°C, 2 min 72°C and 5 min 72°C)
	362f	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	(WEISBURG <i>et al.</i> , 1991)
	786f	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	
	1203f	GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC	
<i>glnII</i>	TSglnII _f	AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1,5 min 72°C and 7 min 72°C)
	TSglnII _r	SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCC	(STEPKOWSKI <i>et al.</i> , 2005)
<i>gyrB</i>	gyrB343f	TTCGACCAGAAATCCTAYAAGG	5 min 95°C, 5X (2 min 94°C, 2 min 58°C, 1 min 72°C) 28 X (30 s 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C and 5 min 72°C)
	gyrB1043r	AGCTTGTCTTSGTCTGCG	(MARTENS <i>et al.</i> , 2008)
<i>recA</i>	TSrecA _f	CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG	2 min 95°C, 35X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 90 s 72°C), 7 min 72°C.
	TSrecA _r	CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG	(STEPKOWSKI <i>et al.</i> , 2005)

*Iniciador utilizado somente na amplificação.

Fonte: Próprio autor.

As estirpes também foram submetidas à análise de perfil de BOX-PCR, utilizando-se o primer BOX A1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'). Os ciclos de amplificação foram realizados conforme Kaschuk *et al.* (2006) (7 min a 95°C, 30x (1 min a 94°C, 1 min a 53°C, 8 min a 65°C), 16 min a 65°C). O perfil de bandas formado foi visualizado em gel de

agarose 1,5% corado com brometo de etídio a 0,00005%. O dendrograma do BOX-PCR foi construído com o programa Bionumerics (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Bélgica, v.7.1), utilizando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) (SNEATH e SOKAL, 1973) para a análise do agrupamento e o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912), com 3% de tolerância.

4.2.3 Reações de Sequenciamento e Análises Filogenéticas

Os genes 16S RNAr, *glnII*, *gyrB*, e *recA* foram sequenciados. Uma placa de sequenciamento foi montada contendo as amostras de DNA (20 ng) de cada estirpe, *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* e os iniciadores respectivos para cada gene (Tabela 2), e foi submetida aos ciclos de desnaturação e anelamento em termociclador (1 min a 96°C, 15 s a 96°C, 15 s a 50°C e 4 min a 60°C em um ciclo que se repetiu 35 vezes). Após a amplificação, o DNA foi precipitado conforme descrito por Menna *et al.* (2006), depois foi ressuspendido em 10 µL de formamida Hi-Di, desnaturado a 95°C por 2 min e a choque térmico em gelo por 2 min. A leitura das amostras foi realizada no sequenciador automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems).

As sequências foram analisadas com o programa *Bionumerics* versão 7.1 e corrigidas manualmente com base em sequências depositadas no banco de dados do NCBI. Após essa etapa, as sequências foram alinhadas e cortadas utilizando-se o programa MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA *et al.*, 2011). Uma sequência concatenada foi montada manualmente com as sequências dos quatro genes *housekeeping* de cada estirpe, seguindo a mesma ordem (*glnII*, *gyrB* e *recA*). As árvores filogenéticas dos genes 16S RNAr e *housekeeping* (individuais e concatenados) foram construídas utilizando o programa MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2011), o modelo de distância evolutiva de Tamura-Nei (TAMURA e NEI, 1993) e o algoritmo Maximum Likelihood (ML) (FELSENSTEIN, 1981). O suporte estatístico foi dado pela análise de

bootstrap (FELSENSTEIN, 1985), com 1.000 repetições (HEDGES, 1992). A estirpe *Xanthobacter autotrophicus* Py2^T foi utilizada como *outgroup* (DELAMUTA *et al.*, 2013).

4.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

A estirpe SEMIA 690 foi escolhida como representante do principal grupo em estudo. A extração de ácidos graxos e análises do perfil dos mesmos na SEMIA 690 foram realizadas conforme descrito anteriormente (DELAMUTA *et al.*, 2013).

4.4 AVERAGE NUCLEOTIDE IDENTITY E CONTEÚDO G + C

O genoma da estirpe SEMIA 690 foi sequenciado no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) em Petrópolis – Rio de Janeiro, em sequenciador Ion PGM em um chip 318 usando *kit* de 400 pb., conforme instruções do fabricante. Com as informações do genoma, foi estimado o ANI e o conteúdo G + C (DALL'AGNOL *et al.*, 2014).

4.5 TESTES MORFOFISIOLÓGICOS

As estirpes SEMIAS 690, 6387 e 6428 foram selecionadas para testes que visam a descrição de espécies. As análises morfológicas testadas visaram caracterizar a manifestação de crescimento, diâmetro, forma, elevação, borda e superfície das colônias, alteração do pH, produção de muco, consistência da massa de crescimento, cromogênese das colônias, coloração de Gram e detalhes ópticos. Para as análises fisiológicas, diversas fontes de carbono e a resistência ou sensibilidade a antibióticos foram avaliadas. Todos os testes foram realizados em duplicata, como descrito por Vincent (1970) e Martínez-Romero *et al.* (1991), com algumas modificações.

4.5.1 Avaliação do Crescimento e Diâmetro das Colônias

As estirpes foram inoculadas em placas de Petri contendo meio YMA e indicador de contaminação vermelho Congo (pH 6,8), pela técnica de esgotamento, e foram incubadas a 28°C. A manifestação do crescimento das estirpes foi classificada entre rápida (até 3 dias), intermediária (4 a 5 dias), lenta (6 a 9 dias) ou muito lenta (superior a 10 dias), sendo necessário pelo menos três colônias para registrar o crescimento. Após sete dias de crescimento das colônias, as mesmas foram medidas com auxílio de um paquímetro e a média das colônias foi registrada em milímetros (mm).

4.5.2 Forma, Elevação, Borda e Superfície das Colônias

Após 7 dias de incubação a forma das colônias foi classificada como circular, oval (elíptica) ou irregular. Observando-se as placas pela lateral, a elevação das colônias foi classificada como plana (rente à placa), ou convexa (crescimento consideravelmente acima do meio de cultura). A borda das colônias foi classificada como lisa, ondulada ou filamentosa; e a superfície foi classificada como lisa ou rugosa.

4.5.3 Alteração no pH do meio

Para a condução desse teste, as estirpes foram inoculadas em meio YMA com indicador azul de bromotimol. O meio inicial tem coloração esverdeada, mas quando sofre alcalinização fica azul, e quando sofre acidificação fica amarelo. A reação é considerada sem alteração de pH (neutra) quando o meio não altera a cor após o crescimento.

4.5.4 Produção de Muco e Consistência da Massa de Crescimento

A análise de produção de muco das estirpes foi baseada na média do tamanho que as colônias apresentam três dias após a manifestação de crescimento, podendo ser classificadas em: pouca produção (diâmetro $\leq 1,9$ mm), produção moderada (diâmetro entre 2 a 3,9 mm) e produção abundante (diâmetro ≥ 4 mm).

Para definir a consistência das colônias, foi utilizada uma alça de platina flambada e resfriada, raspando delicadamente sobre uma colônia isolada, cada qual classificada entre aquosa (desmancha totalmente quando tocada), seca (com pouca quantidade de muco), gomosa (pode ser arrastada sobre o meio deixando um pequeno rastro), e viscosa (quando tocada pela alça forma um fio elástico entre a alça e o meio).

4.5.5 Cromogênese das colônias em meio com Azul de Bromotimol e Vermelho Congo

As estirpes cultivadas em placas contendo meio YMA com azul de bromotimol (ABT) tiveram as colônias classificadas como creme, amarela, rosa ou azul. As culturas cultivadas em meio YMA com VC tiveram as colônias classificadas como branca, rosada, avermelhada (centro) ou vermelha.

4.5.6 Detalhes Ópticos

As colônias foram classificadas como transparentes, ou opacas. Isso foi observado fazendo-se risco com caneta no fundo da placa e abaixo de uma porção abundante de massa celular. Se o risco for visível através da massa celular, a colônia é considerada transparente. Mas, se o risco for pouco visível ou totalmente coberto pela massa celular, a colônia é considerada opaca.

4.5.7 Capacidade de Utilização de Fontes de Carbono (C)

Foram testadas 49 fontes de carbono que as estirpes podem ser aptas a degradarem e utilizarem em seu metabolismo. Para o preparo o teste foi feito um pré-inóculo de cada estirpe selecionada em meio YM. As amostras foram incubadas a 28°C, por cinco dias, sob agitação de 100 rpm. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas por 10 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o pélete foi ressuspenso em 5 mL de solução salina a 0,85% e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado e o pélete ressuspenso em 2 mL de água ultrapura e transferido para tubo de ensaio esterilizado. Neste tubo a concentração da cultura foi ajustada para, aproximadamente, 10^9 células/mL, tendo-se como base a escala de McFarland. Para isso, foi utilizado um conta gotas para deslocar a amostra para outro tubo de ensaio, contendo 5 mL de água ultrapura. Depois de ajustada a concentração de células, um volume do inóculo foi transferido (dobro do volume utilizado no ajuste de concentração) para um frasco de vidro contendo 10 mL de meio de cultura modificado (YM sem manitol e com indicador azul de bromotimol). A suspensão final foi testada em placas API 50CH kit (BioMérieux) e incubada por sete dias a 28 °C. O resultado é dado de acordo com a intensidade da alteração de cor, sendo positivo (a estirpe metaboliza a fonte de carbono) quando a alteração de cor é intensa, negativo (a estirpe não metaboliza a fonte de carbono) quando não há alteração de cor, ou fraco (a estirpe é capaz de metabolizar muito pouco desta fonte de carbono) quando há pouca alteração de cor.

4.5.8 Tolerância a Antibióticos

As estirpes foram testadas quanto à resistência a oito antibióticos: cefuroxima (30µg/mL), neomicina (30 µg/mL), ácido nalidíxico (30 µg/mL), bacitracina (0,04U/disk), cloranfenicol (30 µg/mL), tetraciclina (30 µg/mL), estreptomicina (10 µg/mL) e eritromicina (15 µg/mL) utilizando a metodologia de disco-difusão (BAUER e KIRBY, 1966). Para o teste, um pré-inóculo de cada estirpe foi preparado com meio YM líquido e incubado para crescimento sob agitação de 100 rpm a 28°C por cinco dias. Após o crescimento, 100 µL de cada amostra foram inoculados em placas de Petri e espalhados com alça de Drigalski por toda superfície do meio YMA. Os discos contendo concentrações específicas dos antibióticos testados foram colocados na superfície do meio e no centro de cada metade da placa. As placas foram incubadas por sete dias a 28°C. A resistência ou sensibilidade de cada estirpe foi indicada pela presença ou não de halo de inibição, que foi medido com auxílio de um paquímetro.

4.5.9 Avaliação do Crescimento em Diferentes Condições

Também foi testada e registrada a capacidade das estirpes crescerem em meio, pH e temperatura ideais (YM, pH 6,8 e 28°C, respectivamente); em meio com pH 4,5 e pH 8,0 (28°C); em temperaturas de 37°C e 40°C (pH 6,8). Esses testes foram feitos a partir da inoculação dos isolados nos meios ajustados e incubação nas condições citadas, sob agitação a 100 rpm por sete dias. O crescimento em meio líquido foi avaliado pela densidade ótica em espectrofotômetro com absorvância de 600nm.

A capacidade de crescimento em meio LB, em meio YMA com 1% de NaCl e em meio YMA com 2% de ureia e indicador de pH vermelho de fenol (0,012 g/L) também foi analisada. Após a incubação, as placas foram observadas e os resultados registrados. As placas com 1% de NaCl foram observadas quanto à presença (+) ou ausência (-) de crescimento.

As placas com 2% de ureia foram observadas quanto à cor do meio. O meio inicial é amarelado, e, se após a incubação permanecer amarelo, a estirpe não possui a enzima urease e, portanto, não degrada ureia. Quando a cor do meio altera-se para rosa, constata-se a presença da urease e, conseqüente degradação da ureia. A fraca alteração de cor indica baixa atividade da urease.

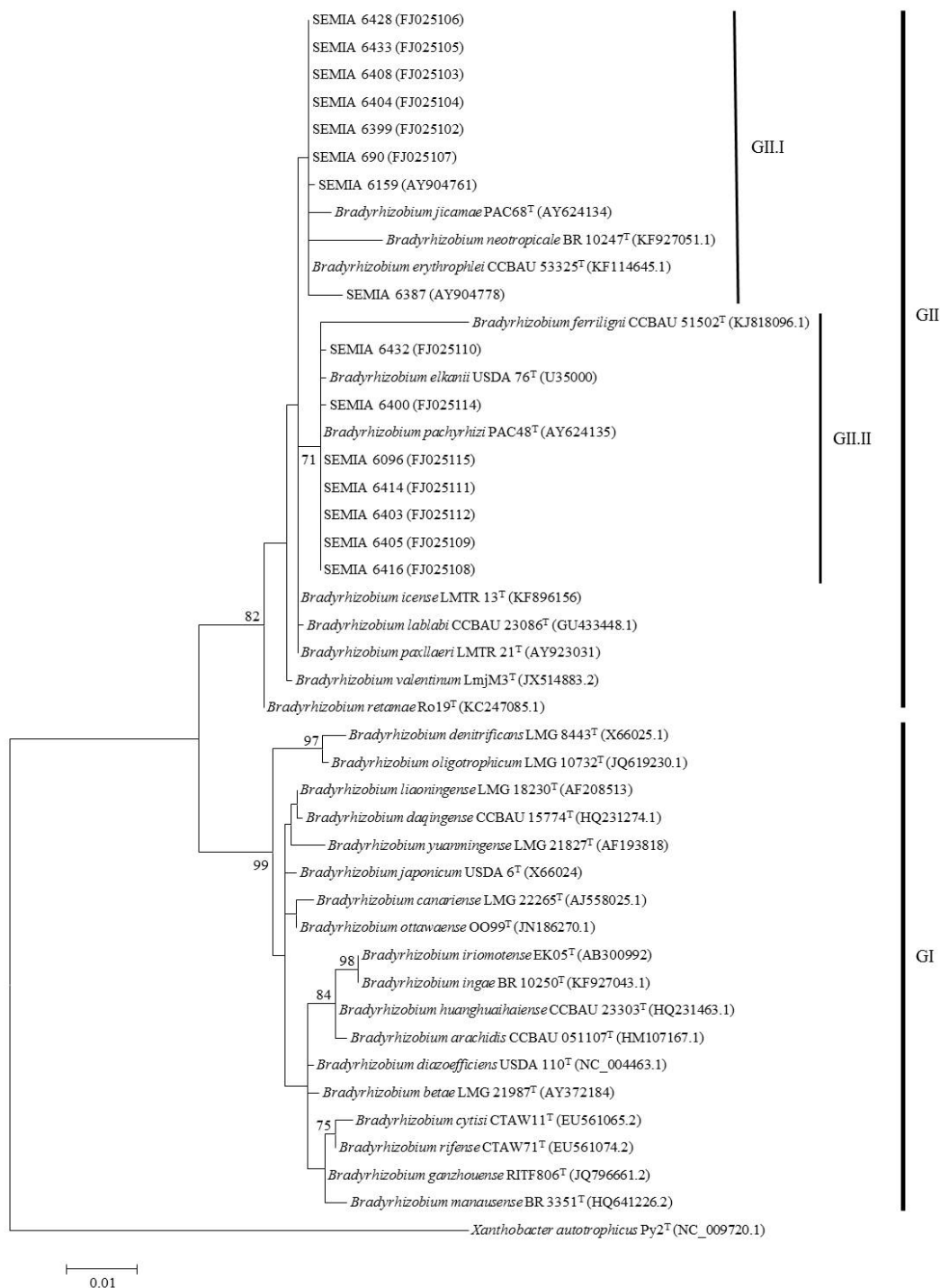
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE 16S RNAr

A árvore filogenética construída a partir das sequências do gene 16S RNAr resultou na formação de dois grandes grupos e algumas estirpes ocupando posições isoladas (Figura 1). Os dois grandes grupos formados foram os superclados de *B. japonicum* (GI) e de *B. elkanii* (GII). O grupo GI englobou 18 estirpes tipos de *Bradyrhizobium*, enquanto que o grupo GII englobou as outras 11 estirpes tipos de *Bradyrhizobium* e mais as 15 estirpes SEMIAs em estudo, formando dois subgrupos. O subgrupo GII.I agrupou oito SEMIAs próximas de *B. erythrophlei*, *B. jicamae* e *B. neotropicale* e o subgrupo GII.II agrupou as outras sete SEMIAs próximas de *B. pachyrhizi*, *B. elkanii* e *B. ferriligni*. As demais estirpes tipos mantiveram-se isoladas no grande grupo GII.

Como foi observado por alguns pesquisadores, devido à alta conservação do gene 16S RNAr, não houve clara distinção das estirpes analisadas e as espécies de *Bradyrhizobium* já descritas, confirmando a baixa resolução dos testes filogenéticos com base na análise de apenas um gene isolado, particularmente em gêneros onde o gene 16S RNAr é muito conservado, como no caso do *Bradyrhizobium* (MARTENS *et al.*, 2007; LARANJO *et al.*, 2012).

Figura 1 – Relações filogenéticas entre as 15 estirpes em estudo baseadas apenas no gene 16S RNAr



Utilizando-se o programa MEGA 6. O modelo de distância evolutiva utilizado foi Tamura-Nei, e o algoritmo foi Maximum Likelihood. O suporte estatístico foi baseado na análise de *bootstrap* com 1.000 repetições, em que os valores nos nós indicam a porcentagem de agrupamento das estirpes. O valor na barra indica as porcentagens de substituições nucleotídicas. A estirpe de *Xanthobacter autotrophicus* Py2^T foi utilizada como *outgroup*.

Fonte: Próprio autor.

5.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA INDIVIDUAL DOS GENES *GLNII*, *GYRB* E *RECA*

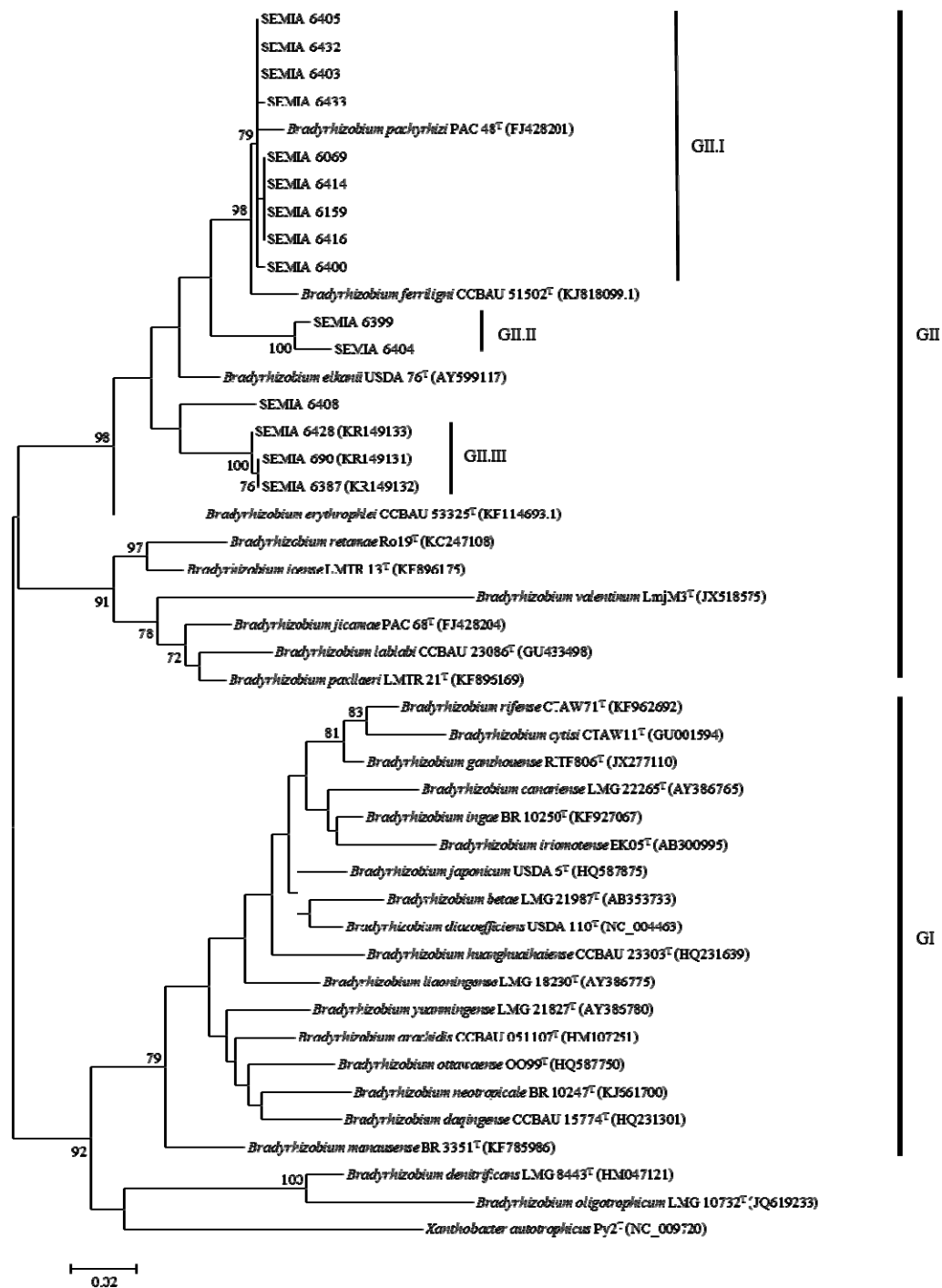
As árvores filogenéticas construídas com base nos genes *housekeeping* individuais apresentaram um padrão entre si (Figuras 2 a 4). As árvores baseadas nos genes *housekeeping* isolados evidenciaram os superclado de *B. japonicum* (GI) e *B. elkanii* (GII), assim como a árvore baseada nas sequências de 16S, com poucas variações. A maioria das SEMIAs manteve-se agrupada próxima às estirpes tipo das espécies dentro do superclado de *B. elkanii*, sendo mais relacionada com as estirpes tipo de *B. elkanii*, *B. pachyrhizi* e *B. ferriligni*, em todas as árvores com genes individuais. Isso indica que essas estirpes apresentam maior similaridade com essa espécie, embora apresentando divergência de bases.

Outra característica semelhante entre as três árvores dos genes individuais é que o grupo GII formou três subgrupos. As diferenças entre eles, é que na árvore construída com base apenas no gene *glnII* o subgrupo GII.I englobou nove SEMIAs próximas da *B. pachyrhizi*, e a SEMIA 6408 foi a única que ficou isolada dentro do GII. Na árvore do gene *gyrB* o subgrupo GII.I agrupou oito SEMIAs próximas as estirpes tipo de *B. elkanii* e *B. pachyrhizi*, e as SEMIAs 6408 e 6159 ficaram isoladas no GII. Na árvore com base apenas no gene *recA* o subgrupo GII.I englobou sete SEMIAs próximas *B. pachyrhizi*, e as SEMIAs 6405, 6408 e 6159 ficaram isoladas dentro do grupo GII. Apesar dessas diferenças, os outros dois subgrupos formados no GII foram iguais para todas as árvores construídas com genes individuais, o subgrupo GII.II agrupou as SEMIAs 6399 e 6404 e o subgrupo GII.III agrupou as SEMIAs 690, 6387 e 6428, sempre isoladas de espécies já descritas, mostrando que esses grupos podem representar espécies novas.

Esse resultado fortalece a escolha de tais genes para o estudo filogenético do gênero *Bradyrhizobium*, diminuindo a possibilidade de variações devidas à transferência horizontal de genes e, assim, incrementando a precisão na detecção de diversidade genética. A

congruência das quatro árvores construídas com os genes *housekeeping*, bem como a congruência com a árvore construída com o gene 16S RNAr, indica que os genes *housekeeping* seguiram o mesmo padrão evolutivo, mas permitindo maior diferenciação entre as espécies. Desse modo, as árvores baseadas na sequência de genes *housekeeping* isolados definiram melhor os grupos e subgrupos do que a árvore com base no gene 16S RNAr, confirmando que as sequências de genes *housekeeping* oferecem mais informações do que as sequências do gene 16S RNAr (Figuras 1 a 4), o que corrobora os resultados de Martens *et al.*, (2007).

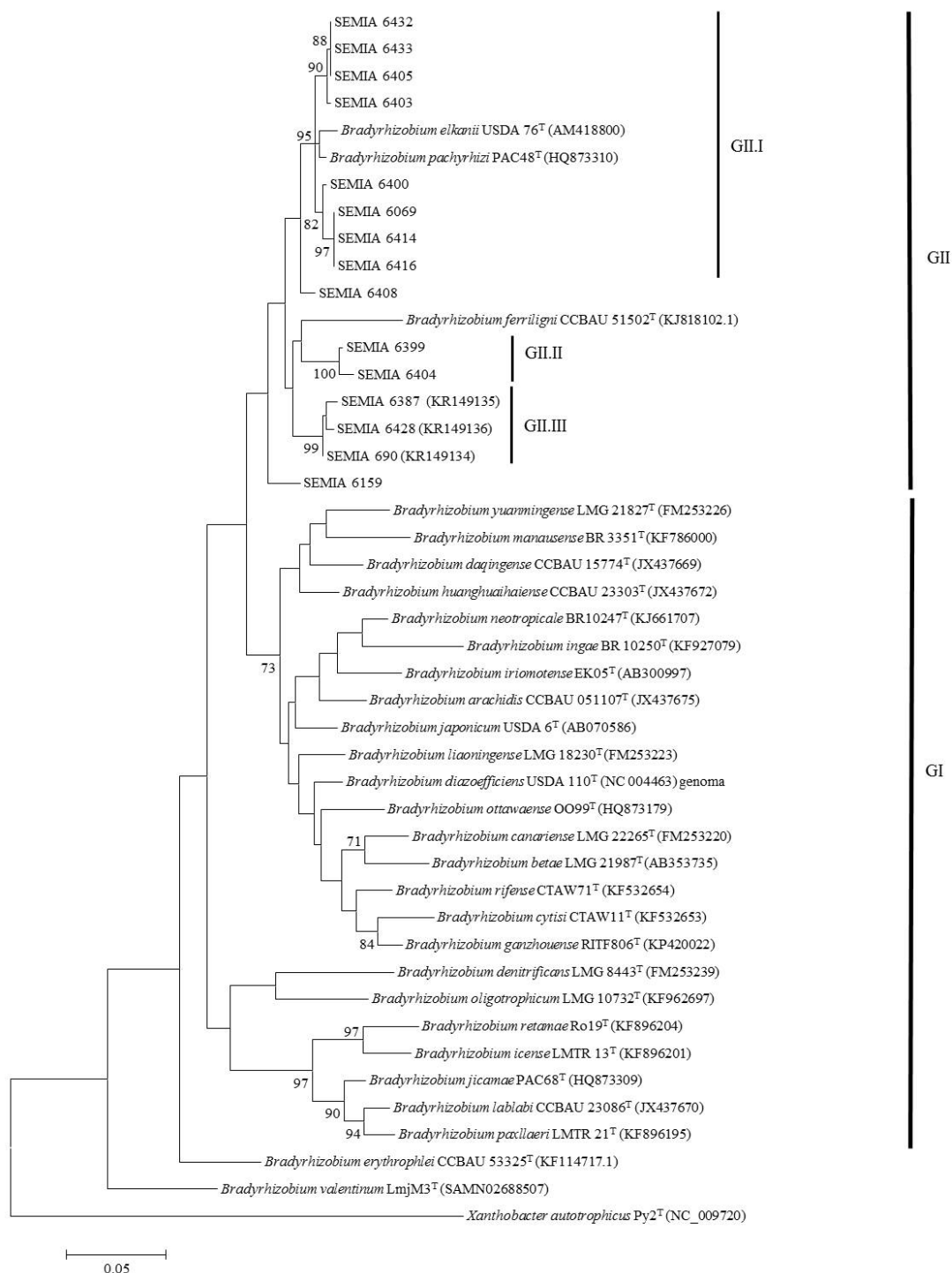
Figura 2 – Relações filogenéticas entre as 15 estirpes em estudo baseadas apenas no gene *housekeeping glnII*



Utilizando-se o programa MEGA 6. O modelo de distância evolutiva utilizado foi Tamura-Nei, e o algoritmo foi Maximum Likelihood. O suporte estatístico foi baseado na análise de *bootstrap* com 1.000 repetições, em que os valores nos nós indicam a porcentagem de agrupamento das estirpes. O valor na barra indica as porcentagens de substituições nucleotídicas. A estirpe de *Xanthobacter autotrophicus* Py2^T foi utilizada como *outgroup*.

Fonte: Próprio autor.

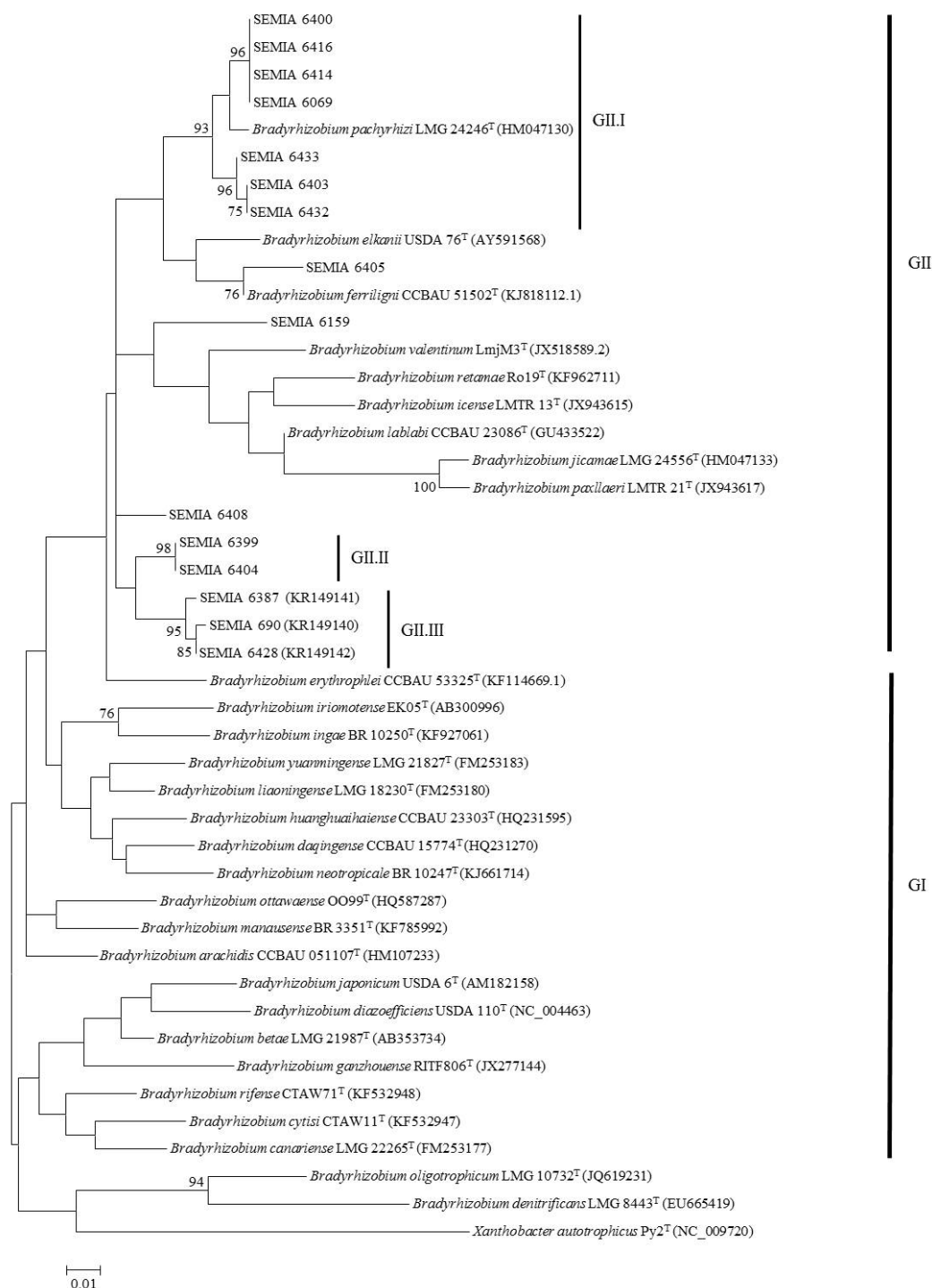
Figura 3 – Relações filogenéticas entre as 15 estirpes em estudo baseadas apenas no gene *housekeeping gyrB*



Utilizando-se o programa MEGA 6. O modelo de distância evolutiva utilizado foi Tamura-Nei, e o algoritmo foi Maximum Likelihood. O suporte estatístico foi baseado na análise de *bootstrap* com 1.000 repetições, em que os valores nos nós indicam a porcentagem de agrupamento das estirpes. O valor na barra indica as porcentagens de substituições nucleotídicas. A estirpe de *Xanthobacter autotrophicus* Py2^T foi utilizada como *outgroup*.

Fonte: Próprio autor.

Figura 4 – Relações filogenéticas entre as 15 estirpes em estudo baseadas apenas no gene *housekeeping recA*.



Utilizando-se o programa MEGA 6. O modelo de distância evolutiva utilizado foi Tamura-Nei, e o algoritmo foi Maximum Likelihood. O suporte estatístico foi baseado na análise de *bootstrap* com 1.000 repetições, em que os valores nos nós indicam a porcentagem de agrupamento das estirpes. O valor na barra indica as porcentagens de substituições nucleotídicas. A estirpe de *Xanthobacter autotrophicus* Py2^T foi utilizada como *outgroup*.

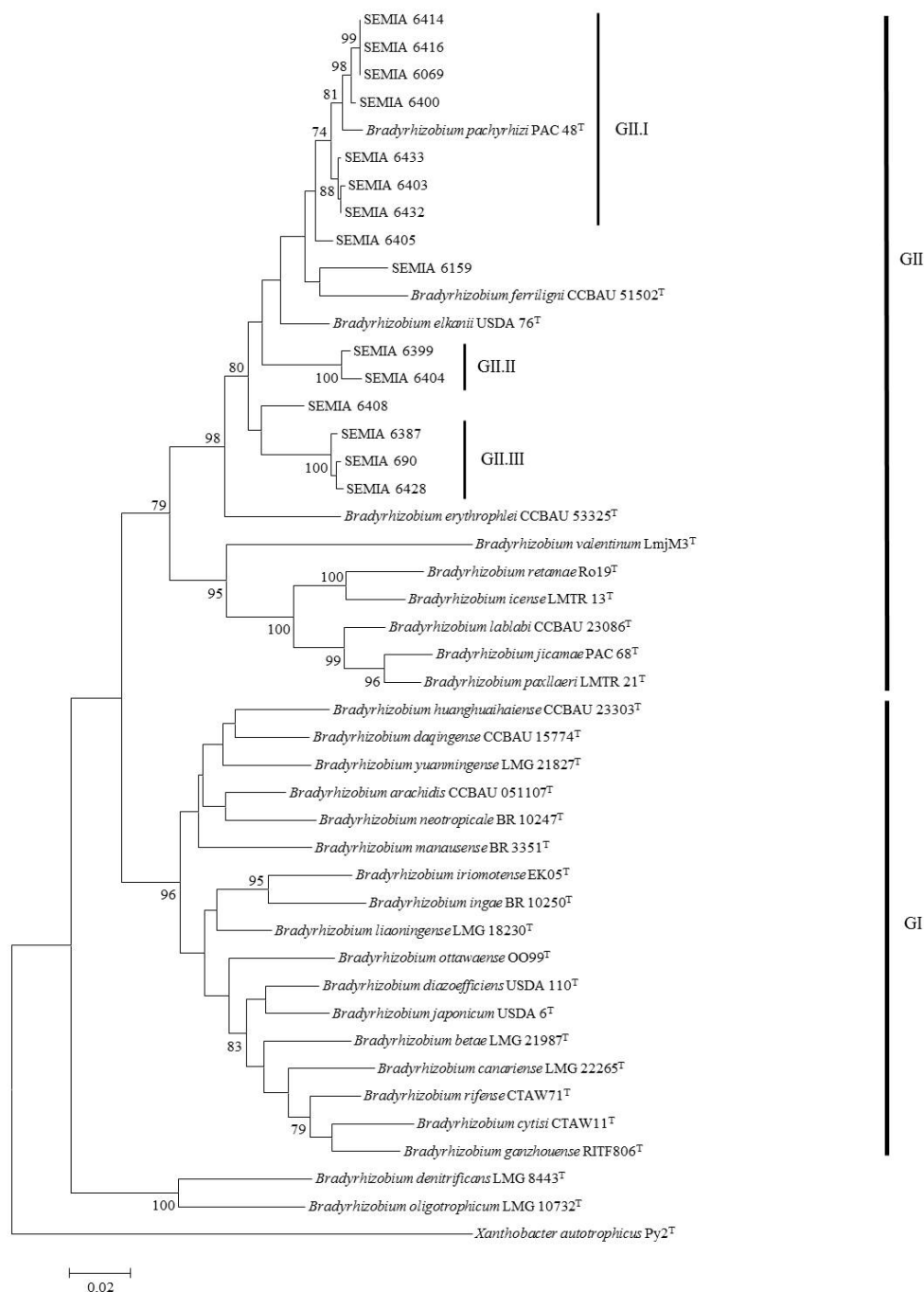
Fonte: Próprio autor.

5.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA POR MLSA

Como as árvores construídas com os genes individuais foram bastante congruentes na formação dos grupos, e separaram as SEMIAs 690, 6387 e 6428 e as SEMIAs 6399 e 6404 das estirpes tipo já estudadas, os genes puderam ser concatenados para a análise por MLSA, resultando em uma árvore que separou claramente as estirpes em seus grupos distintos (Figura 5). Assim como nas outras árvores já apresentadas, na árvore do MLSA dois grandes grupos foram formados (GI e GII), o grupo GI englobou diversas estirpes tipos, mas nenhuma SEMIA em estudo, já o grupo GII agrupou todas as SEMIAs em estudo, formando também 3 subgrupos. O subgrupo GII.I ficou com sete SEMIAs em estudo mais a estirpe tipo de *B. pachyrhizi*, mesmo subgrupo formado na árvore do gene *recA*. O subgrupo GII.II englobou as SEMIAs 6399 e 6404 e o GII.III agrupou as SEMIAs 690, 6387 e 6428, ambos isolados de espécies já descritas, como em todas as árvores dos genes isolados.

Os subgrupos GII.II e GII.III podem representar espécies novas e apresentaram valor de *bootstrap* de 100%, mostrando serem bastante coesos. A árvore com base no MLSA e as árvores formadas com base nos genes isolados elucidaram a posição das SEMIAs em seus grupos e as relações filogenéticas das mesmas com espécies intimamente relacionadas. Todas as árvores construídas (16S, MLSA e genes *housekeeping*) foram congruentes ao separarem as estirpes representantes do gênero *Bradyrhizobium* em dois grandes grupos: *B. elkanii* e *B. japonicum*. As SEMIAs em estudo ficaram inseridas juntamente com as representantes do superclado *B. elkanii*.

Figura 5 – Relações filogenéticas das 15 estirpes em estudo baseadas no MLSA das seqüências concatenadas dos genes *housekeeping* (*glnII*, *gyrB* e *recA*)



utilizando-se o programa MEGA 6. O modelo de distância evolutiva utilizado foi Tamura-Nei, e o algoritmo foi Maximum Likelihood. O suporte estatístico foi baseado na análise de *bootstrap* com 1.000 repetições, em que os valores nos nós indicam a porcentagem de agrupamento das estirpes. O valor na barra indica as porcentagens de substituições nucleotídicas. A estirpe de *Xanthobacter autotrophicus* Py2^T foi utilizada como *outgroup*. Os números de acesso das seqüências utilizadas estão na Tabela 3.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 3 – Números de acesso das sequências utilizadas na árvore de MLSA.

Estirpe	Genoma	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>
SEMIA 690		KR149131	KR149134	KR149140
SEMIA 6387		KR149132	KR149135	KR149141
SEMIA 6428		KR149133	KR149136	KR149142
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T		HM107251	JX437675	HM107233
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T		AB353733	AB353735	AB353734
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T		AY386765	FM253220	FM253177
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T		GU001594	KF532653	KF532947
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T		HQ231301	JX437669	HQ231270
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T		HM047121	FM253239	EU665419
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	NC_004463			
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T		AY599117	AM418800	AY591568
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 ^T		JX277110	KP420022	JX277144
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T		HQ231639	JX437672	HQ231595
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T		KF896175	KF896201	JX943615
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T		KF927067	KF927079	KF927061
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T		AB300995	AB300997	AB300996
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T		HQ587875	AB070586	AM182158
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T		FJ428204	HQ873309	HM047133
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T		GU433498	JX437670	GU433522
<i>B. liaoningense</i> 2281 ^T		AY386775	FM253223	FM253180
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T		KF785986	KF786000	KF785992
<i>B. neotropicae</i> BR 10247 ^T		KJ661700	KJ661707	KJ661714
<i>B. oligotrophicum</i> LMG 10732 ^T		JQ619233	KF962697	JQ619231
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T		HQ587750	HQ873179	HQ587287
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T		FJ428201	HQ873310	HM047130
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T		KF896169	KF896195	JX943617
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T		KC247108	KF896204	KF962711
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T		KF962692	KF532654	KF532948
<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T		AY386780	FM253226	FM253183
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T		KF114693.1	KF114717.1	KF114669.1
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	SAMN02688507			
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T		KJ818099.1	KJ818102.1	KJ818112.1
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 ^T	NC_009720			

Fonte: Próprio autor.

As análises filogenéticas com os genes isolados reafirmaram a posição das estirpes SEMIAs 6399 e 6404 e as SEMIAs 690, 6387 e 6428 na árvore com o MLSA. Outro dado interessante que pode ser observado nas árvores é que sete das estirpes em estudo, todas isoladas do Brasil, se agruparam com *B. pachyrhizi*, originalmente isolada da América Central

(RODRÍGUEZ-NAVARRO *et al.*, 2004). Isso mostra que as espécies se apresentam bastante diversas e espalhadas nos ecossistemas.

Os resultados gerados por todas as análises filogenéticas confirmam que o MLSA pode distinguir confiavelmente as relações entre espécies bastante próximas dentro do gênero. O desenvolvimento desta técnica, utilizando sequências gênicas conservadas, resulta em estudos mais confiáveis sobre a diversidade de espécies procarióticas, de forma rápida e eficiente.

Os subgrupos que englobaram SEMIAs que não foram relacionadas às espécies já descritas merecem mais estudos, uma vez que estas estirpes podem representar espécies novas de rizóbios. Seguindo as recomendações para descrição de espécies, as estirpes pertencentes do subgrupo GII.III da árvore com base no MLSA foram submetidas a todos os testes necessários, com o objetivo de classificá-las como uma nova espécie de *Bradyrhizobium*.

5.4 IDENTIDADE DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES 16S RNAR E *HOUSEKEEPING* DAS ESTIRPES CANDIDATAS A UMA NOVA ESPÉCIE

A Tabela 3 mostra o índice de similaridade entre as sequências das estirpes em estudo. Os dados são referentes às comparações entre as SEMIAs 690, 6387 e 6428, e entre a SEMIA 690, definida como estirpe tipo da provável espécie nova, e as estirpes tipos das espécies relacionadas. A comparação das sequências concatenadas do MLSA entre as três SEMIAs apresentou similaridade entre 99,4-99,6%, valor considerado elevado Konstantinidis *et. al.* (2006). Esse autores propuseram que espécies diferentes devem apresentar menos de 96% de similaridade na identidade das sequências concatenadas, e para espécies de *Bradyrhizobium*, Durán *et al.* (2014) sugeriram um corte em 97.0% considerando cinco genes no MLSA. Entre a SEMIA 690 e as estirpes tipo das espécies relacionadas a análise apresentou baixa similaridade, entre 87,5-95,3%. Nas SEMIAs a comparação entre os genes *housekeeping*

isolados apresentou similaridade variando entre 99,0-99,9%, valores considerados elevados, já que Thompson *et. al.* (2005) inferiram que genes *housekeeping* devem apresentar similaridade nucleotídica de no mínimo 94% entre estirpes de mesma espécie (Tabela 3).

Tabela 4 – Identidade nucleotídica (%) entre as SEMIAs 690, 6387 e 6428; e entre as SEMIAs 690, 6387 e 6428 e as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium* relacionadas.

Similaridade	16S rRNA	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	MLSA
entre SEMIAs 690, 6387 e 6428	99,4 - 99,9	99,8 - 100	99,0 - 99,4	99,1 - 99,7	99,4 - 99,6
entre SEMIAs e:					
<i>B. diazoefficiens</i>	96,6 - 97,1	88,1 - 88,3	93,6 - 93,8	91,0 - 91,6	91,0 - 91,1
<i>B. elkanii</i>	99,2 - 99,6	95,6 - 95,8	95,3 - 95,8	94,2 - 94,5	95,3
<i>B. japonicum</i>	96,9 - 97,3	87,5 - 87,7	93,0 - 93,2	92,5 - 92,7	90,9 - 91,0
<i>B. liaoningense</i>	96,9 - 97,4	88,3 - 88,5	92,6 - 92,8	93,9 - 94,2	91,4 - 91,6
<i>B. canariense</i>	96,6 - 97,1	86,9 - 87,1	92,1 - 92,5	93,3 - 93,6	90,5 - 90,7
<i>B. yuanmingense</i>	96,5 - 96,9	88,5 - 88,7	92,1 - 92,5	93,3 - 93,6	91,1 - 91,4
<i>B. betae</i>	96,5 - 97,0	86,5 - 86,7	91,9 - 92,3	92,5 - 92,7	90,1 - 90,4
<i>B. iriomotense</i>	96,1 - 96,5	86,5 - 86,7	91,5 - 91,9	91,3 - 91,6	89,7 - 89,8
<i>B. jicamae</i>	99,2 - 99,6	89,3 - 89,5	90,2 - 90,4	92,2 - 92,5	90,4 - 90,5
<i>B. pachyrhizi</i>	99,3 - 99,6	94,2 - 94,4	95,5 - 96,0	95,3 - 95,6	95,1 - 95,3
<i>B. lablabi</i>	99,3 - 99,7	89,9 - 90,0	89,1 - 89,5	94,8 - 95,3	90,9 - 91,1
<i>B. cytisi</i>	96,1 - 96,5	87,1 - 87,3	90,2 - 90,4	91,6 - 91,9	89,4 - 89,6
<i>B. daqingense</i>	96,9 - 97,3	88,3 - 88,5	92,6 - 92,8	91,9 - 92,2	90,9 - 91,0
<i>B. denitrificans</i>	96,5 - 97,0	87,5 - 87,7	89,1 - 89,3	88,7 - 89,3	88,5 - 88,8
<i>B. oligotrophicum</i>	96,5 - 96,9	85,1 - 85,3	88,2 - 88,5	89,6 - 90,4	87,5 - 87,7
<i>B. huanghuaihaiense</i>	96,5 - 96,9	88,7 - 88,9	92,8 - 93,2	91,6 - 92,2	91,1 - 91,4
<i>B. rifense</i>	96,3 - 96,8	87,7 - 87,9	91,1 - 91,5	91,9 - 92,2	90,1 - 90,4
<i>B. arachidis</i>	96,3 - 96,8	88,7 - 88,9	91,5 - 91,9	93,0 - 93,3	90,9 - 91,1
<i>B. retamae</i>	98,9 - 99,3	89,7 - 89,9	86,8 - 87,2	93,0 - 93,6	89,5 - 89,7
<i>B. icense</i>	99,4 - 99,8	89,7 - 89,9	87,4 - 87,6	92,2 - 92,7	89,5 - 89,6
<i>B. paxllaeri</i>	99,4 - 99,8	89,5 - 89,7	89,8 - 90,0	91,6 - 91,9	90,2 - 90,3
<i>B. valentinum</i>	99,2 - 99,6	85,9 - 86,1	86,8 - 87,0	92,5 - 93,0	88,0
<i>B. ganzhouense</i>	96,5 - 96,9	87,5 - 87,7	91,9 - 92,3	90,4 - 90,7	89,9 - 90,1
<i>B. ottawaense</i>	96,9 - 97,3	88,7 - 88,9	92,1 - 92,3	92,7 - 93,0	91,0 - 91,1
<i>B. neotropicale</i>	98,4 - 98,8	87,7 - 87,9	91,7 - 91,9	92,2 - 92,5	90,4 - 90,5
<i>B. ingae</i>	96,1 - 96,6	88,3 - 88,5	90,8 - 91,0	91,3 - 91,6	90,1 - 90,2
<i>B. manausense</i>	96,1 - 96,6	88,7 - 88,9	91,3	92,7 - 93,0	90,7 - 90,9
<i>B. erythrophlei</i>	99,5 - 100	93,8 - 94,0	91,5 - 92,1	94,2 - 94,5	93,2 - 93,3
<i>B. ferriligni</i>	97,4 - 97,6	94,2 - 94,4	93,0 - 93,6	95,1 - 95,3	94,1 - 94,2

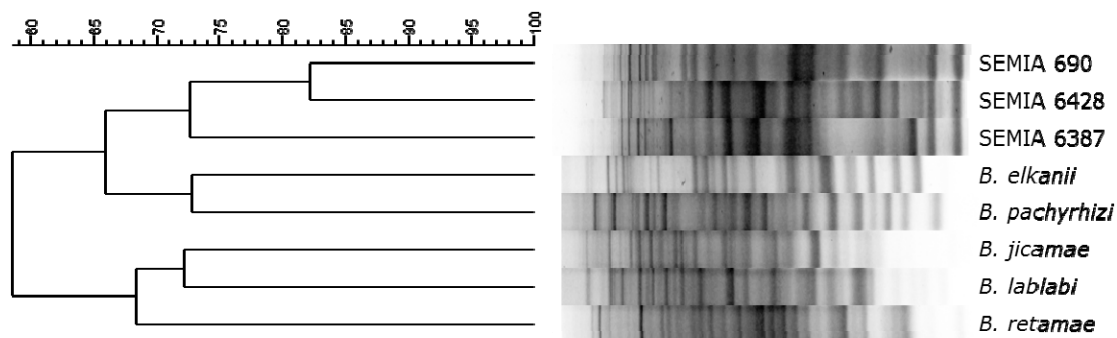
Fonte: Próprio autor.

5.5 BOX-PCR

O dendrograma construído com base nos perfis de DNA obtidos por BOX-PCR é apresentado na Figura 6. Os perfis das SEMIAs 690 e 6428 apresentaram similaridade superior a 80% entre si, e superior a 72% com

a SEMIA 6387. As estirpes tipo ficaram separadas das estirpes SEMIAs em estudo, apresentando similaridades inferior a 66% entre os grupos.

Figura 6 – Dendrograma baseado no *fingerprinting* pela metodologia de BOX-PCR, aplicado às SEMIAs 690, 6387 e 6428.



Os clusters foram obtidos pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v. 7.1). Para a análise de agrupamento, foi utilizado o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) e o coeficiente de Jaccard com 3% de tolerância.

Fonte: Próprio autor.

5.6 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos identificados como principais na SEMIA 690 foram, com a fração molecular total 8 e fração individual C19:0 ciclo ω 8c, representando respectivamente 57.91% e 28.01% do total de ácidos graxos identificados na célula. As estirpes tipo *B. pachyrhizi* e *B. retamae* apresentaram os mesmos ácidos graxos em sua composição que a SEMIA 690. Já as estirpes tipo *B. elkanii*, *B. jicamae* e *B. lablabi* apresentaram apenas os ácidos graxos C16:0 e fração total 8 em comum com a SEMIA 690. A estirpe em estudo apresentou porcentagem dos ácidos graxos C16:1 ω 5c e C19:0 ciclo ω 8c bastante elevadas quando comparadas com as estirpes tipo, atingindo pelo menos o dobro do valor das mesmas. Os valores referentes aos perfis de ácidos graxos estão na Tabela 4.

Tabela 5 - Perfis de ácidos graxos (%) obtidos para as estirpes em estudo, avaliados pelo sistema MIDI utilizando banco de dados FAME TSBA6..

Ácido Graxo	1	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
C16:0	11.46	12.6	12.4	13.4	19.6	16.2
C16:1 ω 5c	2.62		1.3			1.2
C19:0 cyclo ω 8c	28.01		11.9			9.1
Fração total						
8*	57.91	74.6	67	70.9	57.7	52.4

*Fração total 8 = C18:1 ω 6c/C18:1 ω 7c

^a Data from Durán *et al.* (2014)

1 - SEMIA 690, 2 - *B. elkanii* USDA 76^T, 3 - *B. pachyrrhizi* PAC 48^T, 4 - *B. jicamae* PAC 68^T, 5 - *B. lablabi* CCBAU 23086^T e 6 - *B. retamae* Ro19^T

Fonte: Próprio autor.

5.7 AVERAGE NUCLEOTIDE IDENTITY (ANI) E CONTEÚDO G + C

Os valores (%) referentes a identidade nucleotídica encontrada entre a sequência concatenada (*glnII*, *gyr e*, *recA*) da SEMIA 690, comparada com as sequências das estirpes tipo das espécies relacionadas se encontram na Tabela 5. A SEMIA 690 apresentou menos de 85,5% de semelhança nucleotídica entre todas as estirpes tipo das espécies relacionadas, com exceção das estirpes de *B. pachyrrhizi* e *B. elkanii*, que apresentaram 90,4% e 90,5% de semelhança nucleotídica, com a SEMIA 690, respectivamente. Todos esses valores são considerados baixos, indicando que a SEMIA 690 não faz parte de nenhuma das espécies já descritas. Konstantinidis *et al.* (2006) avaliaram em diversos gêneros de bactérias que, representantes de espécies diferentes apresentam identidade nucleotídica inferior a 96%, quando comparadas as sequências concatenadas de cinco a oito genes *housekeeping*. Os mesmos autores ainda constataram que este valor corresponde aproximadamente aos 70% estabelecidos em análises de hibridação DNA-DNA aplicados em genomas inteiros. O conteúdo G + C da estirpe SEMIA 690 foi quantificado em 63,46%.

Tabela 6 – Identidade nucleotídica (%) do genoma entre a SEMIA 690 e as estirpes de referência das espécies relacionadas.

Estirpes relacionadas	SEMIA 690
<i>B. pachyrhizi</i> PAC 48 ^T	90.4%
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	90.5%
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	85.3%
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	85.4%
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	85.3%
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	85.0%
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	85.1%
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	85.1%

Fonte: Próprio autor.

5.8 TESTES MORFOFISIOLÓGICOS

5.8.1 Manifestação de Crescimento e Diâmetro das Colônias

As SEMIAs 690, 6387 e 6428, selecionadas para os estudos morfológicos, apresentaram manifestação de crescimento lenta, de 6 a 9 dias, tendo as colônias isoladas bem visíveis em torno do sétimo dia de incubação. As cinco estirpes tipo (*B. elkanii*, *B. pachyrhizi*, *B. jicamae*, *B. lablabi* e *B. retamae*) apresentaram manifestação de crescimento intermediária, de 4 a 5 dias. Após o período de incubação, três colônias de cada estirpe foram medidas com auxílio de um paquímetro e a medida foi dada em milímetros (mm). De maneira geral, as colônias apresentaram tamanhos pequenos: as SEMIAs 690 e 6387 exibiram colônias menores que 1 mm, assim como as tipos *B. elkanii*, *B. jicamae*, *B. lablabi* e *B. retamae*. Já a SEMIA 6428 apresentou diâmetro de colônia de 1,19 mm e a estirpe tipo *B. pachyrhizi* apresentou diâmetro de 1,37 mm. Estes resultados se assemelham com os estudos de descrição das espécies *B. lablabi*, *B. pachyrhizi*, *B. jicamae* e *B. diazoefficiens*, em que todas apresentaram colônias pequenas (RAMÍREZ-BAHENA *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2011; DELAMUTA *et al.*, 2013).

5.8.2 Forma, Elevação, Borda e Superfície das Colônias

Todas as estirpes (SEMIAS 690, 6387 e 6428) apresentaram resultados semelhantes para as quatro características observadas. A forma das colônias foi classificada como circular, elevação convexa, borda e superfície das colônias lisas. As estirpes tipo de *B. elkanii*, *B. jicamae*, *B. lablabi* e *B. retamae* também apresentaram forma das colônias circulares e bordas lisas, mas a estirpe *B. pachyrhizi* teve sua colônia classificada como irregular e de borda ondulada. A elevação também foi convexa e a superfície das colônias considerada lisa nas cinco estirpes tipo do grande grupo *B. elkanii*.

5.8.3 Alteração no pH

Ambas as estirpes em estudo e as estirpes tipo apresentaram alteração no pH. Os meios com indicador AB foram alcalinizados, o que pôde ser observado pela cor azul após o crescimento das culturas.

5.8.4 Produção de Muco e Consistência da Massa de Crescimento

Foi considerada pouca produção de muco (tamanho das colônias \leq 1,9 mm) nas três estirpes selecionadas e, também, nas cinco estirpes tipo do grande grupo *B. elkanii*. A característica de consistência de massa de crescimento apresentou diferença entre as estirpes estudadas. A SEMIA 690 apresentou consistência seca, e as SEMIAs 6387 e 6428 apresentaram consistência gomosa. As estirpes tipo também apresentaram diferenças: as estirpes de *B. elkanii* e *B. lablabi* apresentaram consistência gomosa, as estirpes *B. jicamae*, e *B. retamae* apresentaram consistência seca, e a estirpe de *B. pachyrhizi* apresentou consistência aquosa.

5.8.5 Cromogênese das Colônias em Azul de Bromotimol e Vermelho Congo

O resultado da cromogênese com os dois indicadores apresentou congruência para as três estirpes em estudo e as cinco estirpes tipo. A coloração das colônias (SEMIAS e estirpes tipo) crescidas em YM com AB foi levemente creme e em YM com VC a coloração foi rosada.

5.8.6 Detalhes Ópticos

As SEMIAs apresentaram massa de crescimento considerada translúcida, assim como as três estirpes tipo das espécies *B. lablabi*, *B. jicamae* e *B. retamae*. Já a massa de crescimento das estirpes tipo das espécies *B. elkanii* e *B. pachyrhizi* foram classificadas como opacas.

5.8.7 Utilização de Fontes de Carbono

As três estirpes estudadas não apresentaram capacidade de metabolizar 26 das 49 fontes testadas (eritritol, metil- β D-xilopiranosido, dulcitol, inositol, metil- α D-manopiranosido, metil- α D-glucopiranosido, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, salicina, D-celobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-sacarose, D-trealose, inulina, D-melezitose, D-refinose, glicogênio, gentiobiose, D-turanose, D-tagatose, gluconato de potássio, 2-cetogluconato de potássio e 5-cetogluconato de potássio). Todas apresentaram pouca capacidade de crescimento em nove fontes testadas (glicerol, D-adonitol, D-glucose, D-fructose, L-ramnose, D-manitol, D-sorbitol, xilitol e D-arabitol) e em oito fontes (D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, d-xilose, L-xilose, amido, D-fucose e L-fucose) todas apresentaram plena capacidade de metabolizar as fontes de carbono fornecidas. Em 17 das 49 fontes testadas, as SEMIAs em estudo e as estirpes tipo apresentaram diferenças de crescimento entre si. Nos testes com L-Arabinose, D-Xilose, D-Adonitol, L-Ramnose, Dulcitol, D-Manitol, D-

Sorbitol, Glicogênio, Xilitol, D-Fucose e D-Arabitól as SEMIAs apresentaram resultados iguais entre si, mas diferente de pelo menos uma estirpe tipo. Já nos testes com D-Galactose, D-Manose, L-Sorbose, Esculina Citrato de Ferro, D-Lixose e L-Arabitól as SEMIAs não só apresentaram diferenças entre as estirpes tipo, como também apresentaram diferenças entre si. Os detalhes desses resultados estão representados na Tabela 6.

Tabela 7 – Diferenças quanto a capacidade de uso de fontes de carbono, por meio do teste API, entre as estirpes em estudo e estirpes tipo.

Fonte \ Estirpes	1	2	3	4	5	6	7	8
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	F	+
D-Xilose	+	+	+	+	+	+	F	F
D-Adonitol	F	F	F	F	F	-	F	-
D-Galactose	F	F	+	+	+	+	+	F
D-Manose	F	+	+	+	+	+	F	-
L-Sorbose	F	F	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	F	F	F	F	+	+	F	F
Dulcitol	-	-	-	F	-	-	-	-
D-Manitol	F	F	F	F	F	-	F	-
D-Sorbitol	F	F	F	F	F	-	-	-
Esculina Citrato de Ferro	+	+	F	F	-	-	+	F
Glicogênio	-	-	-	-	-	-	+	-
Xilitol	F	F	F	F	-	-	-	-
D-Lixose	F	+	+	+	+	+	+	+
D-Fucose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabitól	F	F	F	F	F	-	F	-
L-Arabitól	+	F	F	F	F	-	-	-

(+) indica capacidade de metabolizar a fonte de C, (-) indica incapacidade de metabolizar a fonte de C e (F) indica fraca capacidade de metabolizar a fonte de C. 1 - SEMIA 690, 2 - SEMIA 6387, 3 - SEMIA 6428, 4 - *B. elkani* USDA 76^T, 5 - *B. pachyrrhizi* PAC 48^T, 6 - *B. jicamae* PAC 68^T, 7 - *B. lablabi* CCBAU 23086^T e 8 - *B. retamae* Ro19^T.

Fonte: Próprio autor.

5.8.8 Tolerância a Antibióticos

Todas as SEMIAS estudadas apresentaram resistência aos oito antibióticos testados (ácido nalidíxico, cloranfenicol, tetraciclina,

eritromicina, bacitracina, estreptomicina, neomicina e cefuroxima (cefalosporina) (Tabela 7). Todas as estirpes tipo foram resistentes aos antibióticos ácido nalidíxico, cloranfenicol e bacitracina. A Tabela 7 apresenta as diferenças entre as SEMIAs e as estirpes tipo.

Tabela 8 – Tolerância a antibióticos (antibiograma) das estirpes em estudo e estirpes tipo.

Resistência a ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	1	2	3	4	5	6	7	8
Eritromicina (15)	+	+	+	+	+	F	+	+
Cefuroxima (30)	+	+	+	+	+	-	+	-
Neomicina (30)	+	+	+	-	-	-	-	F
Tetraciclina (30)	+	+	+	+	+	+	-	-
Estreptomicina (10)	+	+	+	+	+	-	-	-

(+) indica resistência, (-) indica sensibilidade e (F) indica fraca sensibilidade aos antibióticos testados.

1 - SEMIA 690, 2 - SEMIA 6387, 3 - SEMIA 6428, 4 - *B. elkanii* USDA 76^T, 5 - *B. pachyrhizi* PAC 48^T, 6 - *B. jicamae* PAC 68^T, 7 - *B. lablabi* CCBAU 23086^T e 8 - *B. retamae* Ro19^T.

Fonte: Próprio autor.

5.8.9 Avaliação de Crescimento em Diferentes Condições

Nenhuma estirpe apresentou crescimento em meio LB, nem em YMA enriquecido com 1% de NaCl. Elas também não foram capazes de crescer a 37°C e 40°C (pH 6,8). Em meio YM com pH 4,5 as três estirpes cresceram bem, todavia, em meio YM com pH 8, as SEMIAs 6387 e 6428 apresentaram bom crescimento, mas a SEMIA 690 apresentou crescimento fraco. As SEMIAs 690 e 6387 metabolizam ureia completamente quando incubadas em meio com 2% de ureia, enquanto a SEMIA 6428 metabolizou apenas parcialmente a ureia. Os principais resultados fenotípicos que diferem as SEMIAs das demais espécies estão listados na Tabela 8.

Tabela 9 – Capacidade de crescimento das estirpes em estudo e estirpes tipo em estudo em diferentes valores de pH e com 2% de ureia no meio.

Estirpes	pH 4,5	pH 8,0	2% Ureia
SEMIA 690	+	F	+
SEMIA 6387	+	+	+
SEMIA 6428	+	+	F
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	-	+	+
<i>B. pachyrhizi</i> PAC 48 ^T	F	+	+
<i>B. jicamae</i> PAC 68 ^T	-	+	-
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	-	+	+
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	-	+	-

(+) indica crescimento abundante, (-) indica falta de crescimento e (F) indica crescimento fraco nos meios indicados.

Fonte: Próprio autor.

As SEMIAs submetidas aos testes de descrição de espécie, juntamente com as cinco estirpes tipo pertencentes ao grupo de *B. elkanii*, apresentaram resultados esperados nos testes morfofisiológicos para estirpes do gênero *Bradyrhizobium*. Os resultados morfofisiológicos, em sua maioria, não são congruentes com dados encontrados na literatura. Isso mostra a dificuldade de se reproduzir testes morfológicos em procariotos em diferentes laboratórios. Ormeño-Orrillo e Martínez-Romero (2013) argumentam se os testes fenotípicos atualmente utilizados nas pesquisas taxonômicas de procariotos seriam de grande valor. Além da alta diversidade das espécies e a facilidade de transferência horizontal de genes entre os procariotos, as pesquisas são geralmente realizadas apenas com as estirpes tipo de cada espécie, e não podem ser confiáveis, pois pode haver diferenças fenotípicas tanto entre estirpes de mesma espécie, como entre estirpes de espécies diferentes, mas relacionadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O MLSA mostrou-se capaz de diferenciar e separar filogeneticamente as estirpes em estudo em seus respectivos grupos e subgrupos, apontando as relações entre as estirpes tipo e as possíveis espécies novas. Apesar de Stackebrandt *et al.* (2002) terem proposto a utilização de cinco genes na sequência concatenada do MLSA, este estudo confirmou que sequências concatenadas com três genes também são eficientes na distinção da diversidade dos gêneros e na inferência de possíveis novas espécies. Outros autores também confirmaram que a utilização de pelo menos três genes no MLSA pode distinguir confiavelmente as relações filogenéticas dos procariotos (MARTENS *et al.*, 2007; DALL'AGNOL *et al.*, 2013; DELAMUTA *et al.*, 2013). Os testes morfofisiológicos aplicados às estirpes SEMIAs 690, 6387 e 6428, que representam possíveis espécies novas, foram congruentes com o esperado para estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, porém, também foram diferentes das espécies já descritas, fortalecendo a possibilidade de ser uma nova espécie e a importância da sua descrição. Outros estudos precisam ser realizados a fim de descrever o subgrupo formado pelas estirpes SEMIAs 6399 e 6404, o qual também ficou isolado das espécies descritas atualmente.

Por abranger estirpes de interesse agrônomico e apresentar grande diversidade, o gênero *Bradyrhizobium* necessita ser melhor estudado, com a indicação de que novas espécies podem ser descritas. A descrição de microrganismos dessas espécies colabora com os estudos posteriores que visam a elaboração de produtos comerciais que favorecem a qualidade das culturas agrônomicas, melhorando assim o rendimento dos plantios e a qualidade de vida dos consumidores.

7 REFERÊNCIAS

- ARDLEY, J. K.; PARKER, M. A.; DEMEYER, S. E.; TRENGOVE, R. D.; O'HARA, G. F.; REEVE, F. G.; YATES, R. J.; DILFORTH, M. J.; FILLEMS, A.; HOFIESON, J. G. *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.
- BASI, S.; NEUMANN, M.; MARAFON, F.; UENO, R. K.; SANDINI, I. E. Influência da adubação nitrogenada sobre a qualidade da silagem de milho. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 3, p. 219-234, nov. 2011.
- BAUER A. F.; KIRBY, E. M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BERRADA, H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 6, p. 616-639, 2014.
- BROUGHTON, F. J.; HANIN, M.; RELIC, B.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOFSKI, F.; SIMSEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUÉRÉ, A.; JABBOURI, S.; FELLAY, R.; PERRET, X.; DEAKIN, F. J. 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.
- CARVALHO, T. L. G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R. M.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A S. Nitrogen signaling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, p. 5631-42, 2014.
- CHANG, Y. L.; FANG, J. Y.; FANG, E. T.; LIU, H. C.; SUI, X. H.; CHEN, F. X. *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 2496-2502, 2011.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN J. R. F.; LIPUMA J. J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3427–3436, 2001.

DAI, J.; LIU, X.; FANG, Y. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from *Caragana microphylla* growing in desert soil in Ningxia, China. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 2683-2693, 2012.

DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; DELAMUTA, J. R. M.; ANDRADE, D. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4167–4173, 2013.

DALL'AGNOL, R.F.; RIBEIRO, R.A.; DELAMUTA, J.R.M.; ORMENO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.A.; ANDRADE, D.S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *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.

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

DELAMUTA, J. R. K.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. 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. M.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO E.; MELO, I. S.; MARTI'NEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3342–3351, 2013.

DURÁN, D.; REY, L.; MAYO, J.; ZÚÑIGA-DÁVILA, D.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; ORMEÑO-ORRILLO, E. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in

Peru. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 2072-2078, 2014.

EARDLY, B. D.; NOUR, S. M.; VAN BERKUM, P.; SELANDER, R. K. Rhizobial 16S rRNA and *dnaK* genes: mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1328-1335, 2005.

FANG, E. T.; VAN BERKUM, P.; SUI, X. H.; BEYENE, D.; CHEN, F. X.; MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 51-65, 1999.

FARRAND, S. K.; VAN BERKUM, P. B.; OGER, P. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1681-1687, 2003.

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

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

FERNEGREEN, J. J.; RILEY, M. A. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 98-113, 1999.

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

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

FOESE, C. R.; KANDLER, O.; FHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

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

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

GILLIS, M.; VAN, T. V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; FILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic Taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderiu vietnarniensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 274-289, abr. 1995.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 395–412, 2005.

HALL, B. G. **Phylogenetic trees made easy**. 4. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2011. 282 p.

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

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

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. 48p.

(Embrapa Soja. Circular Técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa SPI. p. 9-89, 1994.

IJSEM Information for Authors. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2014. Disponível em: <<http://ijs.sgmjournals.org/site/misc/ifora.xhtml>> Acesso em: 10 ago. 2014.

ILDIS. **International Legume Database & Information Service**. Disponível em: <<http://FFF.ildis.org/>> Acesso em: 1 nov. 2014.

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

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

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

LARANJO, M.; YOUNG, J. P. F.; OLIVEIRA, S. Multilocus Sequence Analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 359-367, 2012.

LLORET, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 47, n. 1-2, p. 43-60, 2005.

LPSN (List of Prokaryotic names with standing in nomenclature). Disponível em <<http://FFF.bacterio.net/>> Acesso em: 19 ago. 2013.

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

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

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

MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2934-2950, 2009.

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

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, 2010. Disponível em: <<http://comunicata.ufpi.br/index.php/comunicata/index>>. Acesso em: 05 set. 2014.

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

OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Annual Reviews of Genetics**, v. 11, n. 4, p. 252-63, 2013.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phenotypic tests in *Rhizobium* species description: an opinion and (a sympatric speciation) hypothesis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, p. 145-147, 2013.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. Bacterial association with legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, p. 17-42, 2015.

PINTEIRO, L. C.; VIANA, G. V. R. Técnicas algorítmicas para construção de árvores filogenéticas. **Revista Científica da Faculdade Lourenço Filho**, Ceará, v.4, n.1, 2005.

RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; PEIX, A.; RIVAS, R.; CAMACHO, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; FILLEMS, A.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 1929–1934, 2009.

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

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, Marburg, v. 6, n. 4, p. 139-144, 1998.

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

RIVAS, R.; MARTENSA, M.; LAJUDIE, P.; FILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 101–110, nov. 2009.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N., CAMACHO, M., LEIDI, E. O., RIVAS, R. & VELÁZQUEZ, E. Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia from diverse geographical origin that nodulate *Pachyrhizus* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 737–745, jun. 2004.

ROMA NETO, I. V.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S

rRNA and *glnII* genes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1291–1302, 2010.

RONG, F.; HUANG, Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 7–18, 2012.

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.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. **A formação do nódulo em leguminosas.**, Embrapa: Seropédica, 2008. 14 p. (Embrapa Agrobiologia. Documento, 251).

SILVA, F.V.; MEYER, S.E. ; ARAUJO, J.L.S.; BARBE, T.C.; XAVIER, G.R.; O'HARA, G.; ARDLEY, J.; RUMJANEK, N.G.; FILLEMS, A.; ZILLI, J.E.. *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vigna unguiculata* groFn in Brazilian Amazon rainforest soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.2358-2363, 2014.

SNEATH, P. H. A. Evidence from *Aeromonas* for genetic crossing-over in ribosomal sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 3, p. 626-629, 1993.

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

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

STEPKOFSKI, T.; CZAPLINSKA, M.; MIEDZINSKA, K.; MOULIN, L. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha *Proteobacteria*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 483-494, 2003.

STRAININFO. **Bioportal**. 2014. Disponível em:
<<http://FFF.straininfo.net/>>

STRALIOTTO, R. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares no estudo da biodiversidade do rizóbio**. 2006. Disponível em:
<<http://FFF.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap11ID-Ym45o3LFOj.pdf>>. Acesso em 07 out. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.286-298.

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.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 2731-2739, 2011.

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

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

VAN BERKUM, P.; ELIA, P.; SONG, Q.; EARDLY, B. D. Development and application of a Multilocus Sequence Analysis method for the identification of genotypes within genus *Bradyrhizobium* and for establishing nodule occupancy of soybean (*Glycine max* L. Merr). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 3, p. 321-330, 2012.

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

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

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

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: BlacwFell Scientific, 1970.164 p.(IBP Handbook, 15), 1970. p. 164

YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAFADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 89-103, 2001.

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

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