



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAIRA REJANE COSTA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE ISOLADOS DE
RIZÓBIOS DO FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) DE
SOLOS DO MATO GROSSO DO SUL**

MAIRA REJANE COSTA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE ISOLADOS DE
RIZÓBIOS DO FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) DE
SOLOS DO MATO GROSSO DO SUL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mariangela Hungria

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Martins Mercante

Londrina
2016

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

Costa, Maira Rejane.

Caracterização polifásica de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Mato Grosso do Sul / Maira Rejane Costa. - Londrina, 2016.
96 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.

Coorientador: Fábio Martins Mercante.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. *Phaseolus vulgaris* - Tese. 2. filogenia de procariotos - Tese. 3. *Rhizobium* - Tese. 4. BOX-PCR – MLSA - 16S rRNA - Tese. I. Hungria, Mariangela. II. Mercante, Fábio Martins. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

MAIRA REJANE COSTA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS DO
FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) DE SOLOS DO MATO
GROSSO DO SUL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa Dra Diva de Souza Andrade
Instituto Agrônômico do Parana - IAPAR

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

Dra. Jakeline Renata Marçon Delamuta
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
EMBRAPA

Profa. Dra. Dafila Fagotti
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– EMBRAPA

Londrina, 10 de agosto de 2016.

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

Aos meus pais, Carlos e Silmeire, pela capacidade de acreditar e investir em mim.

Aos meus irmãos, Marcos e Márcia, por me proporcionarem paz, apoio, abrigo e incentivo em todo tempo.

E ao meu noivo, Luis, pela paciência, força e, principalmente, pelo amor e compreensão dedicados a mim.

Valeram a pena toda a distância, todo o sofrimento, enfim, todas as renúncias...

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível.

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Muito especialmente, desejo agradecer a minha orientadora Doutora Mariangela Hungria, desta tese, pelo apoio, incentivo e disponibilidade demonstrada em todas as fases que levaram à concretização deste trabalho.

Aos funcionários e amigos do Centro de Pesquisa Agropecuária Oeste que me acompanharam nessa longa jornada. Em especial Clarice, Suelma, Silvia (comunicação), Silvia (biblioteca), Dr. Auro, Dr. Carlos Kurihara, MSc William, Bianca, Vladimir, Sinéia. E ao meu co-orientador Dr. Fábio Martins Mercante pela dedicação, atenção dispensada, paciência e por ter me conduzido desde a minha graduação até o doutorado com calma necessária para me ajudar a transpor os momentos difíceis.

Aos colegas de trabalho Biana, Brenda, Walkyria, Paula, Jaque, Amanda, Talita, Carol, Anna, Adalgisa, Vivian, Rebeca, Artur, Lully, Letícia, Renata, Jackson, Marquito, Giba, Josi, Fernanda, Hosana, Michele, Douglas, Andrey e Marcos Vinicius. Aos funcionários da Embrapa Soja, Dr Marco Antonio Nogueira, Eduara, Ligia, D. Rosa (uma fofa!!!), Rinaldo e Renan. No dia a dia das análises, como foi gostoso compartilhar horas do dia com essa equipe! Foram momentos que, além de aprendizado científico, proporcionaram horas agradáveis de trabalho! Aos professores da UEL que, sem dúvida, contribuíram muito para o meu enriquecimento, não só científico, como também de uma futura docente.

Aos funcionários do Condomínio e da Academia da Cidade Universitária, que sempre me trataram muito bem, com muita gentileza e com muito respeito. À colega de apartamento Mayara, também deixo o meu agradecimento.

E por fim, porém, não menos importante, à minha família, noivo e amigos, pelos momentos de entusiasmo e apoio partilhados em conjunto.

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.

(Carl Jung)

COSTA, Maira Rejane. **Caracterização polifásica de isolados de rizóbios do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) de solos do Mato Grosso Sul**. 2016. 96f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa importante do ponto de vista social e econômico. No entanto, um dos fatores que limita a produção reside no cultivo em solos deficientes em nitrogênio. Neste contexto, uma estratégia importante consiste no suprimento de nitrogênio via fixação biológica de nitrogênio (FBN), pela simbiose da planta com variedade de rizóbios. Nos solos brasileiros existe grande diversidade de rizóbios capazes de nodular o feijoeiro, mas que apresentam, com frequência, baixa capacidade de fixar nitrogênio. Nesse contexto, estudos de taxonomia e filogenia de bactérias fixadoras de nitrogênio são de fundamental importância, não só para entender os processos evolutivos e obter avanços no conhecimento sobre ecologia de rizóbios, como também para a produção de inoculantes microbianos. Através das análises de perfil de DNA por BOX-PCR, sequências de 16S rRNA e análise de genes conservados (*housekeeping*) por MLSA (*Multilocus Sequencing Analysis*), além das características fenotípicas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de 73 bactérias capazes de nodular o feijoeiro, isoladas de 45 locais em 22 municípios do Mato Grosso do Sul, Brasil. As relações evolutivas estabelecidas, tanto com base no sequenciamento do gene 16S, como na análise individual e concatenada de três genes conservados (*glnII*, *gyrB* and *recA*) indicaram elevada diversidade de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro. Os resultados obtidos também revelaram isolados que podem representar novas espécies de rizóbios simbiotes de feijoeiro.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. BOX-PCR. MLSA. 16S rRNA. Filogenia de procariotos. *Rhizobium*.

COSTA, Maira Rejane. **Polyphasic characterization of rhizobia microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Mato Grosso do Sul, Brazil.** 2016 96 p. Thesis (Doctorate in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is an important legume under both the social and the economic points-of-view. However, a factor that often limits its production is cropping in soils with low N content. An important strategy consists on the supply of nitrogen by the biological nitrogen fixation (BNF) process, characterized by the symbiotic relationship of the plant with a variety of rhizobia. Brazilian soils usually show great diversity of rhizobia capable of nodulating common bean, but often with low capacity of BNF. In this context, studies about the taxonomy and phylogeny of nitrogen-fixing bacteria are of fundamental importance, not only to understand the evolutionary processes, contributing to our knowledge on rhizobia ecology, but also for the production of microbial inoculants. Through the analysis of DNA profiles by BOX-PCR, sequencing of the 16S rRNA gene and analysis of housekeeping genes by MLSA (Multilocus Sequencing Analysis), in addition to phenotypic characterization, the objective of this study was to evaluate the diversity of 73 bacteria capable of nodulating common bean isolated from 45 locations in 22 municipalities of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The evolutionary relationships established based both on the 16S rRNA gene, and in the single and concatenated analyses of three housekeeping genes (*glnII*, *gyrB* and *recA*) indicated high diversity of common bean rhizobia. The results also revealed isolates that might represent new rhizobial species microsymbionts of common bean.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. BOX-PCR. MLSA. 16S rRNA. Phylogeny of prokaryotes. *Rhizobium*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Fenograma dos 73 isolados de rizóbio avaliados com base nas características morfológicas das bactérias.....53
- Figura 2** - Dendrograma BOX-PCR dos 73 isolados56
- Figura 3** - Filogenia 16S dos isolados CPAO comparada aos rizóbios tipo, construída através do método Neighbor joining e a distância evolucionária calculada através do Maximum- likelihood. Bootstrap 1000 vezes63
- Figura 4** - Filogenia do gene glutamina sintetase (*glnII*) dos isolados CPAO e rizóbios tipo, construída através do método Maximum likelihood.....68
- Figura 5** - Filogenia do gene DNA *gyrase* (*gyrB*) dos isolados CPAO e rizóbios tipo, construída através do método Maximum likelihood.....69
- Figura 6** - Filogenia do gene DNA *recombinase* (*recA*) dos isolados CPAO e rizóbios tipo, construída através do método Maximum likelihood.....70
- Figura 7** - Filogenia construída através do Maximum likelihood baseada no alinhamento concatenado dos genes *housekeeping glnII+gyrB+recA* dos isolados CPAO e alguns rizóbios tipo71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Municípios, números de locais amostrados para coleta de solo e os respectivos isolados	45
Tabela 2 - Manifestações das características morfológicas dos rizóbios avaliados	47
Tabela 3 - Características fenotípicas: presença (V) e ausência de variação (NV) nos grupos do fenograma.....	52
Tabela 4 - Número de sequências e informação filogenética dos loci analisados	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CICLO DA FBN	15
2.2	MICROORGANISMOS CAPAZES DE REALIZAR FBN E SUA CLASSIFICAÇÃO	17
2.3	SIMBIOSE DE BACTÉRIAS COM LEGUMINOSAS	19
2.4	SIMBIOSE DE RIZÓBIOS COM PLANTAS DE FEIJOEIRO (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i>)	21
2.4.1	TAXONOMIA DE RIZÓBIOS DO FEIJOEIRO	21
2.4.2	FBN NA CULTURA DO FEIJOEIRO	24
2.5	A IMPORTÂNCIA DAS COLEÇÕES DE CULTURA E SUA RELAÇÃO COM A BIODIVERSIDADE	27
2.6	SISTEMÁTICA E TAXONOMIA MICROBIANA	29
2.7	TAXONOMIA POLIFÁSICA	32
2.7.1	ANÁLISE FENOTÍPICA	34
2.7.2	ANÁLISE GENOTÍPICA/FILOGENÉTICA	34
2.7.2.1	BOX-PCR	34
2.7.2.2	SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA	35
2.7.2.3	HIBRIDIZAÇÃO DNA-DNA	36
2.7.2.4	ANI – <i>AVERAGE NUCLEOTIDE IDENTITY</i>	37
2.7.2.5	MLSA – <i>MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS</i>	37
2.7.2.6	TEOR DE G + C	39
3	BIODIVERSIDADE EM ESTUDOS CONDUZIDOS EM DIVERSAS REGIÕES DO MUNDO E OS FATORES QUE PODEM LEVAR À ESPECIAÇÃO DE RIZÓBIOS	40

4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	ISOLAMENTO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM.....	45
4.2	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	46
4.3	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	47
4.3.1	EXTRAÇÃO DE DNA	47
4.3.2	BOX-PCR	48
4.4	CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA.....	48
4.4.1	AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S.....	48
4.4.2	GENE 16S rRNA	49
4.4.3	MLSA.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	FENOGRAMA.....	50
5.2	BOX-PCR	54
5.3	SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S	57
5.4	MLSA – ANÁLISE INDIVIDUAL E CONCATENADA DOS GENES <i>HOUSEKEEPING</i>	64
5.5	NOVA LINHAGEM EM NÍVEL DE ESPÉCIE DE RIZÓBIO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO NO MATO GROSSO DO SUL.....	72
6	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa importante do ponto de vista social e econômico, sendo utilizada na alimentação humana como fonte de proteínas, vitamina B e complexos de sais minerais, ferro, cálcio e fósforo (MAPA, 2015b). A cultura, porém, é muito susceptível a diversos fatores que podem influenciar na produtividade, comprometendo o suprimento de grãos (CONAB, 2015a). No Brasil, considerado um grão típico da culinária do país, a estimativa da produção das três safras para 2014/15 foi de 3.414,1 mil toneladas, com produtividade de 1.091 kg/ha (CONAB, 2015b).

Um dos fatores que limita a produção reside e no cultivo em solos pobres em nitrogênio (HUNGRIA et al., 2013). Nesse sentido, a capacidade de estabelecer relações simbióticas com diversos rizóbios, estabelecendo o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN), representa uma estratégia importante. Além de benefícios ambientais, a FBN pode promover economia significativa em relação ao uso de fertilizantes nitrogenados, com níveis elevados de produtividade a campo (HUNGRIA et al., 2000; PELEGRIN et al., 2009).

Contudo, existe uma grande diversidade de rizóbios nos solos brasileiros capazes de nodular o feijoeiro, mas que, com frequência, apresentam baixa capacidade de fixar nitrogênio (MERCANTE et al., 1998; STRALIOTTO et al., 1999; ANDRADE et al., 2002; GRANGE et al., 2007). Essa representa uma das principais limitações ao sucesso da inoculação com estirpes elite, que têm que competir com essas bactérias do solo (VARGAS et al., 2000).

Estudos de taxonomia e filogenia de bactérias fixadoras de nitrogênio são de fundamental importância não só para entender os processos evolutivos e obter avanços no conhecimento sobre ecologia de rizóbios, como também para a produção de inoculantes microbianos. Assim, trabalhos sobre a diversidade genética de rizóbios que nodulam o feijoeiro vêm sendo realizados (RIBEIRO et al., 2009, ASERSE et al., 2012; JUNIER et al., 2014; CAO et al., 2014; BAGINSKY et al., 2015). Contudo, a diversidade biológica não pode ser analisada através de uma única análise (THOMPSON et al., 2013; RAMASAMY et al., 2014; VANDAMME; PEETERS, 2014), sendo necessária a complementação com informações fenotípicas e genotípicas.

Através das análises de BOX-PCR, sequência do gene ribossomal 16S e análise pela técnica de MLSA (*Multilocus Sequencing Analysis*), além das características fenotípicas, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética de 73 bactérias capazes de nodular o feijoeiro, isoladas de 45 locais em 22 municípios do Mato Grosso do Sul, Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CICLO DA FBN

A atmosfera contém grandes quantidades de moléculas de nitrogênio, cerca de 80% do volume. Embora esteja presente em grande porcentagem na atmosfera da Terra na forma de dinitrogênio (N_2), a maioria dos organismos é incapaz de metabolizar N_2 , um gás inerte. O nitrogênio (N) é considerado elemento essencial para os organismos, pois está presente na composição de moléculas importantes tais como, NADPH, ATP, NADPH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas (MIFLIN; LEA, 1976; HARPER, 1994; BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). Segundo Hungria e colaboradores (2007), o nitrogênio é o nutriente mais limitante para a produção vegetal. Além de ser caro, pois consome elevada demanda de energia para sua síntese, é também um dos mais poluentes.

A dinâmica do nitrogênio na natureza pode ser entendida através do processo denominado “Ciclo Biogeoquímico do Nitrogênio”, evento natural de reciclagem do elemento em diferentes formas químicas do meio físico para os organismos e vice-versa (RAVEN, 2001). Assim, o ciclo do N é caracterizado por reações de oxirredução mediadas por microrganismos que adquirem energia advinda das mudanças dos estados de oxirredução. Em síntese, o ciclo do N apresenta quatro etapas:

- i) Mineralização - etapa onde os microrganismos realizam a decomposição da matéria orgânica liberando NH_4^+ , o qual pode sofrer nitrificação e/ou ser adsorvido na fração mineral, ou na matéria orgânica do solo;
- ii) Nitrificação - conversão do NH_4^+ para NO_3^- . O nitrato, assim como NH_4^+ , é uma das formas que planta e microrganismos conseguem assimilar nitrogênio. Caso não ocorra a assimilação, o NO_3^- pode ser lixiviado no solo, ou ser desnitrificado;
- iii) Desnitrificação - quando bactérias, denominadas desnitrificantes, convertem NO_3^- para N_2 ;
- iv) Imobilização - assimilação do NO_3^- e NH_4^+ pelos microrganismos, para posterior utilização na construção de biomoléculas.

As principais fontes fornecedoras de N necessário ao crescimento das plantas são: 1- Nitrogênio do solo (proveniente principalmente da decomposição da matéria orgânica); 2- Fertilizantes Nitrogenados (produção industrial através do processo Haber-Bosch); 3- Contribuição através da fixação não biológica, resultante de descargas elétricas, combustão e vulcanismo; e 4- Fixação biológica do nitrogênio atmosférico- FBN (HUNGRIA et al., 2001, 2007, 2013). Depois da fotossíntese (em que a luz solar é convertida em energia) a fixação biológica do nitrogênio é o segundo processo biológico mais importante para a produção de culturas (GHANY et al., 2013), além da importância para a fertilidade do solo e para o ciclo do N (GUEREÑA et al., 2015).

A fixação industrial do nitrogênio ocorre por um processo conhecido como Haber-Bosch, que consiste em converter nitrogênio e hidrogênio moleculares em amônia quando submetidos a temperaturas e pressão elevadas. As necessidades para esta síntese química são: hidrogênio (derivado do gás petróleo); catalisador contendo ferro; altas temperaturas (300-600°C) e altas pressões (200 a 800 atm). Consequentemente existe um custo elevado para a síntese de fertilizantes nitrogenados, resultante, principalmente, da necessidade de gastos com fontes de petróleo, que também não são renováveis (SIQUEIRA; FRANCO, 1998; FISCHER; NEWTON, 2002). De acordo com Hungria et al. (2001), para a síntese de uma tonelada de NH_3 são necessários seis barris de petróleo com custo energético de 54 MJ por kg de N, em comparação com 3,2 e 5,9 MJ por kg de P e K, respectivamente (LAEGREID et al., 1999; HUNGRIA et al., 2013). O processo industrial Haber-Bosch consome 2% da energia mundial (BRITISH PETROLEUM, 1996); além do consumo de energia de fontes não renováveis, os fertilizantes nitrogenados possuem baixa eficiência, em torno de 50%, devido à imobilização microbiana e a possíveis perdas por volatilização de amônia, lixiviação do nitrato e desnitrificação (REIS JUNIOR et al., 2011).

A fixação natural do nitrogênio (atmosférica e biológica) se dá a uma taxa de 190×10^{12} g N/ano; desse total, as emissões por relâmpagos são responsáveis por 8%, um adicional de 2% é proveniente do ácido nítrico (HNO_3) que se precipita na Terra em forma de neve ou chuva e os 90% restantes resultam da fixação biológica de nitrogênio (FBN), em que bactérias fixam o nitrogênio molecular (N_2) em amônia (NH_3). Os procariontes que fixam nitrogênio, em contraste com os

processos industriais, realizam a FBN em temperaturas e pressões ambientes (SIQUEIRA; FRANCO, 1988; EPSTEIN; BLOOM, 2006).

Conseqüentemente, do ponto de vista econômico e ambiental, a FBN representa o principal aporte de N para as plantas (HUNGRIA et al., 2001; 2007) e para os ecossistemas terrestres (MOSIER et al., 2002). Outro benefício que a FBN oferece ao ambiente é em relação à redução das emissões de gases de efeito estufa, onde o Brasil assumiu compromissos voluntários durante a Conferência das Partes (COP), realizada na Dinamarca (2009) e México (2010). Para isso, o governo brasileiro criou o Plano ABC (Agricultura de Baixa emissão de Carbono) e, dentre as metas estabelecidas, está a de adoção de práticas agrícolas envolvendo a FBN, com o compromisso de incremento de área com FBN de 5,5 milhões de hectares e um potencial de mitigação de 10 milhões de toneladas de CO₂ (HUNGRIA et al., 2013).

2.2 MICRORGANISMOS CAPAZES DE REALIZAR FBN E SUA CLASSIFICAÇÃO

Do ponto de vista evolutivo, acredita-se que a FBN tenha se desenvolvido quando as reservas geoquímicas de nitrogênio fixado se tornaram escassas na biosfera. O esgotamento dos óxidos de nitrogênio (nitratos e nitritos) pelos organismos teria, provavelmente, limitado seu crescimento e ocasionado uma pressão seletiva que favoreceu o aparecimento da diazotrofia. A capacidade de fixar nitrogênio foi, portanto, um evento relativamente precoce na evolução dos procariontes e anterior ao surgimento da fotossíntese (e, conseqüentemente, aumento da concentração de oxigênio livre na atmosfera), uma vez que a nitrogenase é extremamente sensível à desnaturação por oxigênio (NEWTON, 2000).

A nitrogenase é a enzima responsável pela redução do dinitrogênio para amônia, formada por um complexo metal enzimático com características estruturais e mecanismos conservados (REES; HOWARD, 2000; DIXON; KAHN, 2004). Burk e Burris (1941) descrevem o complexo da enzima nitrogenase como um sistema de dois componentes do tipo metalo-proteína (as proteínas Fe e MoFe), sendo que nenhuma delas tem atividade catalítica por si só. A molibdênio-nitrogenase consiste de uma ferro-proteína e de uma molibdênio-ferro-proteína (MoFe – proteína). A Fe-proteína funciona como doadora de elétrons para a MoFe-

proteína (que contém o cofator da enzima, FeMoco), em um processo dependente de hidrólise de MgATP. Todos diazotróficos possuem o sistema FeMo, mas em condições de deleção do molibdênio, alguns organismos – por exemplo, *Azotobacter vinelandii*, e *Rhodobacter capsulatus* – induzem à síntese alternativa de nitrogenase contendo FeV (ferro – vanádio) ou co-fatores Fe e Vanádio-Vanádio (vanádio-vanádio) (EADY, 1996; DIXON; KAHN, 2004). Além de reduzir nitrogênio atmosférico à amônia, uma das características funcionais da nitrogenase é sua baixa especificidade por substrato, sendo também capaz de reduzir outras moléculas com ligações triplas, como acetileno, cianeto de hidrogênio e óxido nitroso (SILVER; POSTGATE, 1973; BALDANI et al., 2009).

Assim, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é muito importante e tem sido explorada indiretamente há séculos, quando a rotação de culturas com leguminosas era praticada para melhorar a fertilidade do solo. As bases do processo biológico são conhecidas hoje e os microrganismos envolvidos são classificados como diazotróficos (SIQUEIRA; FRANCO, 1998; FISHER; NEWTON, 2002; BALDANI et al., 2009). Esses microrganismos são caracterizados por apresentarem ampla distribuição filogenética, além de exibir diferentes tipos de associações com vegetais. Nesse sentido, os diazotróficos são divididos em três grandes grupos:

- i) Vida livre - não estabelecem interação com plantas e são encontrados em diversos habitats. Apresentam representantes pertencentes às classes alpha, beta e gama proteobactérias. Como exemplo, bactérias do gênero *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*, *Azomonas*;
- ii) Associativos - microrganismos que apresentam relação pouco especializada com plantas e sem formar estruturas específicas. São divididos em dois grupos: facultativos (colonizam rizosfera e interior das raízes) e obrigatórios (colonizam o interior das raízes). Como exemplo desse tipo de interação: bactérias dos gêneros *Azospirillum* que se associam com plantas de milho (*Zea mays* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.) e o *Herbaspirillum*, que colonizam o interior de plantas de arroz (*Oriza sativa* L.);
- iii) Simbióticos diazotróficos - Estabelecem simbiose com a planta hospedeira, com a formação de estruturas especializadas. Como

exemplo de simbiose, tem-se a associação com plantas actinorrizas com actinomicetos do gênero *Frankia*. No entanto, a simbiose entre planta e microrganismos de maior importância agrícola é aquela entre leguminosas e simbiontes que induzem à formação de nódulos radiculares.

Portanto, a diazotrofia é a habilidade de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia, sendo uma característica encontrada em Bacteria e em Archaea (SAWADA et al., 2003), que ocorre graças à ação da enzima nitrogenase (HOWARD; REES, 1996). Embora, a habilidade de reduzir nitrogênio atmosférico à amônia esteja presente em vários gêneros, as condições fisiológicas necessárias para a FBN podem variar de espécie para espécie, bem como com as condições ambientais (GIONGO et al., 2007). Em geral, as condições limitantes ao processo de FBN incluem níveis elevados de O₂, altos níveis de N reativo no meio e baixa disponibilidade de outros nutrientes, como ferro (Fe), fósforo (P), potássio (K) e molibdênio (Mo) (VITOUSEK et al., 2013).

Diversos organismos, com diferentes classificações filogenéticas, são vistos como contribuintes para a fixação de nitrogênio, sustentando diferentes sistemas agrícolas, florestais, entre outros ecossistemas (GRAHAM; VANCE, 2000). Como por exemplo, bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre (*Azotobacter*, *Clostridium* e *Klebsiella*), alguns tipos de cianobactérias (BERINGER et al., 1979), microrganismos diazotróficos associativos - *Beijerinckia* spp. e cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.); *Pseudomonas* sp. e arroz (*Oryza sativa*) (Baldani et al., 2009) e as beta proteobactérias - *Burkholderia* com *Mimosa* spp. (GYANESHWAR et al., 2011).

2.3 SIMBIOSE DE BACTÉRIAS COM LEGUMINOSAS

Em relação às fontes de nitrogênio para algumas espécies de leguminosas, a FBN representa a principal contribuição de N para as plantas. Na simbiose com leguminosas, as bactérias diazotróficas são coletivamente chamadas de rizóbios que, em resposta a sinais moleculares emitidos pelas plantas hospedeiras, infectam e formam nódulos nas raízes dessas plantas (BOTTOMLEY; MYROLD, 2007), sendo que em alguns casos específicos os nódulos podem ser

formados em caules. Nesses nódulos, o nitrogênio resultante da FBN é exportado às plantas, em troca de fotossintatos (FISCHER; NEWTON, 2002). Contudo, vale ressaltar que, em determinados casos, há a necessidade de um equilíbrio entre o uso de fertilizantes e microrganismos diazotróficos, dependendo do tipo de cultura e das características do solo e da região (GRAHAM; VANCE, 2000).

Existe um custo energético para a planta suportar a simbiose que, segundo Heytler et al., (1994), seria de cerca de 12 g de carbono orgânico (proveniente de fotossintatos) por átomo de nitrogênio fixado. Inicialmente, a planta hospedeira fornece carbono, proveniente dos cotilédones e da fotossíntese, para o desenvolvimento dos nódulos. Com o estabelecimento do processo de FBN, os custos energéticos dos microssimbiontes e do processo de FBN nos nódulos precisa ser mantido via suprimento de fotossintatos (SCHUBERT et al., 1986). Segundo Aranjuelo et al. (2014), além do oxigênio, as concentrações de carboidratos e nitrogênio no nódulo provaram serem os principais fatores que modulam o processo de FBN.

Os principais compostos orgânicos transportados através da membrana dos procariotos são os intermediários do ácido cítrico – os ácidos orgânicos C4, succinato, malato e fumarato. Eles são utilizados como doadores de elétrons para a síntese de ATP e, após sua conversão a piruvato, como fonte final de elétrons para redução do N_2 . Nos nódulos, a amônia é sintetizada e rapidamente incorporada a íons hidrogênio (H^+), abundantes nas células das bactérias, ocorrendo a transformação em íons amônio (NH_4^+) que serão, então, distribuídos para a planta hospedeira e incorporados em diversas formas de N orgânico, como os ureídeos, aminoácidos e amidas (HUNGRIA et al., 2007). Os compostos nitrogenados produzidos são transportados através do xilema para a planta. No contexto genético, o estabelecimento de uma simbiose efetiva requer uma expressão coordenada de genes tanto da bactéria, como da planta (NEVES; HUNGRIA, 1987; GONNET; DIAZ, 2000; VANCE; LAMB, 2001; HUNGRIA; KASCHUK, 2014). Uma ampla gama de genes participa da expressão da atividade da FBN, como por exemplo, os genes *nif* (*nitrogen fixation*) (MASEPOHL; KLIPP, 1996; REIS; TEIXEIRA, 2006), *fix* (fixação), *nod* (de nodulação), *exo* (exopolissacarídeos), *lps* (lipopolissacarídeos), *ndv* (*nodule development*). Os fenótipos resultantes da ação desses genes podem ser combinações de Fix^+ (positivo para fixação) e Fix^- (negativos para fixação).

Diversos fatores devem ser levados em consideração a fim de garantir o estabelecimento e, conseqüentemente, a eficiência da FBN com leguminosas. Como por exemplo, os fatores químicos (concentração de cloreto de sódio, metais, níveis tóxicos de alumínio e manganês e níveis baixos de cálcio, potássio, magnésio e molibdênio), físicos (estrutura e erosão do solo, umidade, temperatura e pH), biológicos (substâncias quimiotáticas, ciclagem de nutrientes, matéria orgânica do solo) afetam a bactéria, a planta e a simbiose. Há, ainda, fatores intrínsecos da planta e das bactérias.

2.4 SIMBIOSE DE RIZÓBIOS COM PLANTAS DE FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.)

2.4.1 TAXONOMIA DE RIZÓBIOS DO FEIJOEIRO

A Mesoamérica e os Andes são considerados os dois principais centros de diversificação genética do feijoeiro. O Mesoamericano, considerado como centro primário, compreende o México, Colômbia, Equador e região norte do Peru, e o Andino o sul do Peru e o norte da Argentina. Embora não sejam encontrados ancestrais de feijoeiro selvagem no Brasil, essa leguminosa vem sendo cultivada desde tempos pré-históricos no país (GEPTS; DEBOUCK, 1991; FREITAS, 2006). Evidências arqueológicas indicam que o feijoeiro se espalhou por migração e comércio entre populações indígenas ao longo do tempo.

O feijoeiro é capaz de estabelecer relações simbióticas com diversas espécies de rizóbios. Em 1888, Beijerinck isolou bactérias fixadoras de nitrogênio, denominadas de *Bacillus radicícola* de nódulos de leguminosas. Logo em seguida, esses organismos foram classificados como *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889). Inicialmente, os pesquisadores consideravam os rizóbios como espécie única e capazes de infectar todas as leguminosas. Contudo, hoje, de acordo com a lista de nome de procariotos, o número de rizóbios para o gênero *Rhizobium* descritos é de, aproximadamente, 86 espécies (LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE, 2016). Essas espécies estão classificadas na família Rhizobiaceae Conn 1938, que ainda inclui outros gêneros, *Neorhizobium*, *Allorhizobium*, *Agrobacterium*, *Ensifer*, *Shinella* e *Pararhizobium*,

Os simbiotes do feijoeiro foram classificados pela primeira vez como *Rhizobium phaseoli*, com base no conceito de inoculação cruzada de seu

hospedeiro específico (FRED et al., 1932). No entanto, o método de inoculação cruzada mostrou não ser um marcador o suficiente confiável para estudos taxonômicos (GRAHAM, 1964; WILLEMS, 2006).

Com base em estudos de taxonomia numérica, Jordan e colaboradores, em 1984, reclassificaram os simbioses do feijoeiro em uma nova espécie, *Rhizobium leguminosarum*, que continha três biovars (classificadas de acordo com sua planta hospedeira), bv *viciae* (*Pisum sativum*), bv. *trifolii* (*Trifolium* spp.) e bv. *phaseoli* (*Phaseolus vulgaris* L.) Outros estudos conduzidos nessa época evidenciaram alta relação entre *Rhizobium* e *Agrobacterium* e a distinção entre rizóbios de crescimento rápido e lento (GRAHAM, 1964), sendo que, mais tarde, os de crescimento lento foram separados em um novo gênero, *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1982).

Com os avanços nas técnicas de biologia molecular e o isolamento de novas estirpes em várias partes do mundo, houve a descrição de diferenças entre diversos rizóbios do feijoeiro (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*), de tal modo que, em 1991, Martinez-Romero e sua equipe reuniram as bactérias que nodulam feijoeiro em dois grupos principais, denominados tipo I e tipo II. Através da análise de *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), hibridização DNA-DNA e análise da sequência do gene 16S rRNA, os pesquisadores distinguiram os dois grupos quanto às características: 1) quantidade de cópias do gene *nifH*; 2) relação com planta hospedeira; 3) hibridização com gene *psi*; e 4) capacidade de nodular *Leucaena* spp. Contudo, apenas uma nova espécie foi aceita e o grupo II foi então classificado como *Rhizobium tropici*, que incluiria os tipos IIA e IIB (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991).

Durante muito tempo, o grupo IIA teve como representante a estirpe de referência CFN 299 e o grupo IIB a estirpe CIAT 899. Contudo, como demonstrado nos trabalhos de Ribeiro et al. (2009, 2012) e de Dall'Agnol et al., (2013, 2014), entre outros, a elevada diversidade observada em linhagens de *R. tropici* resultou na descrição de novas espécies. Desse modo, a partir de estirpes previamente classificadas como *R. tropici*, surgiram as espécies *R. leucaenae*, incluindo as estirpes previamente classificadas como grupo IIA de *R. tropici* (RIBEIRO et al., 2012), *R. freirei* (DALL'AGNOL et al., 2013) e *R. paranaense* (DALL'AGNOL et al., 2014).

Em relação ao grupo I de simbioses do feijoeiro, Segovia e colaboradores (1993) propuseram que alguns rizóbios isolados de solo americano poderiam ser reclassificados em uma nova espécie, *R. etli*. Em seguida, outras espécies foram descritas: *R. gallicum* e *R. giardinii* (AMARGER et al., 1997), *R. hainanense* (CHEN et al., 1997); *R. mongolense* (VAN BERKUM et al., 1998), *R. huautlense* (WANG et al., 1998).

Há evidência de que *R. etli* é o microssimbionte dominante em países onde o feijoeiro é nativo, como México, Colômbia e sul dos Andes (SOUZA et al., 1994; AGUILAR et al., 2001). Após a colonização por europeus, sementes de feijoeiro, provavelmente carregando *R. etli*, foram introduzidas na Europa, e o plasmídeo simbiótico foi transferido para *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (SEGOVIA et al., 1993) e, em seguida, para *R. gallicum* bv. *phaseoli*. Esse fato é comprovado por vários estudos, onde os genes simbióticos de *R. etli* bv *phaseoli* foram encontrados na Espanha, Portugal e França, relacionados a outras espécies cromossômicas, tais como *R. leguminosarum*, *R. lusitanum*, *R. gallicum* e *R. giardinii* (AMARGER et al., 1997; GARCIA-FRAILE, 2010; MULAS et al., 2011; VALVERDE et al., 2006). Além da Espanha e França, *R. etli* é encontrado em outros países onde o feijoeiro foi introduzido, como Gambia, Senegal e Tunísia (SOUZA et al., 1994; DIOUF et al., 2000; SILVA et al., 2003).

Contudo, a taxonomia de *R. etli* ainda não está totalmente definida, por exemplo, Lopez-Guerrero et al. (2012) revelaram que várias estirpes de *R. etli* deveriam ser reclassificadas como *R. phaseoli* e que ambas espécies, com base em estudos na sequência 16S rRNA e genes *housekeeping*, são resultado recente de especiação no processo evolutivo (LOPEZ-GUERRERO et al., 2012).

A dispersão do microssimbionte associado às sementes do feijoeiro pode ter levado à diversificação de rizóbios (onde os genes simbióticos foram transferidos para espécies nativas) capazes de nodular o feijoeiro, demonstrando possível evolução dos rizóbios, dirigida, principalmente, por fatores do solo e da planta hospedeira. Conseqüentemente, espécies de rizóbios têm sido isoladas de nódulos de feijoeiro em diversos países (AMARGER et al., 1994; ANYANGO et al., 1995; DIOUF et al., 2000; GRANGE; HUNGRIA, 2004; PINTO et al., 2007).

Considerando a taxonomia de rizóbios como um todo, a discussão ao nível de gêneros para rizóbios ainda exhibe alguns questionamentos. Para alguns sistemas o gênero *Agrobacterium* e o “complexo *R. galegae*” apresentam

controvérsias quanto à sua taxonomia e nomenclatura. Nesse sentido, MOUSAVI et al. (2014) avaliaram a filogenia de 114 isolados utilizando seis genes *housekeeping* com base no MLSA e sequência do gene 16S rRNA. Os resultados demonstraram que *R. galegae*, *R. vignae*, *R. huautlense* e *R. alkalisoli* formaram um clado separado, representando um novo gênero, para o qual foi proposto o nome *Neorhizobium* gen. nov. *Agrobacterium* formou um clado separado, incluindo bactérias fitopatogênicas da família *Rhizobiaceae*. A espécie *A. vitis* agrupou se com o gênero *Allorhizobium*, e foi reclassificada como *Allorhizobium vitis*, enquanto, que *Rhizobium rhizogenes* foi considerada a nomenclatura apropriada para *Agrobacterium rhizogenes*.

Outro gênero adjacente a *Rhizobium*, proposto para a família *Rhizobiaceae*, foi definido como *Pararhizobium* gen. nov., que inclui quatro espécies *P. giardinii*, *P. capsulatum*, *P. herbae* e *P. sphaerophysae*. As espécies desse gênero são amplamente distribuídos em todo o mundo, sendo isolados de diversas plantas hospedeiras: *P. vulgaris*, *Astragalus membranaceus*, *Oxytropis cashmiriana*, *Caragana sínica*, *Albizia kalkora*, *Kummeroviwia stipulaceae*, *Astragalus danicus*, *Sphaerophysa salsula* (MOUSAVI et al., 2015).

2.4.2 FBN NA CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijoeiro comum é uma das leguminosas mais consumidas na alimentação como fonte de proteína, vitamina B e complexos de sais minerais, ferro, cálcio e fósforo (MAPA, 2015). No entanto, a cultura do feijoeiro é muito susceptível a diversos fatores que podem influenciar na produtividade das lavouras, comprometendo o quadro de suprimento em termos quantitativos (CONAB, 2015a). No Brasil, considerado um grão típico da culinária do país, a produção das três safras em 2014/15 foi de 3.414,1 mil toneladas e produtividade de 1.091 kg/ha (CONAB, 2015b). Um dos fatores que limitam a produção é a baixa capacidade de o feijoeiro adquirir nitrogênio para o seu desenvolvimento (MNASRI et al., 2007). Nesse sentido, melhorias consideráveis e com baixo custo podem ser obtidas com a adoção da tecnologia de fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2013).

Plantas de feijoeiro são caracterizadas por estabelecerem relações simbióticas com uma variedade de rizóbios (MARTINEZ-ROMERO, 2003). E essa

simbiose inclui fenótipos Fix+: *R. leguminosarum* bv phaseoli (RAMIREZ-BAHENA et al., 2008), *R. phaseoli* (Ramirez-Bahena et al., 2008), *R. tropici* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991), *R. etli* (SEGOVIA et al., 1993), *R. leucaenae* (RIBEIRO et al., 2012), *R. giardinii* bv. phaseoli (AMARGER et al., 1997), *R. gallicum* (AMARGER et al., 1997), *R. lusitanum* (VALVERDE et al., 2006), *R. pisi* (RAMIREZ-BAHENA et al., 2008), *R. freirei* (DALL'AGNOL et al., 2013), *R. paranaense* (DALL'AGNOL et al., 2014), *R. mesoamericanum* (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2012), *R. ecuadorensis* (RIBEIRO et al., 2015), *R. sophorae* (JIAO et al., 2014), *R. sophoriradicis* (JIAO et al., 2014), *R. grahamii* (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2012), *R. azibense* (MNASRI et al., 2014), *R. mongolense* (VAN BERKUM et al., 1998) e Fix- : *R. giardinii* sv giardinii (AMARGER et al., 1997), *Rhizobium miluonense* (GU et al., 2008). Além dos rizóbios, estirpes pertencentes a outros gêneros, como *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, bem como estirpes sem posições taxonômicas definidas, podendo representar novas espécies, também exibem a capacidade de formar nódulos em associação com o feijoeiro (GRANGE; HUNGRIA, 2004; RIBEIRO et al., 2013).

Ao contrário da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.), a FBN na cultura do feijoeiro, em geral, não é tão eficiente e que isso ocorre devido a uma série de fatores relacionados à bactéria, à planta e ao meio ambiente. Em relação à planta, uma limitação reside no melhoramento genético, que historicamente não tem priorizado o processo biológico. Em relação ao meio ambiente, a simbiose feijoeiro-rizóbio apresenta maior sensibilidade a estresses ambientais, o que, em certas condições, pode dificultar o aporte de nitrogênio via processo biológico. Também existe a limitação por uma população elevada de rizóbios nos solos, que são muito eficientes em formar nódulos, mas pouco eficientes em fixar nitrogênio com essa leguminosa. Esses fatores resultam em que, muitas vezes, a contribuição da fixação biológica do nitrogênio seja baixa (HUNGRIA et al., 1997; HUNGRIA; VARGAS, 2000; HUNGRIA et al., 2013).

Apesar das dificuldades da FBN na cultura do feijoeiro, ganhos no rendimento da cultura com a inoculação foram observados nos trabalhos conduzidos por Hungria et al. (2000) em Londrina-PR, Mendes et al., (2004; 2007) no DF e em Unai-MG e Pelegrin et al (2009) em Dourados-MS. Contudo, mesmo com os benefícios da FBN, a inoculação do feijoeiro comum com estirpes de rizóbio ainda não apresenta resultados consistentes que permitam a recomendação inequívoca

dessa técnica para substituição de todo o fertilizante nitrogenado nas condições de cultivo no Brasil (FERREIRA et al., 2013).

Nesse sentido, desde a década de 1980, os pesquisadores brasileiros têm selecionado estirpes de rizóbios para o feijoeiro comum. Em 1985, as estirpes recomendadas para inoculantes foram: SEMIA 487, SEMIA 492, e SEMIA 4048 (RELARE, 1985). Quatro anos mais tarde, devido a problemas de instabilidade genética, as estirpes recomendadas passaram a ser SEMIA 4064 e a CIAT 899 (SEMIA 4077). A partir de um programa de seleção de estirpes nativas dos solos brasileiros com avaliações *in vitro*, em casa de vegetação e em campo, foi obtida a SEMIA 4080 (HUNGRIA et al., 2000) que, até então, era denominada de PRF 81, sendo classificada recentemente como *R. freirei* (DALL'AGNOL et al., 2013). Na busca por estirpes adaptadas às condições de Cerrados, outro programa de seleção de estirpes identificou a estirpe H12, que passou a ser autorizada para o uso em inoculantes comerciais em 2004, recebendo a denominação oficial de SEMIA 4088 (RELARE, 2005; HUNGRIA et al., 2013).

Os resultados do programa de seleção de estirpes demonstram que é possível selecionar estirpes mais eficientes e adaptadas às condições locais. O processo de seleção adotado no Brasil tem como objetivo encontrar estirpes dentro da diversidade natural dos solos, portanto, sem a necessidade de transgenia, o que facilita a aprovação do uso comercial (FERREIRA et al., 2013). No Brasil, estirpes pertencentes ao amplo grupo *R. tropici-R. leucaenae-R. freirei* são utilizadas em inoculantes para FBN devido às propriedades intrínsecas das espécies, como tolerância a temperaturas elevadas e pH baixo (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991; GRAHAM et al., 1991; MERCANTE et al., 1998; HUNGRIA et al., 2000, 2003; MOSTASSO et al., 2002; DALL'AGNOL et al., 2014), que resultam em elevada competitividade em solos tropicais brasileiro. Outra propriedade é em relação à estabilidade genética dos genes simbióticos que essas espécies apresentam, provavelmente devido à presença de uma única cópia do gene *nifH* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991).

Neste contexto, estudos de taxonomia e filogenia de bactérias fixadoras de nitrogênio são fundamentais para selecionar estirpes eficientes e tolerantes às condições ambientais para a produção de inoculantes microbianos. Com isso, é possível expandir o uso de biofertilizantes, que podem proporcionar

altos rendimentos das culturas, redução de custos para o produtor, além de promover a sustentabilidade da agricultura.

2.5 A IMPORTÂNCIA DAS COLEÇÕES DE CULTURA E SUA RELAÇÃO COM A BIODIVERSIDADE

Há cerca de 4 bilhões de anos, a vida sofreu um extenso processo de alteração, à medida que novos tipos de organismos surgiram a partir de outros tipos, existentes no passado, conhecido como processo evolutivo. A evolução é a descendência com modificação, uma alteração na sequência do DNA genômico de um organismo e a herança daquela alteração pela geração seguinte. Assim, a evolução é responsável não somente pela vasta diversidade que observamos atualmente, mas também pelo alto grau de complexidade dos organismos modernos (MADIGAN et al., 2010). Nesse contexto, é importante salientar que a existência e a heterogeneidade de seres vivos no planeta estão intimamente ligadas à diversidade e à atividade metabólica de microrganismos na natureza (LOVELOCK, 1988; STOLZ et al., 1989; TRUPER, 1992).

O Brasil abriga mais de 20% do número total de espécies da Terra, o que faz com que o país ocupe posição de destaque entre aqueles de maior diversidade (MMA, 2015a). Durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (CNUMAD), realizada durante a ECO-92, foi criada a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), em que o Brasil foi eleito signatário, em 1993, sendo assim também responsável pelo patrimônio mundial de biodiversidade.

Ainda de acordo com o MMA, mais de 12.256 espécies de vertebrados e invertebrados foram estudadas no Brasil. Em relação à flora catalogada no país, são reconhecidas aproximadamente 4747 espécies de algas, 32831 de angiospermas, 1524 de briófitas, 5712 de fungos, 30 de gimnospermas e 1253 de samambaias e licófitas (MMA, 2015b). Em relação ao número de espécies procarióticas, a nível mundial é de, aproximadamente, 12000. Esse número é considerado baixo, uma vez que há 1,5 milhões de espécies de animais conhecidas (CHUN; RAINEY, 2014). Toda essa biodiversidade existente no planeta deve-se à ação dos processos metabólicos microbianos que permitiram o surgimento e evolução de novas formas de vida, organismos multicelulares, plantas e animais superiores. Do ponto de vista ambiental, a sustentabilidade da vida no planeta é

dependente da participação dos microrganismos em processos ecológicos bastante importantes, como ciclos biogeoquímicos, ciclagem da matéria orgânica, manutenção e fertilidade da estrutura de solos (MADIGAN et al., 2010).

A avaliação do conhecimento sobre a diversidade de microrganismos no Brasil revela que as estimativas são baixas quando comparadas à diversidade de outros táxons, como animais superiores e plantas.

Nos últimos anos, tem-se notado um aumento na busca por microrganismos e, também, de seus produtos, para fins biotecnológicos. Constantemente são lançados no mercado fármacos, enzimas, cosméticos, alimentos, além de microrganismos utilizados como inoculantes agrícolas, incluindo solubilizadores de fosfato, biorremediadores, entre outros. A biodiversidade responde por, aproximadamente, 40% do PIB brasileiro, sendo responsável por 31% da exportação brasileira (MMA, 2015c). Nesse sentido, os microrganismos desempenham um papel fundamental para o meio ambiente, economia e indústria do país.

Neste contexto, além da importância da diversidade microbiana para a manutenção da vida e, também, do seu valor econômico, aliado à informação ainda escassa, as coleções de culturas de microrganismos representam centros de conservação de recursos genéticos que permitem classificar, identificar e armazenar esses materiais biológicos, a fim de que possam vir a ser utilizados para o progresso da ciência em benefício da humanidade, além de permitir o acesso ao conhecimento da biodiversidade existente no planeta (MADIGAN et al., 2010).

Assim, o material biológico mantido nas coleções de culturas representa a matéria-prima e o patrimônio genético para fins biotecnológicos e contribui, significativamente, para a geração de alternativas e inovações, auxiliando na sustentabilidade dos agroecossistemas. Conseqüentemente, a pesquisa e conservação de recursos genéticos microbianos constituem práticas indispensáveis ao desenvolvimento científico e tecnológico (EMBRAPA, 2015).

As coleções de microrganismos já percorreram um longo caminho, desde os princípios básicos na década de 1890, com a coleção de Kral em Praga e da coleção do Instituto Pasteur, em Paris (STACKEBRANDT, 2010). Hoje, aproximadamente 704 coleções de serviço, em 72 países, estão registradas no centro mundial de dados para os microrganismos (www.wdcm.org). Ao todo, essas coleções perfazem um total de 1,5 milhões de microrganismos catalogados com

base nos guidelines internacionais: *Word Federation For Culture Collections Guidelines* da WFCC (*World Federation for Culture Collections*; Federação Mundial de Coleções de Culturas) e *Guidance For The Operation of Biological Research Centers (BRCs)* da OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*; Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento) (JANSSENS et al., 2010; STACKEBRANDT, 2010).

Atualmente, com a finalidade de atender à futura demanda da ciência e biotecnologia, existem vários Centros de Recursos Biológicos destinados a preservar e autenticar os materiais biológicos depositados, com os devidos controles de qualidade, baseados nos regulamentos pertinentes estabelecidos pela OECD, WFCC e ECCO (*European Culture Collections Organization*; Organização Européia de Coleções de Culturas). Dentre as coleções de culturas internacionais que têm buscado excelência na qualidade, destacam-se: Coleção Alemã de Microrganismos e Células (DSMZ), Coordenação Belga de Coleções de Microrganismos (BCCM/LMG), Coleção Americana de Culturas Tipo (ATCC), Coleção de Culturas do Reino Unido (UKNCC), entre várias outras (JANSSENS et al., 2010; STACKEBRANDT, 2010). No Brasil, o incentivo para a expansão de Centros de Recursos Biológicos resultou na formação de dois sistemas de informação de coleções de culturas: Sistema de Informação para Coleções de Interesse Biotecnológico (SICOL) e Rede de Recursos Genéticos Microbianos (EMBRAPA), esta última com a finalidade de promover a integração das coleções de microrganismos dispersas nas diferentes unidades da empresa.

2.6 SISTEMÁTICA E TAXONOMIA MICROBIANA

Sistemática e Taxonomia algumas vezes são considerados como termos sinônimos, mas o mais adequado é considerar a Taxonomia como parte da Sistemática. Segundo Sneath (1989), sistemática é o ramo da ciência que avalia a diversidade de organismos e suas relações, sendo a taxonomia um dos pilares deste estudo e responsável pela classificação, nomenclatura e identificação (SIMPSON, 1961; DAVIS; HEYWOOD, 1963; MAYR, 1969).

A fim de contribuir com os estudos de conhecimento da diversidade microbiana, a filogenia (relação evolutiva dos organismos), juntamente com a taxonomia, a qual lida com identificação (alocação de linhagens dentro de espécies),

classificação (criação de novas taxonomias) e nomenclatura dos microrganismos (VANDAMME et al., 1996), em conjunto, formam os pilares da sistemática de microrganismos e suas relações (MADIGAN et al., 2010).

Para os procariotos, a taxonomia desempenha um papel essencial e confiável para a descrição de espécies ambientais e clínicas (MOORE et al., 2010). Além disso, os sistemas de classificação permitem fornecer descrições adequadas de bactérias, arqueas e microrganismos eucarióticos, permitindo uma melhor compreensão da biodiversidade e sua relação com os diferentes ecossistemas (GEVERS et al., 2005).

Todas as diretrizes de nomenclatura de microrganismos encontram-se no Código de Nomenclatura de Bactérias, que consiste em colocar a caracterização em uma estrutura hierárquica e em descrever, respeitando o sistema binomial, o táxon de um microrganismo (LAPAGE et al., 1992). Para Tindall e colaboradores (2010), os três elementos fundamentais (caracterização, classificação e nomenclatura) da taxonomia são domínios dinâmicos e dependentes. Assim, a nomenclatura de um grupo de organismos depende da forma como este está classificado, e a classificação depende da informação recolhida como resultado da caracterização. Diferente da nomenclatura que já apresenta regras estabelecidas pelo Código de Nomenclatura de Bactérias, a classificação e a caracterização não são formalmente reguladas, mas esforços dos pesquisadores estão sendo alocados nesse sentido nos últimos anos.

Sendo assim, a taxonomia é um elemento chave na sistemática que permite aos cientistas compreenderem a biodiversidade e a relação entre os microrganismos de diferentes ecossistemas (GEVERS et al., 2005). Ou, ainda, segundo THOMPSON et al., (2014), a taxonomia tem como objetivo fornecer um quadro confiável para a identificação de organismos, a fim de aprender sobre seu papel funcional em um determinado ambiente.

Inicialmente, as bactérias foram classificadas com base em marcadores fenotípicos como morfologia, fontes de nutrientes como fatores de crescimento ou potencial patogênico (LEHMANN; NEUMANN, 1986 *apud* in RAMASAMY et al., 2014). Depois, propriedades físicas e bioquímicas também foram utilizadas com o propósito de auxiliar na identificação e classificação dos microrganismos (ORLA-JENSEN, 1909; BUCHANAN, 1955).

No início da década de 1960, bacteriologistas iniciaram estudos de diversidade com base em características morfológicas, nutricionais e metabólicas (GRAHAM, 1964; MANNETJE, 1967; MOFFET; COLWELL, 1968), sorológicas (GRAHAM, 1963; VINCENT; HUMPHREY, 1970). O conjunto dessas análises formou os pilares da denominada “Taxonomia Numérica”. Também chamada de Fenética, a taxonomia numérica consiste em classificar os microrganismos por similaridade ou dissimilaridade fenotípica, utilizando o máximo de características possíveis, mesmo que o processo não reflita exatamente a ancestralidade comum (FUTUYMA, 2009).

Entre 1960 e 1980, as técnicas de quimiotaxonomia (MINNIKIN et al., 1975), taxonomia numérica e hibridização foram utilizadas (BRENNER et al., 1969; JOHNSON, 1991). Pelo fato dos sistematas se basearem em testes fenotípicos e morfológicos, o aumento na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e, muitas vezes, artificiais foi inevitável. Em alguns tipos de microrganismos, como por exemplo, os rizóbios, os genomas dessas bactérias podem perder ou ganhar plasmídeos ou ilhas genômicas contendo genes que regulam a capacidade metabólica. Por conseguinte, a realização de testes fenotípicos, principalmente para a utilização de carbono e nitrogênio, pode não ser tão informativa para a taxonomia de bactérias fixadoras de nitrogênio (ORMEÑO-ORRILLO E MARTINEZ-ROMERO, 2013).

Por volta de 1965, iniciaram as tentativas das análises de diversidade com base em características de DNA (DE LEY; RASSEL, 1965). Com os avanços na biologia molecular, principalmente com o advento da amplificação do DNA e técnicas de sequenciamento, em particular o gene 16S rRNA, foi possível obter grandes avanços nos estudos de taxonomia, facilitando a classificação das bactérias (GURTLER; MAYALL, 2001; COENYE; VANDAMME, 2004; KONSTANDINIDIS; TIEDJE, 2007). Woese e Fox (1977) demonstraram a utilidade do RNA ribossomal da subunidade menor do ribossomo (16S e 18S) como marcador filogenético universal. E, no início dos anos 90, estudos com base nas sequências de DNA revelaram que os cinco reinos não apresentavam cinco linhas evolutivas, em vez disso, que a vida evoluiu na Terra ao longo de três linhagens primárias compostas por três domínios: Bacteria, Archaea e Eukarya, elucidando a “Árvore Filogenética Universal” (WOESE et al., 1990).

Assim, com o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento molecular, a ideia inicial de Zuckerkandl e Pauling (1965) de deduzir a história filogenética dos organismos pela comparação das estruturas primárias das macromoléculas tornou-se aplicável. Mais de 90% das bactérias descritas no Manual de Bergey's foram reduzidas a poucas espécies na lista de nomes de bactérias aprovadas (SKERMAN et al., 1980; THOMPSON et al., 2013). Dá-se início, então, à sistemática filogenética ou "Cladística", escola de classificação biológica baseada no fundamento de que os organismos devem ser classificados de acordo com as suas relações evolutivas, não importando o grau de semelhanças entre os indivíduos (RIDLEY, 2006).

Todo esse esforço no campo científico no intuito de classificar e descrever os microrganismos culminou em um termo denominado "Taxonomia Polifásica" (COLWELL, 1970; VANDAMME et al., 1996). Essa abordagem polifásica da taxonomia microbiana emprega combinações de análises de características fenotípicas, bioquímicas e genotípicas.

Atualmente, a taxonomia encontra-se em estado de mudanças contínuas. Com o avanço nas metodologias de sequenciamento do DNA, em meados dos anos 90, chegando ao genoma completo, foi possível iniciar uma nova era na taxonomia microbiana, com a possibilidade estabelecer relações sistemáticas com base nas informações genéticas contidas nos genomas (THOMPSON et al., 2013; CHUN; RAYNEY, 2014). Nesse sentido, diversos esforços nessa área vêm sendo realizados com o intuito de integrar dados genômicos, a fim de auxiliar na classificação e descrição de microrganismos, de forma confiável e reproduzível, com um tempo e custo menor para pesquisa (KURTZMAN, 2014; RAMASAMY et al., 2014; VANDAMME; PETERS, 2014).

2.7 TAXONOMIA POLIFÁSICA

O conceito de espécie para organismos Eucariontes não se aplica para representantes de Bacteria e Archaea, pois parte de uma definição muito artificial para os microrganismos representantes desses dois últimos domínios. Se o critério utilizado para definir espécie em procariotos fosse aplicado em animais, logo todos os primatas deveriam ser classificados como espécie única (WHITMAN et al., 1998). Portanto, do ponto de vista teórico, não há um consenso universal que seja

baseado em um conceito para a definição de espécies em procariotos. Ainda assim, os microbiologistas sugeriram um conceito para as espécies procarióticas, onde o foco do sistema de caracterização se concentra em estabelecer, de uma forma rápida, confiável e reproduzível a localização taxonômica das bactérias baseada na evolução microbiana (THOMPSON et al., 2013).

De acordo com a abordagem polifásica, Vandamme e colaboradores (1996) definiram espécie de bactérias como um conjunto de isolados originados de uma população ancestral comum, em que uma geração constante de diversidade genética resultou em clones com diferentes graus de recombinação e caracterizados por consistência fenotípica, grau significativo de hibridização DNA-DNA (DDH) e mais de 97% de similaridade em relação à sequência do gene 16S RNA. Já em 2006, Stackebrandt e Ebers definem que uma espécie de bactéria é um grupo de estirpes (incluindo a tipo) com >70% de similaridade na hibridização DNA-DNA (DNA-DNA *Hybridization*, DDH), $< 5^\circ \text{C } \Delta T_m$, $< 5\%$ mol G + C da diferença total no DNA genômico e identidade $> 98\%$ para o gene 16S rRNA. Atualmente, em síntese, uma espécie procariótica é definida operacionalmente como um conjunto de linhagens que compartilham alto grau de similaridade em várias características independentes (MADIGAN et al., 2010).

Sendo assim, a diversidade biológica não pode ser analisada através de uma única molécula e a variabilidade das características é grupo-dependente. Nesse sentido, a integração de dados fenotípicos (características morfológicas e fisiológicas), bioquímicos e genéticos (hibridização DNA-DNA, proporção de G+C genoma, MLSA – *Multilocus Sequence Analysis*, ANI – *Average Nucleotide Identity*, AAI – *Average Aminoacid Identity*, Sequenciamento genômico) é de fundamental importância para a caracterização dos táxons de um organismo (THOMPSON et al., 2013; RAMASAMY et al., 2014; VANDAMME; PETERS, 2014).

Contudo, segundo Sneath (1989), não existe, necessariamente, uma relação direta de dados filogenéticos e fenotípicos, pois nem sempre sequências de DNA (utilizadas para filogenia) são transcritas e traduzidas durante o processamento da informação genética.

2.7.1 ANÁLISE FENOTÍPICA

Os métodos fenotípicos têm como objetivo descrever características físicas de microrganismos, como morfologia, motilidade, metabolismo e fisiologia (TINDALL et al., 2010). Além destes, a análise da composição química das células (ácidos graxos) foi também incluída como parte da caracterização fenotípica (SMIBERT; KRIEG, 1994; TINDALL et al., 2010).

2.7.2 ANÁLISE GENOTÍPICA/ FILOGENÉTICA

Depois da elucidação da molécula de DNA e do código genético, diversos critérios genotípicos/filogenéticos passaram a ser utilizados na taxonomia polifásica de procariotos (TINDALL et al., 2010). A filogenia permitiu aproximar todos os ramos da biologia e, assim, auxiliar na resolução de algumas questões, como por exemplo, estabelecer relações entre espécies e genes, explicar a origem/disseminação da infecção de alguns vírus e auxiliar na compreensão migração/mudança demográfica de algumas espécies padrão (YANG; RANNALA, 2012). Desse modo, os dados filogenéticos complementam as informações fenotípicas e genotípicas e permitem que os organismos sejam posicionados em um sistema de classificação, com base em relações evolutivas.

2.7.2.1 BOX-PCR

Elementos de DNA repetitivos são encontrados tanto em genomas eucarióticos (elementos Alu), como em procarióticos (unidades palindromicas) (Versalovic et al., 1991; Martin et al., 1992). Em procariotos existem diferentes classes de elementos de DNA repetitivo, sendo duas localizadas em regiões intergênicas (ERIC e BOX) e outra classe corresponde aos elementos REP, localizados em regiões extragenicas do cromossomo da bactéria.

Elementos Repetitivos Extragênicos Palindromicas—REP—apresentam, comprimento de, aproximadamente, 35-40 pares de bases (pb) de nucleotídeos, com número de 500 - 1000 cópias no genoma de bactérias. A segunda classe corresponde às Unidades Repetitivas Intergênicas ou *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* – ERIC, com comprimento de 124 – 127 pb e

número de cópias que podem variar de 30 – 5 em *Escherichia coli*, podendo chegar até 150 em *Salmonella typhimurium*. A última classe de sequências repetitivas no genoma bacteriano compreende os elementos BOX. Estes são compostos por três subunidades (boxA, boxB e boxC), com comprimento de 57, 43 e 50 nucleotídeos, respectivamente (MARTIN et al., 1992). A subunidade boxA é a mais conservada, quando comparada com as subunidades boxB e boxC, entre as bactérias (VERSALOVIC et al., 1994).

As sequências repetitivas em procariotos estão localizadas em regiões não codificantes de DNA e estudos demonstram que estes elementos repetitivos estão relacionados com a formação da haste alça durante o processo transcricional da informação genética celular. Diversas funções foram relatadas às unidades palindrômicas, como por exemplo, ligação da enzima DNA girase (YANG; AMES, 1988) e DNA polimerase I (GILSON et al., 1990), estabilização do gene durante o processo de transcrição (NEWBURY et al., 1987).

A metodologia de BOX-PCR permite a amplificação de diferentes fragmentos genômicos por PCR e tem como iniciador o oligonucleotídeo BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), que origina padrões de bandas distintos em linhagens diferentes fornecendo, assim, um *fingerprint* do perfil de DNA. Desse modo, o método BOX-PCR é considerado uma técnica sensível e muito utilizada em estudos iniciais de caracterização genética de isolados bacterianos.

2.7.2.2 SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA

O sequenciamento e a análise filogenética do gene 16S rRNA têm sido adequados para a classificação de procariontes, por esse gene ser onipresente, funcionalmente estável, altamente conservado e pouco sujeito à transferência horizontal entre os microrganismos (RAMASAMY et al., 2014). Apesar da grande importância que a análise do gene ribossomal 16S rRNA apresentou para os avanços em estudos de filogenia (WOESE; FOX, 1977; WOESE et al., 1990), existem algumas implicações em seu uso para descrever espécies: *i)* O gene 16S rRNA é altamente conservado, particularmente em algumas espécies, como por exemplo, no gênero *Brucella* (GÁNDARA et al., 2001); *ii)* Presença de variações nucleotídicas em vários operons de rRNA em um único genoma (RAINEY et al., 1996; ACINAS et al., 2004); *iii)* Possibilidade do gene 16S rRNA adquirir

sequências nucleotídicas via transferência horizontal de genes (THG) e, assim, distorcer as relações evolutivas na árvore filogenética (FOURNIER; RAOULT., 2009); e *iv*) Variabilidade em número de cópias, que nem sempre são idênticas em espécies de bactérias (HAUKKA et al., 1996; VĚTROVSKÝ; BALDRIAN, 2013).

A taxonomia polifásica, porém, inclui o gene ribossomal 16S rRNA como uma das medidas de relação evolucionária, combinada com as propriedades fenotípicas e genotípicas, para determinar a posição filogenética de um isolado (COLWELL, 1970; STACKEBRANDT et al., 2002; TINDALL, 2010; THOMPSON et al., 2014). Deve-se ressaltar que apenas as sequências do gene 16S rRNA não descrevem uma espécie, mas podem fornecer o primeiro indício de que uma nova espécie foi isolada (TINDALL et al., 2010).

As características consideradas para o agrupamento de estirpes em uma espécie incluem a identidade de 98,7% - 99% de sequência do gene 16S rRNA que possam ser utilizados em algumas espécies com baixa variabilidade nesse gene (STACKEBRANDT; EBERS, 2006). Contudo, valor de identidade de 97% da sequência do gene 16S rRNA também pode ser considerada para o agrupamento de estirpes em uma espécie (TINDALL et al., 2010).

2.7.2.3 HIBRIDIZAÇÃO DNA-DNA

O desenvolvimento da técnica de hibridização de ácidos nucleicos (DDH, DNA-DNA *Hybridization*), aliada ao sequenciamento do gene 16S rRNA permitiu revelar diferenças entre os genomas de dois organismos muito similares. A técnica de hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA foi introduzida em sistemática procariótica na década de 1960 (MCCARTHY; BOLTON, 1963; DE LEY et al., 1966; JOHNSON; ORDAL, 1968; PACE; CAMPBELL, 1971; PALLERONI et al., 1973) e, até hoje, é utilizada para estimar a relação genética entre microrganismos, sendo considerada padrão de ouro para diferenciar espécies procarióticas (WAYNE et al., 1987).

Estudos indicam que, quando as bactérias compartilham mais de 97% de similaridade com base no gene 16S rRNA, isso corresponde ao valor de 70% de hibridização DNA-DNA (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; TINDALL et al., 2010). O uso da técnica de DDH é recomendado quando o novo táxon proposto contém mais do que uma estirpe, demonstrando que todos os membros desse grupo

devem apresentar elevado grau de hibridização entre si. Recomenda-se, ainda, que apenas estirpes que apresentem diferença de temperatura de *melting* (ΔT_m) de 5° C, ou menos, devem ser incluídas (TINDALL et al., 2010). Valores de $\leq 70\%$ na hibridização DNA-DNA, embora haja algumas exceções, indicam que as bactérias testadas pertencem a diferentes espécies (ROSSELLÓ – MORA, 2006; TINDALL et al., 2010; VANDAMME; PETERS, 2014).

Entretanto, conforme demonstrado por Tindall et al., (2010), o DDH apresenta algumas limitações: *i*) O valor de corte de $\leq 70\%$ não é aplicável a todos os organismos, como é o caso para muitas espécies de *Rickettsia* (FOURNIER; RAOULT, 2009); *ii*) A determinação de DDH requer instalações especiais, o que limita o número de laboratórios aptos para esta técnica; e *iii*) É um método oneroso e que carece de reprodutibilidade.

2.7.2.4 ANI – AVERAGE NUCLEOTIDE IDENTITY

A correlação entre a identidade nucleotídica média e os valores de DDH foi demonstrada, pela primeira vez, por Konstantinidis e Tiedje (2005), como uma técnica robusta e eficiente para mensurar distâncias evolutivas entre dois organismos. Em 2007, Goris e colaboradores refinaram essa metodologia, que tem sido utilizada até os dias atuais. O ANI é calculado como uma média de identidade total do BlastN (ALTSCHUL et al., 1990), onde são considerados os organismos que apresentarem pelo menos diferença de 30% nas sequências genômicas.

Kim e colaboradores (2014b) avaliaram 6.787 genomas pertencentes a 22 Filos com o objetivo de verificar qual o nível de semelhança do gene 16S rRNA, que corresponde ao limiar do ANI. Eles observaram, através de testes estatísticos, que o valor de 98,65% pode ser considerado como limite para diferenciar duas espécies. Esse valor é consistente com sugestões anteriores (98,2% - 99%) derivadas de estudos comparativos de DDH e 16S (STACKEBRANDT; EBERS, 2006).

2.7.2.5 MLSA – MULTILOCUS SEQUENCE ANALYSIS

Diversos fatores podem oferecer informação equívoca entre estirpes bacterianas e, assim, ofuscar a estrutura da árvore filogenética (GEVERS et al.,

2005; MENNA et al., 2006). Com o intuito de minimizar esses efeitos, marcadores baseados em genes com taxa evolutiva mais rápida que o 16S rRNA, porém conservados o suficiente para reter informações genéticas, têm sido propostos como uma alternativa de marcadores moleculares utilizados em estudos de filogenia (MARTENS et al., 2007). Até o presente momento, o MLSA representa a resolução intermediária para resolver os problemas filogenéticos apresentados nas análises de hibridização e do gene 16S rRNA. O MLSA foi desenvolvido com base na análise de MLST (*Multilocus Sequence Typing*), que teve grande impacto na microbiologia clínica, sendo muito utilizado na diferenciação de linhagens de patógenos em estudos epidemiológicos (MAIDEN et al., 1998). Segundo Gevers et al (2005) a diferença das técnicas consiste que na metodologia de MLSA são utilizados grupos de linhagens representativas de um gênero, sendo utilizados procedimentos de análise filogenética, ou seja, algoritmos programados para calcular a taxa evolutiva com base na sequência de nucleotídeos de genes (alelos) que estejam presentes em todas as linhagens do táxon em estudo enquanto o MLST está focado apenas no grau de similaridade entre as sequências.

O MLSA utiliza o sequenciamento e alinhamento de vários genes *housekeeping* diferentes de um organismo, dispersos em pelo menos 100 kb do genoma, comparando suas sequências a sequências dos mesmos genes de linhagens diferentes do mesmo organismo (GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2007; MARTENS et al., 2008). Com o alinhamento múltiplo de genes não relacionados funcionalmente, é possível obter-se uma amostra do genoma, a qual é mais representativa que um único gene, permitindo, também, a detecção de ocorrência de transferência horizontal de genes, sendo tais genes excluídos das considerações adicionais (MADIGAN et al., 2010). Contudo, a escolha dos genes *housekeeping* utilizados em estudos de filogenia deve seguir alguns pré-requisitos: possuir apenas uma cópia no cromossomo, estar amplamente distribuído de forma conservada no táxon (STACKEBRANDT et al., 2002; THOMPSON et al., 2005) e, no mínimo, três genes são necessários para a concatenação das sequências obtidas de DNA (DALL'AGNOL et al., 2013).

O potencial desse método na definição de espécie bacteriana foi fortemente apoiado pelo comitê *ad hoc* Internacional de Sistemática de Procariotos (STACKEBRANDT et al., 2002), sendo hoje considerada técnica “padrão de ouro” para caracterização de estirpes de bactérias em uma espécie. O MLSA tem sido

utilizado com sucesso na classificação e identificação de diversos táxons (RIBEIRO et al., 2009, 2012, 2013, 2015; DALL'AGNOL et al., 2013, 2014).

A análise de sequências baseadas no MLSA é considerada uma abordagem essencial para a resolução de alguns problemas taxonômicos. Assim, a concatenação dos genes *housekeeping* resulta em uma filogenia sólida, contribuindo com estudos de sistemática microbiana. Deve-se ressaltar que os genes localizados no DNA acessório (plasmídeo) não são considerados excelentes marcadores de estudos taxonômicos, uma vez que são especializados para adaptação ecológica sendo, portanto, adquiridos de forma independente e que poderiam ter evoluído separadamente (MARTENS et al., 2008; STACKEBRANDT et al., 2002; VINUESA et al., 2008, 2010; MOUSAVI et al., 2014).

2.7.2.6 TEOR DE G + C

As proporções de G (guanina) + C (citosina) em um DNA são bastante úteis na identificação e descrição de espécies de bactérias (TINDALL et al., 2010). Quando as proporções de G + C de dois organismos diferem em mais de 5%, considera-se, geralmente, que estes compartilharão poucas sequências de DNA, logo, não são estreitamente relacionados na mesma espécie (GOODFELLOW et al., 1997; RAMASAMY et al., 2014). As proporções de G + C podem variar de 20% a 80 % entre os domínios Bacteria e Archaea e, em Eucariotos, esse valor pode ser maior ainda (MADIGAN et al., 2010).

3 BIODIVERSIDADE EM ESTUDOS CONDUZIDOS EM DIVERSAS REGIÕES DO MUNDO E OS FATORES QUE PODEM LEVAR À ESPECIAÇÃO DE RIZÓBIOS

Em diferentes regiões do mundo, trabalhos têm demonstrado diversidade de rizóbios capazes de nodular plantas de feijoeiro, por exemplo, Aserse et al., (2012), Cao et al., (2014), Ribeiro et al., (2013), Bagynski et al. (2015). A relação entre a diversidade de cada local e a seleção de microssimbiontes eficientes para a planta hospedeira, porém, não está bem estabelecida. Do ponto de vista filogenético, estirpes de rizóbio–feijoeiro podem coexistir em um sítio e múltiplas espécies podem nodular simultaneamente a planta. Embora as estirpes possam ser resultado da baixa recombinação e clonalidade de alguns grupos de rizóbios (ACOSTA et al., 2011), a planta desempenha também um papel relevante na seleção de diferentes espécies. Isso levanta uma interessante questão, sobre quem determina a abundância de uma determinada linhagem.

Segundo Junier et al. (2014), se for considerado que a seleção ocorre principalmente devido a fatores associados à planta, é esperado que plantas geneticamente relacionadas crescendo em solos com diferentes propriedades apresentem comunidade simbióticas semelhantes. Por outro lado, se for considerado que a seleção é determinada pela composição inicial de rizóbios na comunidade, as populações simbióticas de plantas crescidas em diferentes solos devem ser distintas. Pesquisas vêm sendo realizadas com base nesses dois cenários. Em alguns casos, a elevada abundância de um genótipo de rizóbio em nódulos de uma planta hospedeira resulta da elevada abundância desse rizóbio no solo (BROMFIELD et al., 1995; HARTMANN et al., 1998; VELAZQUEZ et al., 1999). Porém, em outros casos, a abundância de diferentes genótipos no solo não coincide com a frequência dos microssimbiontes na população (LEUNG et al., 1994).

Bagynski e colaboradores (2015) avaliaram a diversidade e distribuição da população nativa de rizóbios, no Chile, em regiões (de solo ácido e alcalino) produtoras de feijão. Dos 240 isolados de nódulos os autores detectaram a presença de quatro espécies (*R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. tropici* e *R. leucaenae*). O interessante é que, até então, somente *R. leguminosarum* havia sido documentado nodulando plantas de feijoeiro no Chile. Os resultados permitiram observar que espécies de *R. tropici* e *R. leucaenae* foram as mais comuns em solos ácidos, enquanto que as de *R. etli* foram mais comum em solos alcalinos com

maiores níveis de teor de matéria orgânica. Estirpes de *R. leguminosarum* foram identificadas praticamente em todos os solos, com pH que variaram entre 5,3 e 8,2 e com teor de matéria orgânica entre 2,1 e 4%, além de esta ser a estirpe mais diversa geneticamente. Ainda, os autores relacionaram alguns fatores que explicam, pelo menos parcialmente, a distribuição de *R. leguminosarum* em diferentes regiões do Chile. São eles: *i*) há uma variedade de feijoeiros de onde os nódulos foram extraídos que, provavelmente, correspondem à variedade de ecotipos de rizóbios encontrados; *ii*) a heterogeneidade dos solos, com variações de matéria orgânica (2.3-6.3%), níveis de pH entre 5.2-8.2%, que podem influenciar no desenvolvimento, sobrevivência e formação do nódulo.

Nesse sentido, Cao e colaboradores (2014), na China, observaram que plantas de feijoeiro têm participação na seleção de novos microssimbiontes, adaptados às condições locais. Concluindo que plantas de feijoeiro têm dirigido a evolução do rizóbio, permitindo a nodulação das plantas e adaptação das bactérias às condições locais, principalmente pH do solo e disponibilidade de nutrientes (CAO et al., 2014). Segundo, Faghire et al., (2012), a condição extrema do ambiente pode conduzir os rizóbios a desenvolverem mecanismos de adaptação frente a uma alteração ambiental, como por exemplo, acúmulo de solutos intracelulares (trealose e glutamato) compatíveis para a resistência de alta salinidade. O solo, quando em condições elevadas de salinidade, pode afetar a simbiose entre plantas e leguminosas. Quando os rizóbios são submetidos a esse ambiente, tem-se observado acúmulo de trealose (MILLER; WOOD, 1996), onde esse dissacarídeo desempenha papel importante na adaptação das bactérias às condições de estresse osmótico (MCINTIRE et al., 2007).

As estirpes podem também ser selecionadas pelo ambiente. Esse é o caso, por exemplo, das espécies *R. tropici*, *R. leucaenae*, *R. paranaense* e *R. freirei*, que são encontradas, no Brasil, predominantemente em solos com pH baixo. Embora não haja um consenso sobre características do solo determinem a presença ou ausência de espécies de rizóbios no ambiente (MARTINEZ-ROMERO, 2003). Alguns resultados são plausíveis para essa observação. Por exemplo, *i*) Brockweel et al., (1991) relataram diminuição de 10^{-3} na população de *Sinorhizobium meliloti* em solos com pH < 6.0 quando comparados com aqueles > 7.0, observando que o pH do solo pode afetar a sobrevivência e manutenção da população de rizóbios; *ii*) A exudação de compostos flavonoides para a indução dos genes *nod* de *R.*

leguminosarum bv *trifolii* foi reduzida quando as plantas foram crescidas em pH < 5.0 afetando, também a competitividade dos rizóbios por nodulação (Begum et al., 2001); *iii*) Mckay e Djordjevic (1993) observaram alterações na produção e excreção dos fatores de nodulação em estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* quando em pH baixo; *iv*) Anyango e colaboradores (1995) mostraram que as populações de rizóbios de feijoeiro da região oriental da África (Quênia), de um solo ácido (pH 4,5) e outro solo com pH 6,8 (neutro) apresentaram resultados semelhantes em eficiência da FBN, porém, diferiram quanto à composição genética.

Os solos de regiões tropicais, a maioria tem desenvolvido a partir de formações geológicas antigas que, em adição às condições climáticas, resultam em solos intemperizados, onde a disponibilidade de nutrientes é usualmente baixa. O pH baixo do solo está, frequentemente, associado com o aumento do Al, toxicidade de Mn e diminuição de Ca (Hungria e Vargas, 2000). A acidez pode afetar a relação hospedeiro-planta no processo de FBN em diversas etapas. Ainda, Andrade et al., (1999) relataram que à medida que a saturação de Al no solo diminui há um aumento no tamanho e na diversidade da população de rizóbios nativos em solos ácidos brasileiros. Segundo Nicol et al. (2008) há uma forte evidência de que o pH do solo é um fator determinante na diversidade de bactérias e na estrutura da comunidade em escala global, além de ser considerado um dos fatores responsáveis por influenciar na comunidade microbiana e nos processos bioquímicos do solo. Tem sido sugerido que a resiliência de rizóbios em solos ácidos reside na capacidade dessas bactérias manter o pH intracelular em torno de 7.2-7.5 independente do pH externo (GRAHAM et al., 1994). A tolerância de bactérias pertencentes ao grande grupo “*tropici-leucaenae-freireii*” para baixo pH poderia explicar a alta frequência destas linhagens em solos ácidos da América Central, Brasil e África (HUNGRIA; VARGAS, 2000). Nesse sentido, estirpes pertencentes a este grande grupo apresentam propriedades de interesse para a agricultura brasileira, como estabilidade genética e tolerância a estresses ambientais (RIBEIRO et al., 2012).

A capacidade de decomposição dos rizóbios é um dos fatores bióticos que podem garantir vantagens evolutivas aos rizóbios conduzindo os á especiação. Os rizóbios apresentam elevada capacidade de decomposição, o que lhes permite crescer em diversas condições do solo. A habilidade dos rizóbios em decompor diversos materiais é observada quando estes são utilizados na biorremediação de compostos, como por exemplo, dibenzotiofeno (FRASSINETTI et

al., 1998), benzopireno (GONZÁLEZ-PAREDES et al., 2013), tolueno (SUOMINEN et al., 2000) e fenantreno (KEUM et al., 2006). Neste contexto, em solos contaminados com petróleo, na província de Shandong na China, Zhang e colaboradores (2012) isolaram uma nova espécie levando a descrição *R. petrolearium*, que degrada fenantreno. Análises de genomas de rizóbios revelaram que esses microrganismos apresentam elevado número de transportadores e outros genes com função desconhecida e que muitos provavelmente estão envolvidos no processo de decomposição em uma gama de substâncias químicas ou naturais presentes na rizosfera. Estudos de transcriptoma de raízes revelaram que muitos genes de rizóbios podem ser importantes na assimilação de substâncias da raiz ou do solo. Assim, a capacidade dos rizóbios degradarem diferentes compostos evita a concorrência bacteriana por competição de nutrientes. E esse diferencial, do ponto de vista evolutivo, conduz as bactérias para o processo de especiação de rizóbios na população e, também, de variação intraespecífica dos microrganismos refletindo, assim, a diversidade genética.

Em relação ao fator genético, a variação no genoma de organismos estreitamente relacionados está associada às interações ecológicas. Essas interações criam pressões seletivas dependentes que podem estabilizar frequências gênicas nas populações, ou promover volume gênico rápido em uma população. Nesse sentido, a diferenciação de uma população pode emergir de diferentes processos naturais. A seleção natural é um forte candidato para a evolução de *clusters* que habitam a mesma região que se dispersam muito rápido (especiação simpátrica). Nesse contexto, a especiação simpátrica é a divergência genética de várias populações que habitam a mesma região geográfica, de modo que essas espécies se tornem espécies diferentes (CORDERO; POLZ, 2014).

A deficiência hídrica é um fator abiótico que pode afetar a sobrevivência, crescimento e a estrutura da população de rizóbios no solo (HUNGRIA; VARGAS, 2000), sendo um dos fatores que mais interferem na FBN, refletindo em alterações na infecção dos pelos radiculares, inibição da diferenciação do bacteroide, alteração e funcionamento dos nódulos e, conseqüentemente, diminuição do conteúdo de N fixado na parte aérea das plantas (DANIEL et al., 2007; TAJINI et al., 2012, FERREIRA et al., 2013). Além disso, há evidências de grande variabilidade genética entre estirpes de rizóbio em resposta ao stress hídrico (RENNIE; KEMP, 1983).

Para o fator temperatura, a maioria das leguminosas apresenta temperatura ótima para nodulação e funcionamento da FBN que se situa entre 20-30° C (FERREIRA et al., 2013). Para o crescimento de rizóbios, apesar de variar de espécie para espécie, limites de temperatura foram observados variando de 32 a 47° C (PANKHURST; GIBSON, 1973; GIBSON, 1975; DART et al., 1976; DAY et al., 1978). Em condições tropicais, considerando-se que o feijoeiro é bastante sensível (GRAHAM, 1981), a temperatura do solo nas camadas mais superficiais pode chegar, com frequência, a 38°C e solos expostos a elevadas temperaturas podem promover alterações fisiológicas e genéticas em bactérias, incluindo deleção plasmidial (TREVOR, 1986) e rearranjos genômicos (SÓBERON-CHAVEZ et al., 1986). Além de interferir em vários aspectos da simbiose, como por exemplo, na formação de pelos radiculares, penetração das bactérias, nodulação e atividade da nitrogenase (NEHRA et al., 1997). Contudo, deve se ressaltar que há diferenças quanto à tolerância a altas temperaturas entre cultivares de feijoeiro (PORCH, 2006; STEFANOVA et al., 2011) e entre espécies de rizóbio que nodulam essa planta (MERCANTE et al., 1993; PINTO et al., 1998).

Assim, diversos fatores podem afetar a dinâmica populacional, conduzindo à variabilidade genética que podem ou não resultar em processo evolutivo levando ao surgimento de novas espécies de rizóbios. Esses fatores são divididos em bióticos, como a competição das estirpes de rizóbios nativas do solo e a capacidade de decomposição e fatores abióticos, dentre os quais: textura do solo (AL-FALIH, 2002), fertilidade do solo, estresse hídrico e temperaturas elevadas (FERREIRA et al., 2013). Segundo Hungria e Vargas (2000), as condições ambientais extremas podem resultar em alterações genéticas em rizóbios (como deleção plasmidial e rearranjos genômicos), além de afetar diversas etapas da simbiose e a diversidade genética dessas bactérias.

Estudos de caracterização genética de rizóbios e de ecologia microbiana são importantes não só para ter acesso ao conhecimento da biodiversidade existente nos solos brasileiros, como também para a elaboração de estratégias bem sucedidas na inoculação, além de serem indicativos das condições do solo. Segundo Lindstrom et al., (2010), a diversidade genética pode desempenhar função de bioindicador das condições do solo, uma vez que rizóbios nativos são afetados pela acidez do solo, temperatura, umidade entre outros fatores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM

As amostras de solo foram coletadas em 45 locais produtores de feijão, procedentes de lavouras que não haviam recebido inoculante, pertencentes a 22 municípios do estado de Mato Grosso do Sul (Tabela 1). Os isolados de rizóbio foram obtidos de nódulos de plantas de feijoeiro, cultivar Carioca, crescidas em vasos de “Leonard” (VINCENT, 1970). Cada vaso, contendo uma mistura de areia e vermiculita (2:1, v:v) foi esterilizado e, posteriormente, inoculado com 50 g de solo puro coletado das diversas regiões tradicionalmente produtoras dessa leguminosa em Mato Grosso do Sul.

Tabela 1 - Municípios, números de locais amostrados para coleta de solo e os respectivos isolados.

Municípios	Nº de locais amostrados	Isolados	Municípios	Nº de locais amostrados	Isolados
1. Amambai	2	CPAO 1.1F; 6.2F; 5.2F; 3.4F; 2.2F; 5.1F	12. Itaporã	4	CPAO 27.4F3
2. Angélica	1	CPAO 7.2F; 7.5F	13. Itaquiraí	3	CPAO 55.4F
3. Bataguassu	2	CPAO 11.5F; 13.3F; 10.1F; 11.1F; 13.2F; 13.5F	14. Ivinhema	1	CPAO 56.3F
4. Bataiporã	2	CPAO 17.5F; 16.4F; 21.2F; 21.3F; 16.3F	15. Laguna Caarapã	3	CPAO 33.9F3; 34.4F3; 33.3F3; 35.5F3; 35.2F3; 33.12F3; 33.1F3; 33.5F3
5. Deodópolis	2	CPAO 26.6F; 26.5F; 22.5F; 22.2F;	16. Maracaju	2	CPAO 41.1F3; 41.12F3; 39.10F3; 41.9F3; 41.7F3; 39.4F3
6. Douradina	2	CPAO 2.7F3	17. Mundo Novo	2	CPAO 65.4F; 66.5F; 64.4F; 66.3F
7. Dourados	3	CPAO 7.3F3; 14.5F3; 8.1F3; 8.2F3; 60.2F3; T6.4F3; 59.3F3; T6.1F3; 100.4F; 68.10F3; 68.11F3; T4.4F3	18. Naviraí	1	CPAO 67.1F; 67.4F;
8. Eldorado	2	CPAO 29.10F; 33.4F; 29.2F; 29.5F	19. Nova Andradina	1	CPAO 70.4F
9. Fátima do Sul	3	CPAO 42.4F; 42.3F;	20. Novo Horizonte do Sul	2	CPAO 73.4F; 75.5F
10. Glória de Dourados	1	CPAO 43.3F	21. Ponta Porã	2	CPAO 82.1F; 84.1F;
11. Iguatemi	1	CPAO 48.5F	22. Rio Brillhante	3	CPAO 50.9F3

Fonte: Do autor.

Sementes de feijão foram cultivadas nestes vasos de “Leonard” e, após 35-40 dias da germinação, as plantas foram coletadas, e os nódulos separados para o isolamento das bactérias. Para o isolamento das estirpes de

rizóbio, os nódulos foram esterilizados superficialmente com álcool, seguido por solução de hipoclorito de sódio (10%) e água destilada e esterilizada. Os isolados obtidos foram purificados em meio “Yeast Mannitol Agar” – YMA (VINCENT, 1970) e depositados na “Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Agropecuária Oeste” e na “Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas”.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Setenta e três isolados de rizóbio obtidos de nódulos de feijoeiro foram recuperados em placas de Petri com meio de cultura YMA.

Para a construção da matriz binária e caracterização fenotípica (Figura 1), as características avaliadas (Tabela 2) com os respectivos critérios utilizados foram: 1) Manifestação do crescimento das colônias isoladas neste estudo (rápido- lento-intermediário e muito lento); 2) Alteração do pH no meio YMA com o indicador azul de bromotimol (ácido – neutro – alcalino); 3) Forma da colônia (oval – circular e irregular); 4) Elevação da colônia (plana-convexa); 5) Borda da colônia (lisa-ondulada-filamentosa); 6) Superfície da colônia (lisa-rugosa); 7) Produção de muco (pouca-moderada-abundante); 8) Consistência da massa de crescimento (seca-aquosa-gomosa-viscosa); 9) Detalhes ópticos (translúcido-opaco); 10) Cromogênese da colônia em meio YMA com indicador de Azul de Bromotimol (creme-amarelo-rosa-azul); e 11) Cromogênese da colônia em meio YMA com corante vermelho congo (branco-rosado-avermelhado no centro-vermelho).

Para a construção do dendrograma, as características fenotípicas foram submetidas à análise no programa Bionumerics-(Applied Mathematics Kortrijk, Belgium, versão 7.5), através do algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade de valores categóricos.

Tabela 2_ Manifestações das características morfológicas dos rizóbios avaliados.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	MANIFESTAÇÕES
Tempo de crescimento	Crescimento rápido (3 dias), intermediário (4 a 5 dias), lento (6 a 9 dias) e muito lento (acima de 10 dias)
Alteração do pH	Ácido (amarelo), neutro (verde) e alcalino (azul)
Tamanho	Medido em milímetros (mm)
Produção de muco	Pouco, moderado ou abundante
Consistência da colônia	Seca, aquosa, gomosa (creme) ou viscosa (elástica)
Forma da colônia	Oval (elíptica), circular ou irregular
Elevação da colônia	Plana ou convexa
Borda da colônia	Lisa, ondulada, ou filamentosa
Superfície da colônia	Lisa ou rugosa
Cromogênese em Azul de Bromotimol	Creme, amarelo, rosa ou azul
Cromogênese em Vermelho Congo	Branco, rosado, avermelhado (centro) ou vermelho
Detalhes ópticos	Translúcido ou opaco

Fonte: Do autor.

4.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

4.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA total foi extraído de bactérias crescidas em meio YM. A extração de DNA foi realizada com o *kit Axyprep Bacterial Genomic DNA*. Em seguida, para verificar a qualidade de DNA extraído, foi preparado gel de agarose a 0,3% com 30 mL de tampão TEB (Tris-EDTA). As amostras de DNA (2 µL) foram submetidas à eletroforese por 30 minutos a 60 voltz.

4.3.2 BOX- PCR

Os DNAs dos 73 isolados de rizóbio obtidos de nódulos de feijoeiro foram submetidos à amplificação de PCR de regiões repetitivas de DNA com o *primer* BOX-A1R (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3') (VERSALOVIC et al., 1994). A técnica de BOX – PCR foi realizada conforme o procedimento descrito por Kaschuk et al. (2006). As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador MJ Research Inc. PT 200.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel com 1.5% agarose, por 7 horas a 120 V. O marcador molecular utilizado foi de 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen™), sendo adicionado nas canelatas primeira, central e última. Os geis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz UV. Para a análise do perfil de bandas de DNA, utilizou-se o programa Bionumerics (Applied Mathematics Kortrijk, Belgium, versão 7.5), através do método UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973) e o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912). O tamanho dos fragmentos foi normalizado de acordo com o marcador de DNA e as análises foram submetidas com níveis de tolerância a 1,0 % e otimização 0,4%.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA

4.4.1 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S

Os DNAs genômicos de 35 isolados representativos dos principais grupos de BOX-PCR foram amplificados com os *prímers* fd1 5' (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e rd1 3' (AAGGAGGTGATCCAGCC). As condições de amplificação de PCR para o gene 16S rRNA foram descritas anteriormente (MENNA et al., 2006). As reações foram conduzidas no termociclador MJ Research Inc. PTC 200 e os produtos de PCR obtidos foram purificados com o *Purelink TM Quick PCR Purification Kit* da Invitrogen by Life Technologies™. Em seguida, as concentrações das amostras foram verificadas por eletroforese, com 2 µL do produto de PCR em cada canaleta, em gel de agarose e o gel foi corado com 1% de brometo de etídio.

As reações de sequenciamento foram realizadas em placas de PCR com 96 poços. Os produtos de PCR de cada bactéria receberam a alíquota de 3 µL

de *dye* para o sequenciador ABI 3500-XL (Applied Biosystems) e 3 pmol dos *primers* 362(5'CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG3'), 786(5'CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3') e 1203 (5'-GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC-3'), conforme descrito por Menna et al., 2006). O programa para a reação de sequenciamento foi: desnaturação a 95° C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95° C por 10 segundos, 50° C por 4 segundos e extensão a 60° C por 4 minutos, finalizando a 4° C. As amostras foram submetidas ao sequenciamento por capilaridade no sequenciador ABI 3500-XL, Applied Biosystems.

4.4.2 Gene 16S RNA

Dos 35 isolados sequenciados, foram selecionados aqueles com sequenciamento de, aproximadamente, 1000 pb e com similaridade com rizóbios. Sendo assim, para o alinhamento, foram escolhidas sequências de 16S rRNA de 18 isolados, em adição às sequências de rizóbios tipo obtidas do banco de dados (NCBI). As sequências foram alinhadas com o programa CLUSTAL_X. A árvore filogenética foi gerada utilizando o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013), com o algoritmo Neighbor Joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987), modelo de substituição Maximum Composite Likelihood ML (FELSEINSTEN, 1981), com bootstrap 1000x. O número de acesso das estirpes tipo se encontra entre parênteses em cada árvore gerada.

4.4.3 MLSA

Os *primers* e as condições de amplificação foram utilizados conforme trabalhos já descrito na literatura, para o *recA*-recombinase A (GAUNT et al., 2001), *glnII*-glutamina sintetase II (STEPKOVWSKI et al., 2005) e *gyrB*-gyrase B (MARTENS et al., 2008). Após a amplificação e sequenciamento para cada gene *housekeeping*, as sequências individuais e concatenada de 11 isolados para os genes *housekeeping* (*gyrB*, *glnII* e *recA*) foram alinhadas no CLUSTAL_X. As árvores filogenéticas individual e concatenada dos genes *housekeeping* foram construídas utilizando o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2011), através do método *Maximum Likelihood*, modelo de substituição Tamura-Nei, com bootstrap 1000 vezes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FENOGRAMA

Com base nas características fenotípicas avaliadas, foi construído um fenograma de similaridade com os 73 isolados que foram crescidos a 28° C e caracterizados de acordo com as suas propriedades morfológicas (Tabela 2). De acordo com a figura 2, constatou-se elevada diversidade fenotípica entre as bactérias. Considerando um nível de similaridade de 74%, foi observada a formação de seis grupos. Dentre estes, os Grupos I, II, III e IV apresentaram maior número de isolados, em comparação com os grupos V e VI. Os isolados CPAO T6.4F3, 66.5F, 42.3F, 2.2F, 1.1F, 66.3F e 39.4F3 ocuparam uma posição isolada no fenograma. Ao estabelecer relações entre os resultados da análise fenotípica e os respectivos locais de origem dos isolados, foi possível observar que os grupos formados foram bastante heterogêneos em relação aos seus municípios de origem (Tabela 1 e Figura 1).

Quanto à morfologia (Tabela 2), as características que não variaram entre os grupos dos isolados foram: manifestação de crescimento tendo como critério crescimento rápido (até 3 dias), borda e superfície da colônia, onde todas bactérias apresentaram morfologia lisa para essas duas últimas características. Resultados semelhantes foram observados para as bactérias que não se agruparam e que, mesmo ocupando uma posição isolada no fenograma, manifestaram crescimento rápido e superfície das colônias lisas.

Entretanto, ao analisar a cromogênese da colônia em meio de cultura com vermelho Congo, essa característica variou em todos os grupos do fenograma (Grupos I, II, III, IV, V e VI). Assim, cada grupo foi considerado heterogêneo para a cromogênese da colônia em vermelho Congo, ou seja, em um mesmo grupo foi possível visualizar diferentes colônias (brancas, rosadas, avermelhada no centro e vermelhas).

As características de alteração do pH do meio em YMA, forma da colônia e cromogênese da colônia em meio de cultura com azul de bromotimol variaram apenas nos grupos (II e IV), (III e IV) e (I e II), respectivamente. Os isolados dos Grupos II e IV apresentaram variação de pH em meio YMA, de ácido a neutro, quando presentes com o indicador de azul de bromotimol. Já os isolados

pertencentes aos Grupos III e IV manifestaram forma oval ou circular para as suas colônias, enquanto que os Grupos I e II manifestaram cromogênese da colônia, que variou de creme para amarelo, quando crescidos em meio YMA com indicador azul de bromotimol.

Dos 73 isolados caracterizados fenotipicamente, 34 apresentaram o critério gomoso, 33 viscoso, quatro secas e duas aquosas para a característica consistência da massa de crescimento das bactérias. Foi verificado que a maioria dos isolados do presente trabalho produziu exopolissacarídeos (EPS), que são polissacarídeos extracelulares que se encontram ligados à superfície celular, ou são excretados para o meio extracelular (SUTHERLAND, 1998). A produção de EPS pode estar relacionada à sinalização molecular no processo de simbiose com plantas e de mecanismos de *quorum sensing*, como a produção de biofilme (RINAUD; GIORDANO, 2010), além de poderem auxiliar no processo de FBN, formando uma barreira para evitar altas tensões de oxigênio (JARMAN et al., 1978), bem como de proteger a célula da dessecação e predação. Esses polímeros ainda são de fundamental importância para os setores farmacêutico (BILLA et al., 2000), industrial (SUTHERLAND, 2001) e alimentício (RINAUDO, 2008).

Para estudos taxonômicos, considerando outras características fenotípicas, principalmente testes de utilização metabólica de compostos, Ormeño-Orrillo e Martínez-Romero (2013) concluem que a utilização dessas propriedades para descrever novas espécies é questionável e está limitada a substratos disponíveis que podem subestimar as diferenças fenotípicas entre as espécies. Isso ocorre porque, se os genes que codificam para determinada característica fenotípica se localizarem nos plasmídeos, pode ocorrer variabilidade, uma vez que o DNA extra cromossomal pode apresentar instabilidade genética ao longo do tempo. Além disso, em espécies estreitamente relacionadas, as diferenças fenotípicas podem ser poucas. Conforme descrito por Tindall (2010), a análise fenotípica representa a ferramenta mais antiga para a caracterização e classificação dos procariontes; contudo, apesar de ser relevante para a sistemática, pode não refletir, ou ser limitada demais, para estudos de diversidade de bactérias.

Contudo, a caracterização fenotípica é muito importante, pois as características observáveis de uma bactéria fornecem muitos traços que podem ser utilizados para diferenciar as espécies. Ao descrever uma nova espécie, assim como para identificar uma bactéria, vários desses traços são determinados para a estirpe

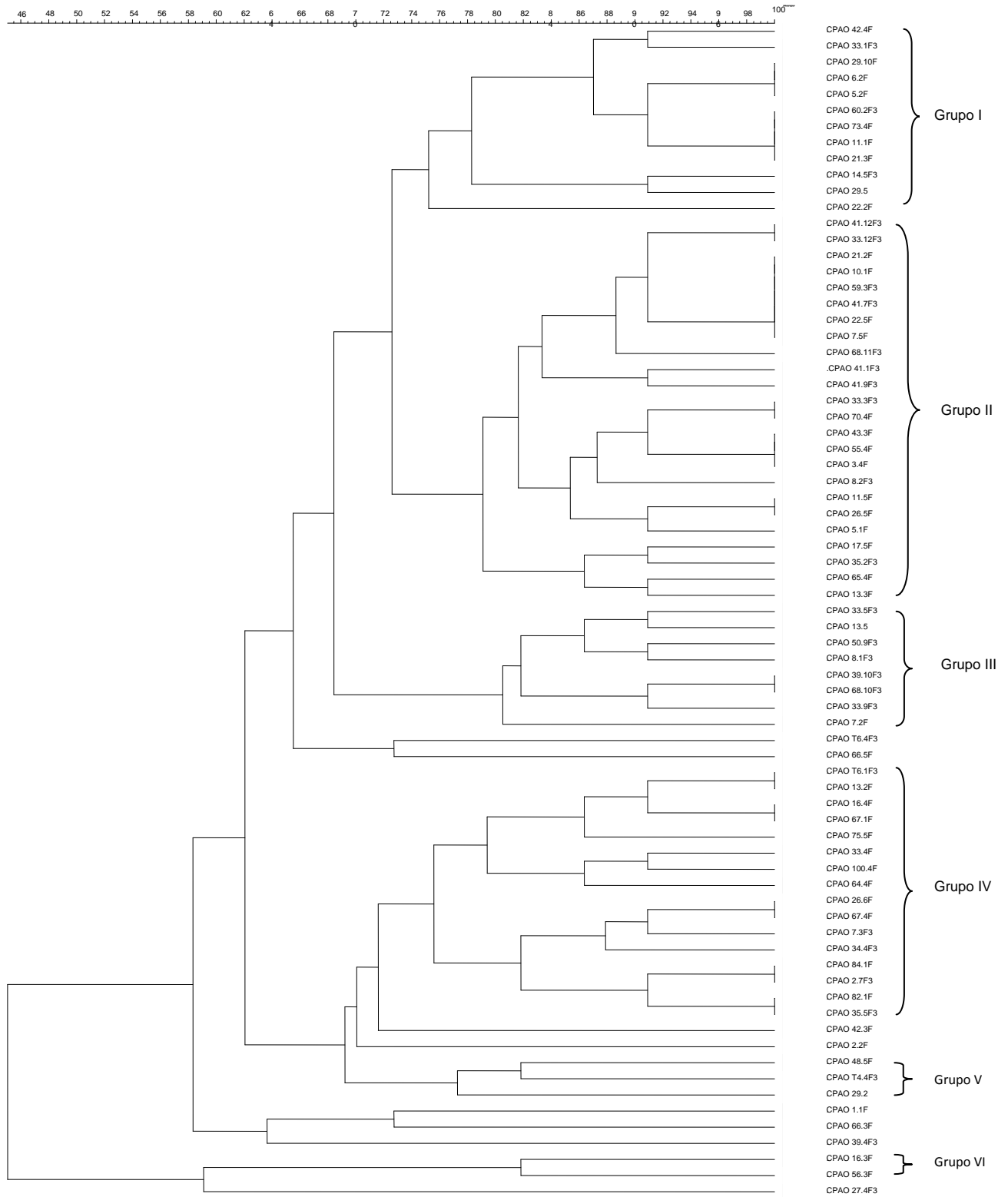
ou as estirpes de interesse. Os resultados são então comparados a organismos conhecidos como controles ou estirpe padrão, sendo examinados paralelamente aos desconhecidos ou a partir de informações publicadas (MADIGAN, 2010).

Tabela 3- Características fenotípicas: presença (V) e ausência de variação (NV) nos grupos do fenograma.

Características Fenotípicas		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
1	Manifestação de crescimento	NV	NV	NV	NV	NV	NV
2	Alteração do pH do meio YMA	NV	V	NV	V	NV	NV
3	Forma da colônia	NV	NV	V	V	NV	NV
4	Elevação da colônia	V	NV	NV	NV	V	V
5	Borda da colônia	NV	NV	NV	NV	NV	NV
6	Superfície da colônia	NV	NV	NV	NV	NV	NV
7	Produção de muco	NV	V	V	V	NV	NV
8	Consistência massa crescimento	V	V	NV	V	V	NV
9	Detalhes ópticos	V	V	V	V	NV	NV
10	Cromogênes da colônia em azul bromotimol	V	V	NV	NV	NV	NV
11	Cromogênes da colônia em vermelho Congo	V	V	V	V	V	V

Fonte: Do autor.

Figura 1- Fenograma dos 73 isolados CPAO avaliados com base nas características morfológicas. As características avaliadas encontram-se descritas no material e métodos.



Fonte: Do autor.

5.2 BOX-PCR

De acordo, com o perfil de bandas de DNA apresentado no dendrograma da figura 3, os 73 isolados distribuíram-se em 35 grupos, considerando um índice de similaridade de 70%. O número de bandas dos isolados variou de 17 a 31.

Em geral, não houve relação entre os agrupamentos dos isolados e os seus respectivos locais de origem (Figura 2 e Tabela 1). Contudo, foram encontradas exceções em alguns casos, como por exemplo: *i)* os isolados CPAO 11.5F e 13.3F (grupo III) e CPAO 11.1F e 13.2F (grupo XVIII) foram agrupados, sendo todos de origem do município de Bataguassu; *ii)* Para o município de Eldorado, os isolados CPAO 29.2F e 29.5F foram posicionados no Grupo XXIV; *iii)* O mesmo ocorreu com os isolados CPAO 35.2F3, 33.1F3 e 33.12F3, do agrupamento XVII, onde todos têm como origem comum o município de Laguna Caarapã. Ainda, os únicos representantes dos municípios de Douradina (CPAO 2.7F3), Itaporã (CPAO 27.4F3) e Ivinhema (CPAO 56.3F) foram posicionados de forma isolada no dendrograma BOX-PCR.

Alguns agrupamentos de isolados pelas propriedades morfofisiológicas identificados na figura 1 apresentaram relação com os agrupamentos formados da figura 2. No fenograma, os isolados (CPAO 42.4F e 29.10), (CPAO 73.4F e 14.5F3) e (CPAO 5.2F, 22.2F, 11.1F e 21.3F) localizaram-se no Grupo I e, na análise de BOX-PCR, permaneceram nos Grupos V, VII e XVIII, respectivamente. O mesmo ocorreu com os isolados CPAO 39.10F3 e 50.9F3 do Grupo III (Figura 1) e que continuaram no agrupamento XI da figura 2. Ainda, CPAO 27.4F3, CPAO 66.3F e CPAO 2.2F3 permaneceram isolados tanto na análise fenotípica (Figura 1), quanto na análise de BOX-PCR (Figura 2). É importante ressaltar que, ao comparar as análises fenotípicas com a de perfil de bandas de DNA, a informação gerada por técnicas de *fingerprint* de DNA é a que oferece melhores indícios para diferenciação de isolados, pois estão menos sujeitos às variações ambientais.

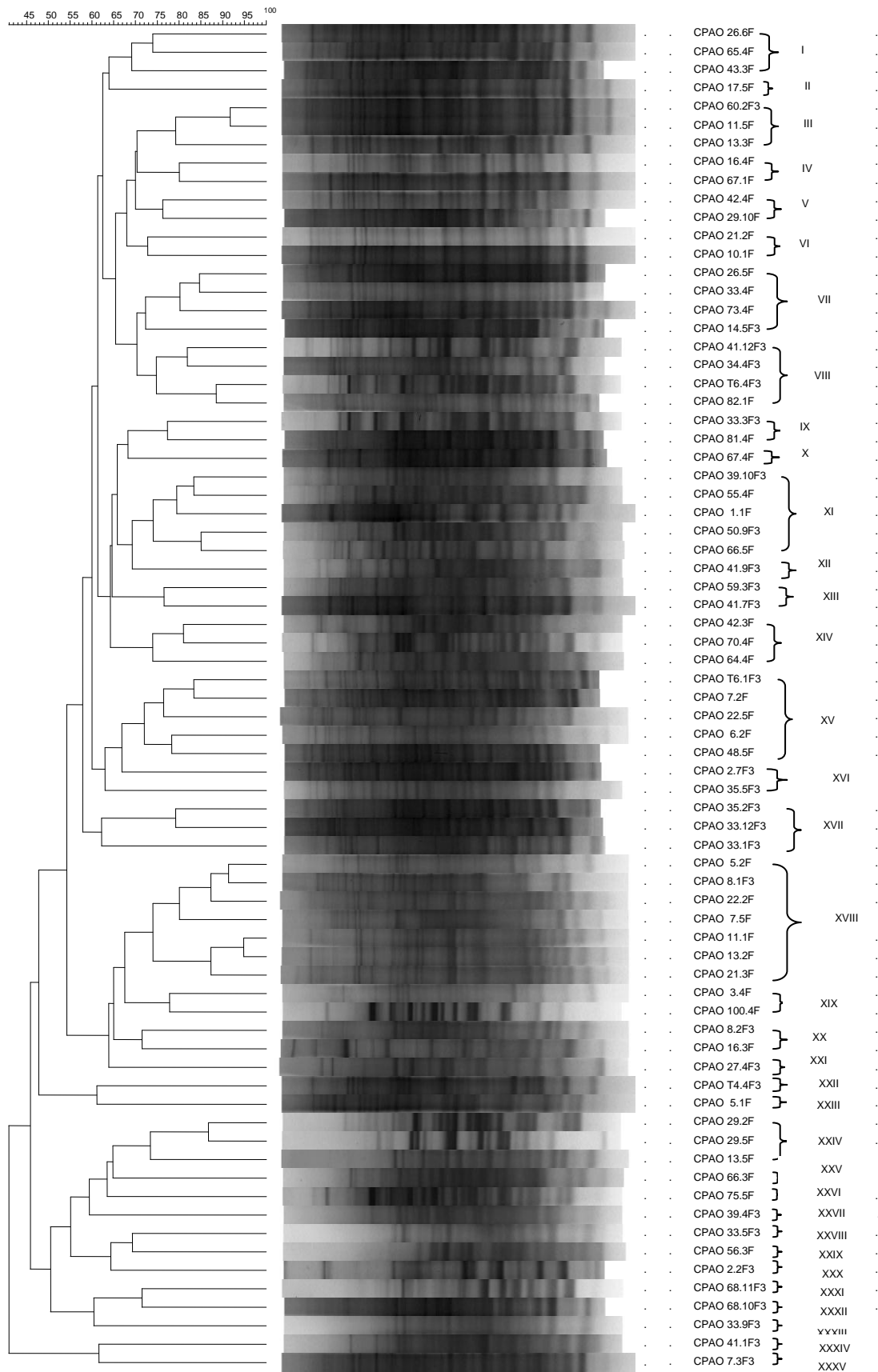
Menna e colaboradores, em 2009, no Brasil, analisaram a diversidade de 68 estirpes autorizadas para a produção de inoculantes comerciais pelo perfil de BOX-

PCR. Os autores concluíram que o método de BOX-PCR é eficaz para o controle de qualidade de inoculantes e para a caracterização preliminar de rizóbios.

Em 2011, Cornea e colaboradores examinaram a influência de alguns fatores sobre as populações indígenas de rizóbios em diferentes condições de manejo do solo na Romênia. A caracterização dos rizóbios foi realizada através dos métodos de *fingerprinting* de DNA, ERIC-PCR e BOX-PCR, e os autores identificaram que este último método apresentou melhor perfil de bandas de DNA.

A diversidade genética elevada constatada neste estudo, em solos que não haviam recebido inoculantes, indica a provável presença de estirpes indígenas capazes de nodular o feijoeiro no Mato Grosso do Sul. Outros estudos também relatam diversidade elevada de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro em diferentes regiões, como por exemplo, Etiópia (ASERSE et al., 2012) e outros estados Brasil, como Goiás, Distrito Federal, Paraná e Santa Catarina (MOSTASSO et al., 2002; STOCCO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2012; DALL'AGNOL et al., 2013; 2014).

Figura 2 - Dendrograma BOX-PCR dos 73 isolados bacterianos CPAO avaliados. Análise por UPGMA com coeficiente de Jaccard.



Fonte: Do autor.

5.3 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S

Para a análise filogenética foram escolhidos 35 representantes de cada grupo do BOX-PCR. Ao relacionar os resultados da tabela 1 de local de origem com a figura 3 do dendrograma construído com o gene 16S rRNA, observa-se que quatro isolados de Dourados encontram-se agrupados em dois grupos da análise filogenética do 16S: (CPAO 68.11F3 e T4.4F3) para o Grupo I e (CPAO 8.2F3 e 68.10F3) para o Grupo IV. O mesmo ocorreu para os isolados de Laguna Caarapã (CPAO 33.5 e 33.9F3) do Grupo IV (Figura 3). Os isolados CPAO 5.2F e CPAO 3.4F de Amambai permaneceram agrupados no Grupo I da figura 3. Embora CPAO 34.4F3 e 33.12F3 não tenham sido agrupados em nenhum grupo na figura 3, eles são provenientes do mesmo município. Os demais isolados dos grupos formados na análise da sequência do 16S rRNA (Figura 3) não apresentaram correspondência com a localização geográfica (Tabela 1).

Contudo, devido à natureza conservada da sequência do gene 16S rRNA é esperado encontrar genótipos semelhantes em locais diferentes, sob diferentes condições ambientais. Madigan et al. (2010) ressaltam que construir filogenias baseada no sequenciamento de um único gene (como por exemplo o 16S rRNA) pode acarretar equívocos, pois a natureza conservada e a possibilidade de transferência horizontal de genes podem limitar sua eficácia na diferenciação entre bactérias da mesma espécie, refletindo em informações não confiáveis para o estabelecimento das relações filogenéticas.

Os resultados obtidos por BOX-PCR (Figura 2) não corresponderam, para a maioria dos grupos formados, aos agrupamentos da análise de 16S rRNA (Figura 3). Exceções foram observadas com os isolados CPAO 11.5F e CPAO 17.5F, agrupados na análise do 16S rRNA, e próximos na análise de BOX-PCR. Já para CPAO 5.1F, tanto na análise de BOX-PCR, quanto no sequenciamento de 16S rRNA, a bactéria permaneceu de forma isolada, estando mais próxima filogeneticamente de *R. leucaenae* (100% similaridade). Cabe ressaltar que no estudo de Menna et al. (2009) a correlação entre os produtos de BOX-PCR e os genes 16S rRNA também foi baixa, de 7,6%, mas que uma análise combinada com 20% do peso no BOX-PCR e de 80% no 16S rRNA incrementou a definição de espécies de rizóbios.

O grande grupo “*R. tropici*” tem sido encontrado em regiões tropicais e se caracteriza por apresentar elevada estabilidade genética do plasmídeo simbiótico e tolerância a condições ambientais, como elevada temperatura e baixo pH do solo (Martinez-Romero et al., 1991; Martinez-Romero., 2003; Grange e Hungria, 2004; Ribeiro et al., 2009; Dall’Agnol et al., 2013; Dall’Agnol et al., 2014). Desde 1991, quando Martinez-Romero e colaboradores propuseram *R. tropici* como uma nova espécie de rizóbio nodulando *P. vulgaris* e *Leucaena* sp., esses autores observaram elevada variabilidade nas características fenotípicas e genéticas dentro desta espécie descrita, identificando dois subgrupos de *R. tropici* (tipo A e B). Em 2012, após uma abordagem polifásica (MLSA, hibridização DNA-DNA, além das análises fenotípicas e genotípicas) Ribeiro e colaboradores reclassificaram *R. tropici* tipo A como uma nova espécie, *R. leucaenae*. Segundo Mercante et al. (1998), as estirpes que foram reclassificadas como *R. leucaenae* ocorreriam de forma abundante em regiões de Cerrado, um bioma responsável por ocupar cerca de 25% do território brasileiro. Nessas regiões, *R. leucaenae* representa a ocupação de 79% e 15% de população de rizóbios obtidos de nódulos de *Leucaena leucocephala* e *P. vulgaris*, respectivamente. Neste contexto, seria esperado encontrar estirpes de *R. leucaenae* no estado de Mato Grosso do Sul, uma vez que o Cerrado ocupa 61% dessa área, além dos solos desta região apresentarem pH baixo. Contudo, isso não foi observado, e somente o isolado CPAO 5.1F foi posicionado nesse grande grupo, muito provavelmente porque, para este estudo, o feijoeiro e não leucena foi usada como planta isca.

Young e colaboradores (2001) propuseram a inclusão das espécies de *Allorhizobium* e *Agrobacterium*, incluindo os biovares *A. radiobacter*, *A. rhizogenes* e *A. vitis*, no gênero *Rhizobium* (*R. radiobacter*, *R. rhizogenes* e *R. vitis*). Com base na análise comparativa das sequências do 16S rDNA, os autores indicaram que as espécies de *Agrobacterium* constituem um grupo de organismos diversificado e monofilético com membros do gênero *Rhizobium*, capazes de induzir tumores em plantas hospedeiras. Os genes para nodulação em *Rhizobium* estão localizados no plasmídeo e podem ser transferido para outros membros do gênero *Rhizobium* (Kuykendall et al., 2004). Contudo, há controvérsias em relação à inclusão da posição taxonômica das espécies de *Agrobacterium* para *Rhizobium*. Como por exemplo, demonstrado por Farrand e colaboradores (2003) em uma nota publicada na revista *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology, em que os autores sustentam a hipótese de que espécies de agrobactérias são polifiléticas e que tanto os rizóbios, quanto as agrobactérias, são grupos filogeneticamente diferentes. Em 2004, Young e sua equipe, com base na análise comparativa de 70 sequências do 16S rDNA representando 20 espécies de rizóbios (incluindo *Agrobacterium* spp.) observaram que as espécies responsáveis por causar tumor em plantas (agrobactérias) foram distribuídas dentro do gênero *Rhizobium* e que não há justificativa para separar os gêneros *Agrobacterium* e *Rhizobium*. A análise permitiu também observar que *R. radiobacter*, *R. rubi* e *R. vitis* permaneceram agrupadas no mesmo agrupamento, enquanto que *R. rhizogenes* localizou-se filogeneticamente mais próxima de *R. tropici*.

Trabalhos sucessivos em relação à posição taxonômica de rizóbios e agrobactérias foram realizados. Em 2014 Mousavi e colaboradores investigaram a relação filogenética, posição taxonômica e aspectos da nomenclatura do complexo *R. galegae* e alguns membros de *Agrobacterium* sp. Com base no 16S e MLSA de seis genes *housekeeping* de 114 bactérias, a árvore filogenética obtida permitiu identificar cinco grupos filogeneticamente distintos. Os autores observaram que *R. alkalisoli*, *R. huatlense*, *R. galegae* sv. *orientalis*, *R. galegae* sv. *officinalis* e *R. vignae* formaram uma linhagem monofilética mais próxima das agrobactérias do que dos rizóbios. Essas bactérias pertencentes ao complexo *R. galegae* (grupo A) e representaram um gênero novo (*Neorhizobium*). No grupo B, localizaram-se as agrobactérias, incluindo *A. radiobacter* e *A. rubi*. No grupo C ficaram os rizóbios, sendo que bactérias pertencentes ao grande grupo "*R. etli*-*R. leguminosarum*" localizaram-se no subgrupo C1 e o grupo dos tropicis (inclusive *R. rhizogenes*) localizaram-se no subgrupo C2. Em seguida, as espécies *Ensifer fredii*, *E. medicae* e *E. meliloti* permaneceram no gênero *Ensifer* (grupo D). E, por fim, tem-se o grupo E, composto por espécies de *Allorhizobium*, onde nota-se a transferência da posição taxonômica de *Agrobacterium vitis* para *Allorhizobium vitis*.

Ainda em relação à filogenia dos rizóbios, Mousavi e sua equipe em 2016 apresentaram novas mudanças na filogenia dessas bactérias. Os autores propuseram a transferência de *R. giardinii*, *R. herbae*, *R. capsulatus* e *R. helanshenense* para um novo gênero na família *Rhizobiaceae*: *Pararhizobium* (*P. giardinii*, *P. herbae*, *P. capsulatus* e *P. helashanense*). Os resultados permitiram ainda observar que as espécies *A. vitis*, *R. taibaishanense*, *R. paknamense*, *R. oryzae*, *R. pseudoryzae*, *R. qilianshanense* e *R. borbori* apresentam origem

monofilética e estão distantes geneticamente de *Agrobacterium* e *Rhizobium*. Os autores sugeriram a transferência dessas bactérias para o gênero *Allorhizobium* (*A. vitis*, *A. taibaishanense*, *A. paknamense*, *A. oryzae*, *A. pseudoryzae*, *A. qilianshanense* e *A. borbori*). Em relação às agrobactérias, as espécies de *R. nepotum*, *R. pusense* e *R. skiernierwicense* agruparam no gênero *Agrobacterium* (*A. nepotum*, *A. pusense* e *A. skiernierwicense*). E quanto a *R. rhizogenes*, os resultados de 2016 corroboram com os resultados obtidos em 2015 pela equipe de Mousavi e que confirmam os trabalhos de Young et al (2001, 2004), onde a espécie *R. rhizogenes* é filogeneticamente mais próxima de *R. tropici* do que do grupo *Agrobacterium*. Confirma-se, portanto, que o grupo dos rizóbios é heterogêneo, em estado de constante atualização taxonômica. Dessa forma, salienta-se que, indubitavelmente, estudos de filogenia são importantes para o conhecimento e classificação taxonômica microbiana dos rizóbios.

Continuando a análise do agrupamento resultante da análise dos genes 16S rRNA, com aproximadamente 1002 pares de bases (pb) alinhadas, dois outros dois grandes grupos foram formados e serão discutidos (Figura 3). As estirpes CPAO 68.11 F3; 67.1F; 41.7F3; 70.4F; T4.4F3; 3.4F e 5.2F formaram o Grupo I, apresentando maior similaridade genética com a estirpe tipo *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370^T; *R. laguerreae* FB206^T; *R. pisi* DSM 30132^T; *R. fabae* CCBAU 33202^T e *R. phaseoli* ATCC 14482^T. Ao realizar o *BLAST* das sequências de bases dos isolados CPAO no Grupo I (Figura 3) foram observados alinhamentos que demonstraram identidade nucleotídica de 99 a 100% com os rizóbios do grande grupo de rizóbios “*R. etli*-*R. leguminosarum*”.

A estirpe CPAO 26.6F ocupou uma posição isolada entre os grupos de rizóbio tipo *R. etli* CFN 42^T e *R. laguerreae* FB 206^T. A identidade nucleotídica desse isolado revelou similaridade de 99% com rizóbio *R. leguminosarum* (bv. *viciae* e bv. *trifolli*) (Figura 4). As estirpes CPAO 11.5F e 17.5F agruparam-se com *R. etli* CFN 42^T, com 99% de identidade.

Espécies de *R. etli* são comumente encontradas em ambos centros de origem do feijoeiro (Mesoamericano e Andino). Desse modo, não era de se esperar encontrar isolados dessa espécie nos resultados do presente trabalho. No entanto, diversos estudos têm relatado a presença de *R. etli* em solos brasileiros (Stralio et al., 1999; Hungria et al., 2000; Mostasso et al., 2002; Stocco et al., 2005). Apesar do Brasil não ser considerado centro de origem do hospedeiro,

evidências arqueológicas demonstram que o feijoeiro é cultivado há centenas de anos no país e que a introdução de *R. etli* no Brasil pode ter ocorrido através de sementes de feijão carregadas de sementes viáveis de rizóbios (Perez-Ramirez et al., 1998).

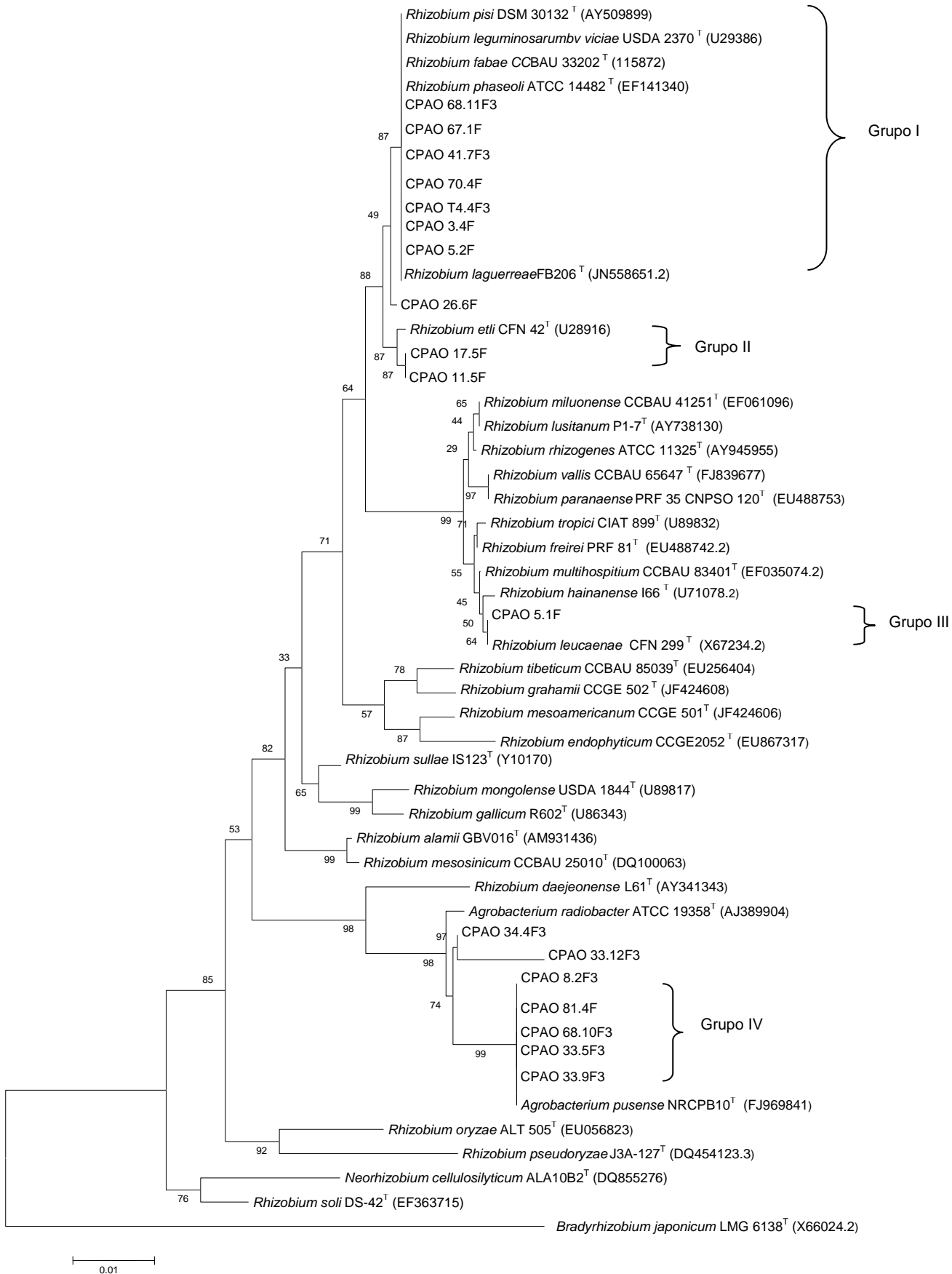
Em relação aos isolados filogeneticamente próximos do grupo “leguminosarum”, Segovia e colaboradores (1993), levantaram a hipótese de que com a colonização da América sementes de feijão carregando *R. etli* foram introduzidas na Europa, onde provavelmente ocorreu a transferência do plasmídeo simbiótico, primeiro para *R. leguminosarum* (Segovia et al., 1993) e, posteriormente, deste para *R. gallicum* bv. phaseoli e *R. giardinii* bv. phaseoli (Amarger et al., 1997). Além de estudos detectarem a presença de espécies de *R. leguminosarum* em solos brasileiros (Stralio et al., 1999; Mostasso et al., 2002; Stocco et al., 2005), deve-se ressaltar que *R. leguminosarum* também foi detectada na Colômbia (Eardly et al., 1995), país sugerido como terceiro centro de diversificação genética do feijoeiro (Gepts e Debuck, 1991). Os resultados deste trabalho, em adição a outros (por exemplo, Stocco et al., 2005; Mostasso et al., 2002) indicam que *R. leguminosarum* pode não ter origem europeia, bem como que essa espécie pode ter sido dispersa via sementes da América Central e Noroeste da Argentina.

No segundo grupo de interesse, Grupo IV, foram posicionados os isolados CPAO 8.2F3; CPAO 81.4F; CPAO 68.10F3; CPAO 33.5F3 e CPAO 33.9F3, apresentando maior similaridade genética com *R. pusense* NRCPB10 (Figura 4). A similaridade nucleotídica desses isolados foi de 99 a 100% com estirpes de *Rhizobium* sp. e *Agrobacterium*. Os isolados CPAO 34.4F3 e 33.12F3 não foram agrupados e o BLAST revelou similaridade de 99% com estirpes de *Rhizobium* sp. Contudo, a estirpe tipo que ficou mais próxima desses isolados foi *R. radiobacter* ATCC 19358^T. Rashid e colaboradores (2012) avaliaram a diversidade genética de 36 rizóbios de 25 localidades que nodulam lentilhas em Bangladesh e constataram, em condições laboratoriais, estirpes de *R. radiobacter*, mas que não fixavam nitrogênio. Isolados com relações filogenéticas a *R. radiobacter* têm sido recuperados de nódulos de leguminosas em diferentes partes do mundo (ANYANGO et al., 1995; CUMMINGS et al., 2009; ZAKHIA et al., 2006). Os autores sugeriram que estes isolados não fixadores podem ser oportunistas (quando em condições de campo) ou conviverem com espécies nodulíferas de rizóbios no interior do nódulo. Contudo, há outros relatos de estirpes mostrando alta semelhança genética com *R.*

radiobacter e que são capazes de nodular leguminosas (Chen et al., 2000; Menna et al., 2006; Ribeiro et al., 2013).

Embora o gene 16S rRNA seja considerado como a base da taxonomia e filogenia de procariotos, sendo funcionalmente estável e altamente conservado (RAMASAMY et al., 2014), ele não é suficiente para definir uma espécie, de modo que uma maior definição pode ser dada pela análise de outros genes *housekeeping*.

Figura 3 - Filogenia dos genes 16S rRNA dos isolados CPAO e de rizóbios tipo com maior similaridade genética, construída através do método Neighbor joining e a distância evolucionária calculada através do Maximum-likelihood. Bootstrap de 1000 vezes



Fonte: Do autor.

5.4 MLSA - ANÁLISE INDIVIDUAL E CONCATENADA DOS GENES *HOUSEKEEPING*

Filogenias construídas através de métodos como o MLSA, com base em genes que codificam para proteínas essenciais para a célula, resultam em melhor distinção para diferenciação de linhagens relacionadas (GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2007, 2008; RIBEIRO et al., 2009, 2012, 2013). Desse modo, neste trabalho a filogenia também foi avaliada através da análise individual de genes conservados localizados no cromossomo das bactérias: *glnII*, *gyrB* e *recA*, que codificam para a glutamina sintetase, a DNA girase e a recombinase A, respectivamente (Figuras 4, 5 e 6). Os resultados obtidos para os filogramas referentes a cada gene cromossomal mostraram relação na formação dos Grupos I, III e IV formados entre os isolados CPAO e os rizóbios tipo.

Os isolados do Grupo II (CPAO 11.5 e 26.6F), das figuras 4 e 5, se agruparam com *R. etli* CFN 42^T nas análises individuais dos genes *glnII* e *gyrB*. Ao passo que, na análise do gene *recA*, esses mesmos isolados se agruparam com *R. oryzae* ALT 505^T.

A estirpe CPAO 5.1F apresentou elevada similaridade com *R. leucaenae* em todas análises filogenéticas (Grupo III) realizadas no presente trabalho. Além disso, foram observados valores elevados de *bootstrap* e 100% de identidade nucleotídica, tanto para as filogenias individuais, quanto concatenada dos genes *housekeeping*.

Apesar dos isolados CPAO 33.5F3 e 68.10F3 não formarem agrupamento com nenhum rizóbio tipo na análise individual do gene *glnII*, eles se agruparam no Grupo V com *A. pusense* NRCPB10^T nas análises dos genes *gyrB* e *recA*.

A quantidade da informação filogenética foi avaliada pelo cálculo do número de porcentagem de sítios conservados, regiões variáveis e parsimônia informativa (Tabela 4). O gene *gyrB* apresentou maior número (239) e porcentagem (41%) de sítios de parcimônia informativa. Em contraste, os genes *glnII* e *recA* apresentaram 138 e 90 caracteres, com porcentagens de 31% e 33%, respectivamente.

Ao comparar as filogenias das análises individuais dos genes *glnII*, *gyrB* e *recA* com a sequência do gene 16S, os isolados do Grupo I (figura 16S)

continuaram no mesmo agrupamento das análises individuais (Figuras 4, 5 e 6). CPAO 26.6F e CPAO 11.5F, que haviam se localizado em regiões distintas da figura 16S, na análise individual agruparam com *R. etli* CFN 42^T (genes *glnII* e *gyrB*) e *R. oryzae* ALT 505^T(*recA*).

A análise concatenada dos três genes pode ser visualizada na figura 7, e houve a formação de três grupos. No Grupo I, os isolados CPAO 68.11F3, 41.7F3, 67.1F e T4.4F3 foram agrupados com *R. phaseoli* ATCC 14482^T. O segundo grupo foi formado por *R. etli* CFN 42^T e CPAO 26.6F e 11.5F. O Grupo III incluiu *R. leucaenae* CFN 299^T e CPAO 5.1F. Os isolados CPAO 34.4F3 e 33.12F3 ficaram mais próximos filogeneticamente de *A. radiobacter*. E os isolados CPAO 33.5F3 e CPAO 68.10F3 não apresentaram relação filogenética com os rizóbios tipos incluídos no estudo.

Foi realizada também a análise de identidade nucleotídica. Os isolados CPAO 34.4F3 e 33.12F3, que nas filogenias de *glnII*, *gyrB*, *recA*, e *glnII+gyrB+recA* ficaram mais próximas de *A. radiobacter* ATCC19358, apresentaram identidade nucleotídica de 93,20% (*recA*), 88,9% (*gyrB*), 94,8% (*glnII*) e 90,4% na análise concatenada (*glnII+gyrB+recA*). No caso das estirpes CPAO 33.5F3 e 68.10F3 a identidade nucleotídica dessas estirpes revelou elevada similaridade em relação à bactéria tipo *A. pusense* NRCPB10^T, com valores de 98,4% para *gyrB* e, em relação ao gene *recA*, os valores foram de 100% para CPAO 33.5F3 e de 99,6% para CPAO 68.10F3.

Segundo Goris et al., (2007) e Richter e Rosselló-Móra (2009), com base em estudos comparativos, linhagens de bactérias pertencentes à mesma espécie que apresentem os valores de DDH de >70% correspondem à similaridade entre as sequências genômicas de 95% - 96% de ANI. Ainda, Stackebrandt e Ebers (2006), Meyer e Koltthoff et al., (2013) e Kim e colaboradores (2014) demonstraram que os valores de 98,2% - 99% para identidade de sequências de nucleotídeos de genes compartilhados entre dois organismos correspondem a isolados pertencentes à mesma espécie.

Em 2012, López-Guerrero e colaboradores revisaram a posição taxonômica de algumas estirpes de rizóbios do feijoeiro do México, Colômbia, Brasil e EUA. Entre os resultados obtidos, observaram que as estirpes CIAT 652, Ch24-10 e CNPAF 512 poderiam ser reclassificadas como *R. phaseoli*, apesar de apresentarem várias características comuns à *R. etli*. Os autores destacam que a

espeiação de espécies “irmãs” como *R. phaseoli*- *R. etli* parece ser mais recente do que quando comparadas com a espeiação de outras espécies irmãs como *R. leguminosarum*-*R. etli* e *R. rhizogenes*-*R. tropici*.

A. radiobacter, *A. nepotum* e *A. pusense* pertencem a um clado das agrobactérias considerado como não-simbiótico. *A. pusense* foi descrita como uma bactéria não simbiótica da rizosfera de plantas de grão-de-bico, e tanto neste trabalho, como no de Ribeiro e colaboradores (2013), estirpes isoladas de feijoeiro foram agrupadas nesse clado, com base nas filogenias dos genes *gyrB* e *recA*. Mhamdi et al., (1999) e Rincón-Rosales et al., (2009) reportaram perda e baixa eficiência de fixação de nitrogênio em isolados de agrobactérias extraídos de nódulos de feijoeiro e de *Acaciella angustissima*, respectivamente. Por outro lado, trabalhos de Chen et al. (2002) e Hungria et al. (2006) verificaram que linhagens de agrobactérias obtidas a partir de nódulos de soja cultivados na América do Sul foram eficientes na fixação de nitrogênio. Provavelmente, a transferência horizontal de genes seja a explicação mais aceita frente a essas duas situações, uma vez que genes localizados no plasmídeo podem ser transferidos para outras bactérias formando, assim, transconjugantes. Martinez et al. (1987) e Novikova e Safronova (1992), em condições laboratoriais, realizaram a transferência do plasmídeo de rizobios para agrobactérias e observaram que as bactérias que haviam recebido o DNA extra-cromossomal apresentaram capacidade de nodulação com baixa eficiência de fixação de N₂.

A sequência concatenada dos três genes *housekeeping* revelou o alinhamento de 1294 nucleotídeos (Figura 7), compreendendo 736 (57%), 557 (43%) e 420 (32%) sítios conservados, variáveis e com informação genética de parcimônia, respectivamente (Tabela 4). A tabela 4 reflete a informação genética dos loci analisados, onde a região conservada dos nucleotídeos refere se aos nucleotídeos que não sofreram alterações genéticas (conservados) para determinada sequência de DNA em um grupo de organismos. Por outro lado, a região variável reflete as modificações nos nucleotídeos observadas para uma mesma sequência de DNA. Contudo, a variação dos nucleotídeos pode ou não refletir características genéticas importantes para estudos evolucionários. E, por fim, a parcimônia informativa que considera somente as modificações genéticas que ocorreram e que refletem informações importantes para estudos filogenéticos.

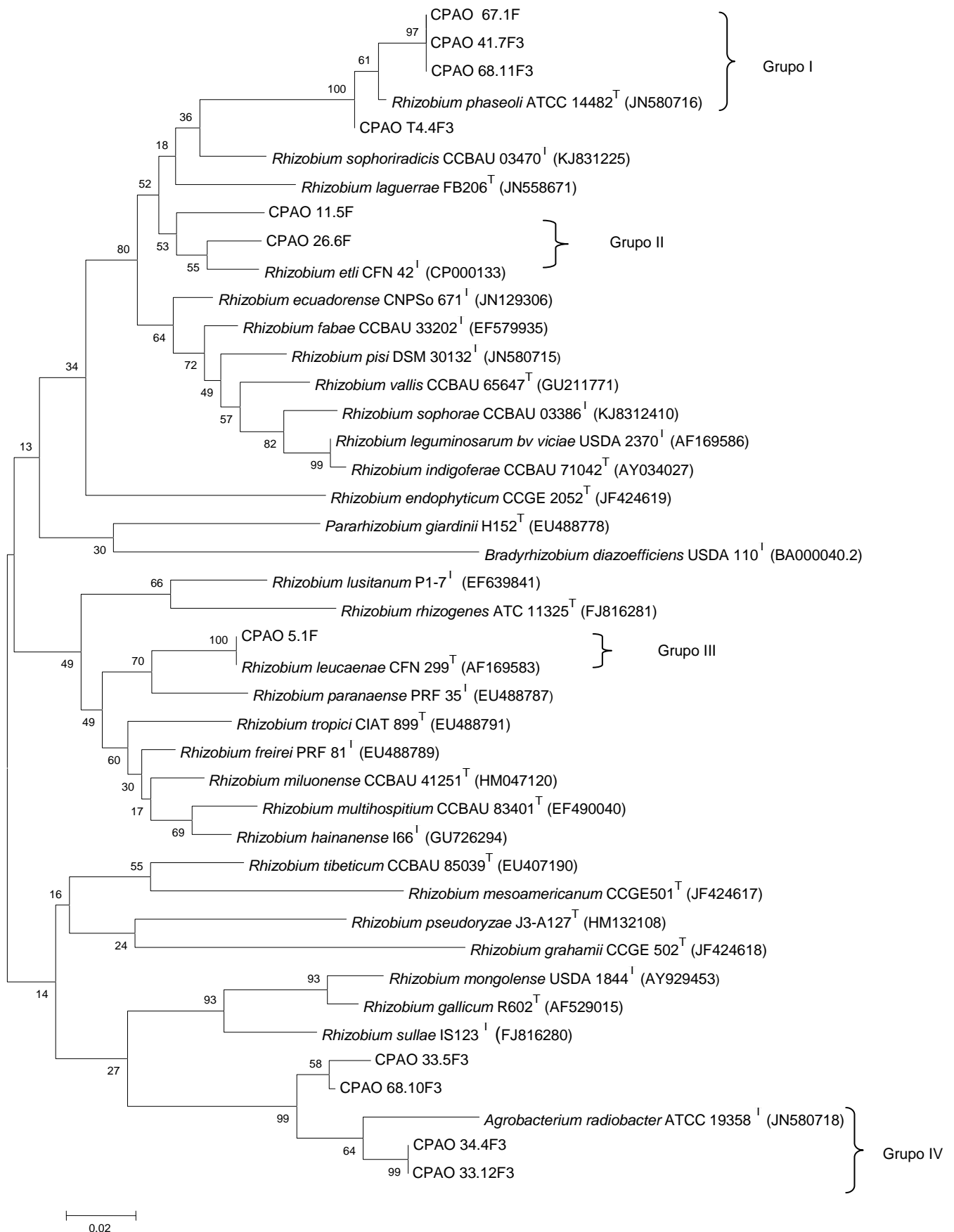
Tabela 4 - Número de sequências e informação filogenética dos loci analisados.

Locus	Estirpes analisadas	Número de nucleotídeos (porcentagem)			Total de nucleotídeos
		Conservada	Variável	Parsimônia Informativa	
16S	50	871 (86,9%)	121 (12%)	86 (8,58%)	1002
<i>glnII</i>	42	285 (63%)	165(37%)	138(31%)	450
<i>gyrB</i>	32	256 (44%)	321 (56%)	239 (41%)	577
<i>recA</i>	41	153 (57%)	114 (42%)	90 (33%)	268
<i>glnII+gyrB+recA</i> *	25	736 (57%)	557 (43%)	420 (32%)	1294

* Alinhamento concatenado do gene *glnII* (449nt), *gyrB* (575nt) e *recA* (270nt)

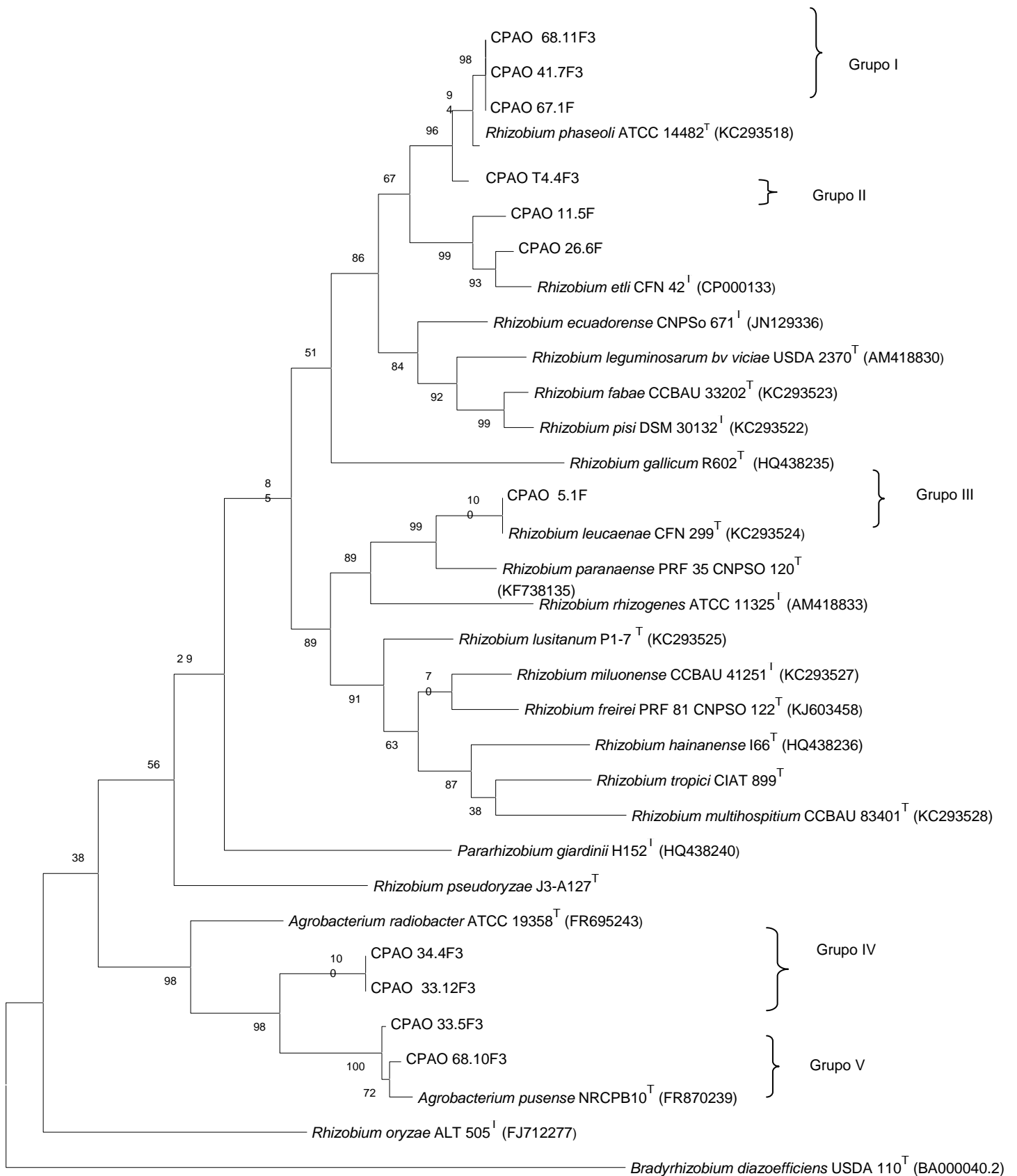
Fonte: Do autor.

Figura 4- Filogenia do gene glutamina sintetase (*glnII*) dos isolados CPAO e rizóbios tipo, construída através do método Neighbor joining e a distância evolucionária calculada através do Maximum-likelihood. bootstrap de 1000 vezes.



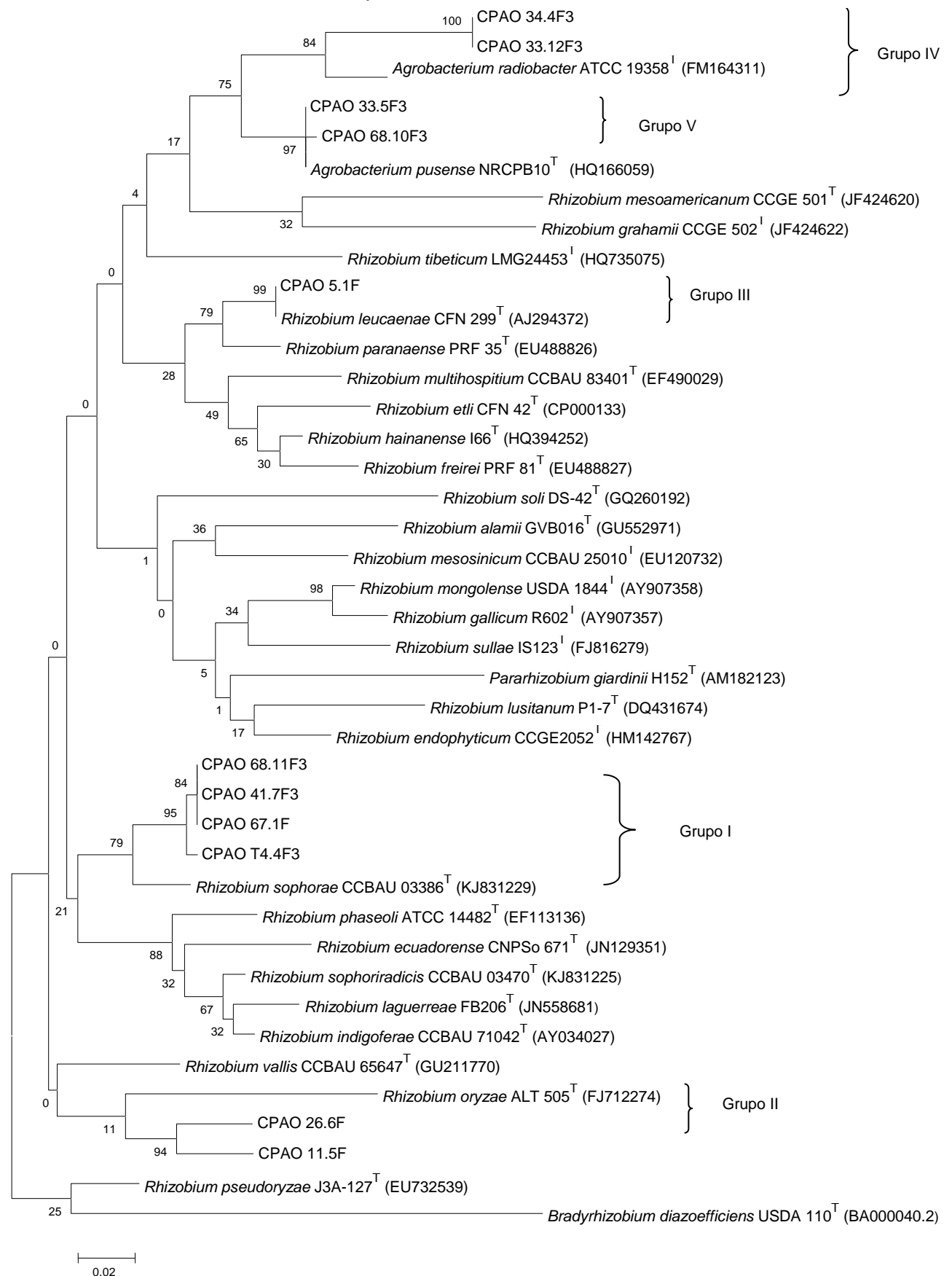
Fonte: Do autor.

Figura 5- Filogenia do gene DNA gyrase (*gyrB*) dos isolados CPAO e rizóbios tipo, construída através do método Neighbor joining e a distância evolucionaria calculada através do Maximum-likelihood, bootstrap 1000x.



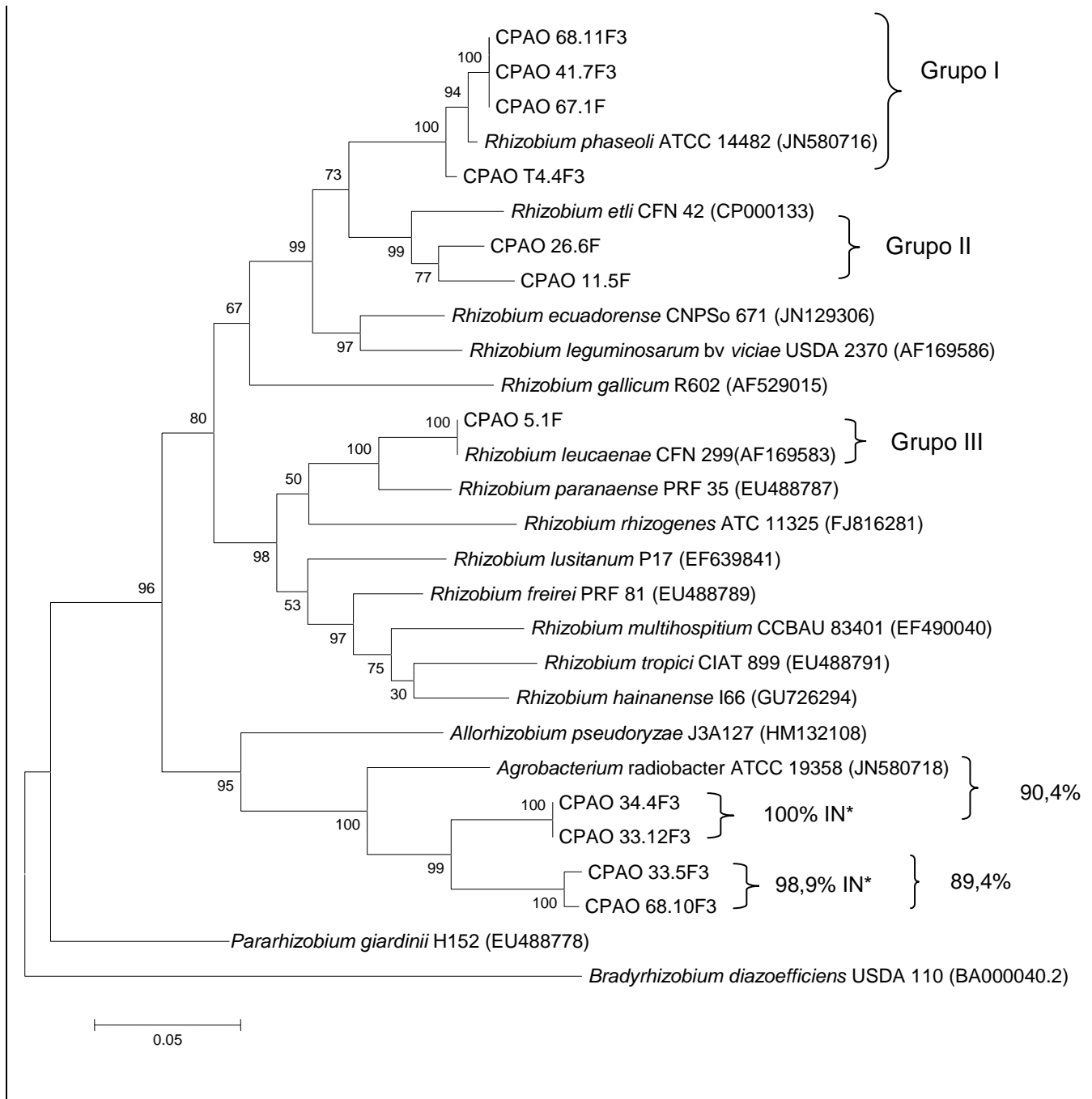
Fonte: Do autor.

Figura 6 - Filogenia do gene DNA *recombinase* (*recA*) dos isolados CPAO e rizóbios tipo, construída através do método Neighbor joining e a distância evolucionaria calculada através do Maximum-likelihood, bootstrap 1000x.



Fonte: Do autor.

Figura 7 - Filogenia baseada no alinhamento concatenado dos genes *housekeeping glnII+gyrB+recA* dos isolados CPAO e alguns rizóbios tipo. A árvore filogenética foi construída através do método Neighbor joining e a distância evolucionária calculada através do Maximum-likelihood, bootstrap 1000x.



IN* _ Valores de Identidade Nucleotídica
Fonte: Do autor.

5.5 NOVA LINHAGEM EM NÍVEL DE ESPÉCIE DE RIZÓBIO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO NO MATO GROSSO DO SUL

A diversidade de rizóbios provavelmente é maior em solos tropicais que em regiões subtropicais (OYAIZU et al., 1992; VINUESA et al., 1998; ALBERTON et al., 2006). No entanto, o conhecimento sobre a diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro ainda é bastante limitado em solos brasileiros, apesar dos avanços verificados nos últimos anos.

Neste estudo, conforme pode ser visualizado na figura 8, as estirpes CPAO 34.4F3 E CPAO 33.12F3 podem representar novas espécies. Isso fica embasado pelos dados de identidade nucleotídica na sequência concatenada (*glnII+gyrB+recA*) dessas estirpes, que indicaram 100% de identidade entre a CPAO 34.4F3 e a 33.12F3 e, quando comparadas à *A. radiobacter* ATCC 19358, de 90,4%. Situação semelhante foi observada para as estirpes CPAO 33.5F3 e 68.10F3, que apresentaram similaridade de 98,9% entre si e, quando comparadas à *R. radiobacter* ATCC19358, o valor obtido foi de 89,4%.

6 CONCLUSÕES

- De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que existe grande diversidade genética de rizóbios microsimbiontes de *Phaseolus vulgaris* no Estado de Mato Grosso do Sul, inclusive com indicação de novas espécies.
- Estudos de sistemática procariótica são importantes, pois auxiliam na identificação de bactérias que visam potencializar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio na agricultura.

REFERÊNCIAS

- ACINAS, S. G.; MARCELINO, L. A.; KLEPAC-CERAI, V.; POLZ, M. F. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 2629-2635, 2004.
- ACOSTA, J. L.; EGUIARTE, L. E.; SANTAMARÍA, R. I.; BUSTOS, P.; VINUESA, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; DÁVILA, G.; GONZÁLEZ, V. Genomic lineages of *Rhizobium etli* revealed by the extent of nucleotide polymorphisms and low recombination. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 305, 2011.
- AGUILLAR, O. M.; RIVA, O.; PELTZER, E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 13548-13553, 2004.
- ALBERTON, O. M.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1298-1307, 2006.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AL-FALIH, A. M. K. Factors affecting the efficiency of symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 1277-1293, 2002.
- AMARAL, G. R. S.; DIAS, G. M.; WELLINGTON-OGURI, M.; CHIMETTO, L.; CAMPEÃO, M. E.; THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C. Genotype to phenotype: identification of diagnostic vibrio phenotypes using whole genome sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 357-365, 2014.
- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M. R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, v. 161, p. 147-156, 1994.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic of Bacteriology**, v. 47, p. 996-1006, 1997.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, p. 996- 1006, 1997.
- ANDRADE, D. S., MURPHY, P. J., GILLER, K. E. Genetic diversity of rhizobial populations nodulating *Phaseolus vulgaris* in acid soils from Brazil. In: MARTÍNEZ, E., HERNANDEZ, G. (Ed.). **Highlights of Nitrogen Fixation Research**. New York Kluwer Academic Publishers, 1999, p. 291 – 294.
- ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus* nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with

Phaseolus vulgaris L. In Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4025-4034, 2002.

ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J. L.; GILLER, K. E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4016-4021, 1995.

ARANJUELO, I.; ARRESE-IGOR, C.; MOLERO, G. Nodule performance within a changing environmental context. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 1076-1090, 2014.

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

BAGINSKY, C.; BRITO, B.; SCHERSON, R.; PERTUZÉ, R.; SEGUEL, O.; CAÑETE, A.; ARANEDA, C.; JOHNSON, W. E. Genetic diversity of *Rhizobium* from nodulating beans grown in a variety of Mediterranean climate soils of Chile. **Archives of Microbiology**, v. 197, p. 419-429, 2015.

BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCWAB, S.; OLIVARES, F. L.; HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S.; REIS, M. V.; NOGUEIRA, E. M.; ARAÚJO, J. L. S.; BORGES, L. E.; SOARES, L. H. B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V. L. D.; CARVALHO, G. T. L.; ALVES, B. J. R.; JAMES, E. K.; JANTALIA, C. P.; FERREIRA, P. C. G.; VIDAL, M. S.; BODDEY, R. M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família poaceae (antiga gramineae). **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 6, p. 203-271, 2009.

BARCELLOS, F. G.; MENNA, P.; BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2635-2643, 2007.

BEGUM, A. A.; LEBOVITCH, S.; MIGNER, P.; ZHANG, F. Specific flavonoids induced *nod* gene expression and pré activated *nod* genes of *Rhizobium leguminosarum* increased peã (*Pisum sativum*) and lentil (*Lens cuularis*) nodulation is controlled growth chamber environments. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1537-1543, 2001.

BERINGER, J. E.; BREWIN, N.; JOHNSTON, A. W. B.; SCHULMAN, H. M.; HOPWOOD, D. A. The *Rhizobium* legume symbiosis. **Proceedings of the Royal Society**, v. 204, p. 219-233, 1979.

BILLA, NN.; YUEN, K-H.; KHADER, M. A.A.; OMAR, A. Gamma-scintingraphic study of the gastrointestinal transit and in vivo dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices. **International Jornal of Pharmaceutics**, v. 201, p. 109-2000.

BOTTOMLEY, P. J.; MYROLD, D. D. Biological N inputs. In: PAUL, E. A (Ed.) *Soil Microbiology, ecology and biochemistry*. Oxford: Elsevier,, 2007. p. 365-387.

BREDEMEYER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Revista Ciência Rural**, v. 30, p. 365-372, 2000.

BRENNER, D. J.; FANNING, G. R.; RAKE, A. V.; JOHNSON, K. E. Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. **Analytical Biochemistry**, v. 28, p. 447-459, 1969.

BRITISH PETROLEUM, 1996. **BP Statistical review of world energy**. London: British Petroleum, 1996.

BROCKWELL, J.; PILKA, A.; HOLLIDAY, R. A. Soil pH is the major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non cultivated soils in the New South Wales. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 31, p. 211-219, 1991.

BROMFIELD, E. S. P.; BARRAN, L. R.; WHEATCROFT, R. Relative genetic structure of a population of *Rhizobium meliloti* isolated directly from soil and from nodules of alfafa (*Medicago sativa*) and sweet clover (*Melilotus alba*). **Molecular Ecology**, v. 4, p.183-188, 1995.

BUCHANAN, R. E. Taxonomy. **Annual Review Microbiology**, v. 9, p. 1-20, 1955.

BURK, D.; BURRIS, R. H. Biochemical nitrogen fixation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 10, p. 587-618, 1941.

CAO, Y.; WANG, E. T.; ZHAO, L.; CHEN, W. M.; WEI, G. H. Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 78, p. 128-137, 2014.

CHEN, L. S.; FIGUEREDO, A.; VILLANI, H.; MICHAJLUK, J.; HUNGRIA, M. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from Field-grown soybean nodules in Paraguay. **Biology and fertility and soils**, v. 35, p. 448-457, 2002.

CHEN, W. X.; TAN, Z. Y.; GAO, J. L.; LI, Y.; WANG, E. T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic of Bacteriology**, v. 47, p. 870-873, 1997.

CHUN, J.; RAINEY, F. A. Integrating genomics into the taxonomy and systematic of the *Bacteria* and *Archaea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 316-324, 2014.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Use of the genomic signature in bacterial classification and identification. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 175-185, 2004.

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

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). Conjuntura Agropecuária do Feijão. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_07_09_16_20_14_conjuntura_agropecuaria_do_feijao_-_junho_2015.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2015a.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABSTECIMENTO). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_05_12_08_59_36_boletim_graos_maio_2015.pdf>. Acesso em: 15 maio 2015b.

CONN, H. J. Validity of the genus *Alcaligenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 44, p. 353-360, 1942.

CORDERO, O. X.; POLZ, M. F. Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. **Nature Reviews**, v. 12, p. 263-273, 2014.

CORNEA, C. P.; VOAIDES, C.; CIUCA, M.; STAN, V.; GAMENT, E.; RAZEC, L.; DUSA, M. Molecular methods for assesment the bacterial communities from different type of soils in Romania. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 39, p. 64-70, 2011. Acesso em: 12 nov. 2015.

CUMMINGS, S. P.; GYANESHWAR, P.; VINUESA, P.; FARRUGIA, F. T.; ANDREWS, M.; HUMPHRY, D.; ELLIOTT, G. N.; NELSON, A.; ORR, C.; PETTITT, D.; SHAH, G. R.; SANTOS, S. R.; KRISHNAN, H. B.; ODEE, D.; MOREIRA, F. M. S.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Nodulations of *Sesbania* species by *Rhizobium (Agrobacterium)* strain IRBG 74 and other rhizobia. **Environmetal Microbiology**, v. 10, p. 2510-2525, 2009.

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

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* very effective in 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.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; ANDRADE, D. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium paranense* sp. nov., na 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.

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.

DANIEL, M.; PIERRE, F.; RUBEN, L.; ANA, Z.; ALAIN, P.; CESAR, A. I.; ESTHER, M. G. Nitrogen fixation control under drought stress. Localize dor Systemic ? **Plant Physiology**, v. 143, p. 1968-1974, 2007.

DART, P.J., DAY, J., ISLAM, R., DOÈBEREINER, J. Symbiosis in tropical grain legumes: some effects of temperature and the composition of the rooting medium. In: NUTMAN, P.S. (Ed.), **Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants**. Cambridge University, 1976.

DAVIS, P. H.; HEYWOOD, V. H. **Principles in angiosperm taxonomy**. Princeton: Van Nostrand, 1963. 556 p.

DAY, J. M., ROUGHLEY, R. J., EAGLESHAM, A. R. J., DYE, M., WHITE, S. P. Effect of high soil temperatures on nodulation of cowpea, *Vigna unguiculata*. **Annals of Applied Biology**, v. 88, p. 476-481, 1978.

DE LEY, J.; PARK, I. W.; TIJTGAT, R.; VAN ERMENGEM, J. DNA homology and taxonomy of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Journal of General Microbiology**, v. 42, p. 43-56, 1966.

DE LEY, J.; RASSEL, A. DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*. **Journal of General Microbiology**, v. 41, p. 85-91, 1965.

DIOUF, A.; DE LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; KERSTERS, K.; GILLIS, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; GUEYE, M. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 159-170, 2000.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews**, v. 2, p. 621-631, 2004.

EADY, R. R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 3013-3030, 1996.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Plataforma nacional de recursos genéticos, 2015. Disponível em: <<http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/>> Acesso em: 2 mar. 2015.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Planta, 2006, 403 p.

FAGHIRE, M.; MANDRI, B.; OUFDOU, K.; BARGAZ, A.; GHOULAM, C.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUES, E. PEIX, A. Identification at the species and symbiovar levels os strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in saline soils of the Marrakesh region (Marroco) and analysis of the *otsA* gene putatively involved in osmotolerance. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 156-164, 2012.

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

FERREIRA, E. P. B.; MERCANTE, F. M.; HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; ARAÚJO, J. L. S.; FERNANDES- JUNIOR, P. I.; ARAÚJO, A. P. Contribuições para melhoria

da eficiência da fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro comum no Brasil. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 8, p. 251-291, 2013.

FISHER, K.; NEWTON, W. E. Nitrogen fixation: a general overview. In: LEIGH, G. J. (Ed.). **Nitrogen fixation at the millennium**. Amsterdam: Elsevier, 2002. 351 p.

FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 1-11, 2009.

FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 7, p. 332-346, 1889.

FRASSINETTI, S.; SETTI, L.; CORTI, A.; FARRINELLI, P.; MONTEVECCHI, P.; VALLINI, G. Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 289-297, 1998.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; McCOY, E. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin, 1932.

FREITAS, F. O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1199-1203, 2006.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Natal: FUNPEC, 2009. 830 p.

GÁNDARA, B.; MERINO, A. L.; ROGEL, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 235-240, 2001.

GARCÍA-FRAILE, P.; MULLAS-GARCÍA, D.; PEIX, A.; RIVAS, R.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F.; VELÁZQUEZ, E. *Phaseolus vulgaris* is nodulate in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two nodC alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeographical and evolutionary implications. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 657-666, 2010.

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

GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). In: SCHOONHOVEN, A. V.; VOYSEST, O. (Ed). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. p. 7-53.

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

GHANY, T. M. A.; ALAWLAQI, M. M.; ABOUD, M. A. A. Role of biofertilizers in agriculture: a brief review. **Mycophatologia**, v. 11, p. 95-101, 2013.

GIBSON, A. H. Recovery and compensation by nodulated legumes to environmental stress. In: NUTMAN, P.S. (Ed.), **Nitrogen Fixation in Plants**. Cambridge University Press: London, 1975, p. 385-443.

GILSON, E.; PERRIN, D.; HOFNUNG, M. DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to E. coli palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 3941-3952, 1990.

GIONGO, A. 2007. **Diversidade genética de Bradyrhizobium elkanii e B. japonicum que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/12021>> Acesso em: 05 maio 2015.

GONNET, S.; DÍAZ, P. Glutamine synthetase and glutamate synthase activities in relation to nitrogen fixation in *Lotus* spp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 195-202, 2000.

GONZÁLEZ-PAREDES, Y.; ALEJANDRO, A.; FERRERA-CERRATO, R.; ALMARAZ, J. J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CRUZ-SÁNCHEZ, J. S.; MENDOZA-LÓPEZ, M. R.; ORMEÑO-ORRILLO, E. Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo [a] pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 105-111, 2013.

GOODFELLOW, M.; MANFIO, G. P.; CHUN, J. Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In: CLARIDGE, M. F.; DAWAH, H.; WILSON, M. R. (Ed.). **Species: the units of biodiversity**, Londres: Chapman & Hall, 1997. p. 25-29.

GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K. T.; KLAPPENBACH, J. A.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; TIEDJE, J. M. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 81-91, 2007.

GRAHAM, P. H. Antigenic affinities of the root-nodule bacteria of legumes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 29, p. 281-291, 1963.

GRAHAM, P. H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. **Field Crops Research**, v. 4, p. 93-112, 1981.

GRAHAM, P. H. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. **Journal of General Microbiology**, v. 35, p. 511-517, 1964.

GRAHAM, P. H.; SADOWSKY, M. J.; KEYSER, H. H.; BARNET, Y. M.; BRADLEY, R. S.; COOPER, J. E.; DE LEY, D. J.; JARVIS, B. D. W.; ROSLYCKY, E. B.; STRIJDOM, B. W.; YOUNG, J. P. W. Proposed minimal Standards for the description of new genera and species of root and stem nodulating bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 582-587, 1991.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v. 65, p. 93-106, 2000.

GRAHAM, P.; H.; DRAEGER, K. J.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTINEZ-ROMERO, E.; AARONS, S. R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 198-207, 1994.

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

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

GU, C. T.; WANG, E. T.; TIAN, C. F.; HAN, T. X.; CHEN, W. F.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from Lespedeza root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1364-1368, 2008.

GUEREÑA, D. T.; LEHMAN, J.; THIES, J. E.; ENDERS, A.; KARANJA, N.; NEUFELDT, H. Partitioning the contributions of biochar properties to enhanced biological nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Biology and Fertility Soils**, v. 51, p. 479-491, 2015.

GURTLER, V.; MAYALL, B. C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 3-16, 2001.

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A. M.; MOULIN, L.; CHEN, W. M.; GEOFFREY, N. E.; BONTEMPS, C.; LOS SANTOS, P. E. de los; GROSS, E.; REIS JUNIOR, B. F.; SPRENT, J. I.; YOUNG, P. W.; JAMES, E. K. Legume-nodulating Betaproteobacteria: Diversity, host range, and future prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, p. 1276-1288, 2011.

HARPER, J. E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K. J.; BENNETT, J. M.; SINCLAIR, T. R.; PAULSEN, G. M. (Ed.) **Physiology and determination of crop yield**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 285-302.

HARTMANN, A.; GIRAUD, J.; CATROUX, G. Genotypic diversity of *Sinorhizobium* (formerly *Rhizobium*) *melliloti* strains isolated directly from a soil and from nodules of alfafa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 25, p. 107-116, 1998.

HAUKKA, K.; LINDSTRÖM, K.; YOUNG, J. P. W. Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, p. 352-359, 1996.

HEYTLER, E. G.; REDDY, G. S.; HARDY, R. W. F. In vivo energetics of symbiotic nitrogen fixation in soybeans. In: LUDDEN, E. W.; BURRIS, I. (Eds.) **Nitrogen fixation and CO₂ metabolism**. New York: Elsevier 1985. p. 283-292.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2965-2982, 1996.

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

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.; VARGAS, M. A. T. Fixação biológica do N₂ na cultura do feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M (Ed.). **Biologia do solo dos Cerrados**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 189-294

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

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

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

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.; MEGÍAS, M.; LAMRABET, Y.; PROBANZA, A.; GUTIERREZ-MAÑERO, F.; CAMPO, R. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, v. 288, p. 343-356, 2006.

HUNGRIA, M.; KASCHUK, G. Regulation of N₂ fixation and NO₃⁻/NH₄⁺ assimilation in nodulated and N-fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high temperature stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 98, p. 32-39, 2014.

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

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

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

ISMAIL, M.; EL-ZANATAY, A. M.; EISSA, R. A.; HEWEDY, O. A. Genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* as revealed by 16S rRNA gene sequence. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental**, v. 13, p. 797-801, 2013.

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

JANSSENS, D.; ARAHAL, R. D.; BIZET, C.; GARAY, E. The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. **Research in Microbiology**, v. 61, p. 422-429, 2010.

JARMAN, T. R.; DEAVIN, L.; SLOCOMBE, S.; RIGHELATO, R. C. Investigation of the effect of environmental condition on the rate of EPS synthesis in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of General Microbiology**, v. 107, p. 59-64, 1978.

JIAO, Y. S.; YAN, H.; JI, Z. J.; LIU, Y. H.; SUI, X. H.; WANG, E. T.; GUO, B. L.; CHEN, W. X.; CHEN, W. F. *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 497-503, 2014.

JOHNSON, J. L. DNA reassociation experiments. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: Wiley, 1991. p. 21-44.

JOHNSON, J. L.; ORDAL, E. J. Deoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. **Journal of Bacteriology**, v. 95, p. 893-900, 1968.

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

JORDAN, D. C. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. (Ed.) N KRIEG and R. G HOLT. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1984, p. 234-235.

JUNIER, P.; ALFARO, M.; GUEVARA, R.; WITZEL, K. P.; CARÚ, M. Genetic diversity of *Rhizobium* present in nodules of *Phaseolus vulgaris* L. cultivated in two soils of the central region in Chile. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 60-66, 2014.

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.

KEUM, Y. S.; SEO, J. S.; HU, Y.; LI, Q. X. Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 71, p. 935-941, 2006.

KIM, K. M.; PARK, J. H.; BHATTACHARYA, D.; YOON, H. S. Applications of next-generation sequencing to unravelling the evolutionary history of algae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 333-345, 2014a.

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

KONSTANTINIDIS, K. T.; RAMELTE, A.; TIEDJE, J. M. The bacterial species definition in the genomic era. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences**, v. 361, p. 1929-1940, 2006.

KONSTANTINIDIS, K. T.; STACKEBRANDT, E. Defining taxonomic ranks. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. L. (Eds.). **The Prokaryotes: Prokaryotic and symbiotic associations**. New York: Springer, 2013. 229 p.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 2567-2572, 2005.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 504-509, 2007.

KUMAR, S. R. S.; RAO, K. V. B. Biological nitrogen fixation: a review. **International Journal of Advanced Life Sciences**, v. 1, p. 1-9, 2012.

KURTZMAN, C. P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 325-332, 2014.

LAEGREID, M.; BOCKMAN, O. C.; KAARSTAD, O. **Agriculture, fertilizers and the environment**. Wallingford, UK: CABI, 1999. 320 p.

LAGUERRE, G.; LOUVIER, P.; ALLARD, M. R.; AMARGER, N. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2276-2283, 2003.

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

LEUNG, K.; WANJAGE, F. N.; BOTTOMLEY, P. J. Symbiotic characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates which represent major and minor nodule-occupying chromosomal types of field-grown subclover (*Trifolium subterraneum*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 427-433, 1994.

LINDSTROM, M. K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 453-463, 2010.

LÓPEZ-GUERRERO, M. G.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; VELÁZQUEZ, E.; ROGEL, M. A.; ACOSTA, J. L.; GÓNZALEZ, V.; MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses. **Systematic Applied Microbiology**, v. 35, p. 353-358, 2012.

LÓPEZ-GUERRERO, M.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; VELÁZQUEZ, E.; ROGEL, M. A.; ACOSTA, J. L.; GÓNZALEZ, V.; MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* taxonomy revised with novel genomic data and analyses. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 353-358, 2012.

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

LOVELOCK, J. M. **The ages of Gaia**. Oxford: Oxford university Press, 1998. 277 p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed: 2010. 1160 p.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSEL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.

MANNETJE, L. T. A re-examination of the taxonomy of the genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 33, p. 477-491, 1967.

MAPA. BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Feijão**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>. Acesso em: 14 abr. 2015a.

MAPA. BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>. Acesso em: 14 abr. 2015b.

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

MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1-15, 2007.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECECK, R.; MORRISON, A. D.; BOULNOIS, G. J.; CLAVERY, J. P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 3479-3483, 1992.

MARTINEZ, E.; PALACIOS, R.; SANCHEZ, F. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. **Journal of Bacteriology**, v. 69, p. 2828-2834, 1987.

MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, p. 11-23, 2003.

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

MASEPOHL, B.; KLIPP, W. Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. **Archives of Microbiology**, v. 165, p. 80-90, 1996.

MAYR, E. **Principles of systematic zoology**. New York: McGraw-Hill, 1969. 428 p.

McCARTHY, B. J.; BOLTON, E. T. An approach to the measurement of genetic relatedness among organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 50, p. 156-164, 1963.

MCINTYRE, H. J.; DAVIES, H.; HORE, T. A.; MILLER, S. H.; DUFOUR, J. P. RONSON, C. W. Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3984-3992, 2007.

MCKAY, I. A.; DJORDJEVIC, M. A. Production and excretion of nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3385-3392, 1993.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; AUCH, A. F.; KLENK, H. P.; GOKER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, v. 40, 60p, 2013.

MENDES, I. C.; HUNGRIA, M.; STRALLIOTO, R.; REIS JUNIOR, F.; Bean response to reinoculation with *Rhizobium* strains in Brazilian Cerrados soils. In: REUNIÃO

LATINO AMERICANA DE RHIZOBIUM, 2004 Miguel Pereira. **Resumos...** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004.

MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B.; MORAES, C. B.; HUNGRIA, M. **Inoculação do feijoeiro em Unaí, MG**: cartilha para o produtor rural. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 16 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 175).

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 Applied Microbiology**, v. 29, p. 315-332, 2006.

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

MERCANTE, F. M. **Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1993. 194p. (Dissertação de Mestrado)

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

MHAMDI, R.; JEBARA, M.; AOUANI, M. E.; GHIR, R.; MARS, M. Genotypic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. **Biology and fertility and soils**, v. 28, p. 313-320, 1999.

MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, v. 15, p. 873-885, 1976.

MILLER, K. J.; WOOD, J. M. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. **Annual Reviews Microbiology**, v. 50, p. 101-136, 1996.

MINNIKIN, D. E.; ALSHAMAONY, L.; GOODFELLOW, M. Differentiation of Mycobacterium, Nocardia, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. **Journal of General Microbiology**, v. 88, p. 200-204, 1975.

MMA. BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade>>. Acesso em: 10 mar. 2015a.

MMA. BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>> Acesso em: 10 mar. 2015c.

MMA. BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente**. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do>>. Acesso em: 09 mar. 2015b.

- MNASRI, B., AOUANI, M.E. MHAMDI, R. Nodulation and growth of common bean under water deficiency. **Soil Biology and Biochemistry** v. 39, p. 1744-1750, 2007.
- MNASRI, B.; LIU, T. Y.; SAIDI, S.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X.; ZHANG, X. X.; MHAMDI, R. *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1501-1506, 2014.
- MOFFET, M. L.; COLWELL, R. R. Adansonian analysis of the Rhizobiaceae. **Journal of General Microbiology**, v. 51, p. 245-266, 1968.
- MOORE, E. R.; MIHAYLOVA, S. A.; VANDAMME, P.; KRICHEVSKY, M. I.; DIJKSHOORN, L. Microbial systematic and taxonomy: relevance for a microbial commons. **Research Microbiology**. v. 161. p. 430-438, 2010.
- MOSIER, A. R. Environmental challenges associated with needed increases in global nitrogen fixation. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 63, p. 101-116, 2002.
- MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, p. 121-132, 2002.
- MOUSAVI, S. A.; OSTERMAN, J.; WAHLBERG, N.; NESME, X.; LAVIRE, C.; VIAL, L.; PAULIN, L.; DE LAJUDIE, P.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, p. 208-215, 2014.
- MOUSAVI, S. A.; WILLEMS, A.; NESME, X.; DE LAJUDIE, P.; LINDSTRÖM, K. Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and thirteen new species combinations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, p. 84-90, 2015.
- MULAS, D.; GARCÍA-FRAILE, P.; CARRO, L.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; CASQUERO, P.; VELÁZQUEZ, E.; GONZÁLEZ- ANDRÉS, F. Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in northern Spanish soils: selection of native strains that replace conventional N fertilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 2283-2293, 2011.
- NEHRA, K.; YADAV, A. S.; SEHRAWAT, A. R.; VASHISHAT, R. K. Characterization of heat resistant mutant strains of *Rhizobium* sp. (Cajanus) for growth, survival and symbiotic properties. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 329-335, 2007.
- NEVES, M. C. P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 6, p. 267-361, 1987.
- NEWBURY, S. F.; SMITH, N. H.; HIGGINS, C. F. Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. **Cell**, v. 51, p. 1131-1143, 1987.
- NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 652 p.

- NICOL, G. W.; LEININGER, S.; SCHLEPER, C.; PROSSER, J. I. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2966-2978, 2008.
- NOVIKOVA, N.; SAFRONOVA, V. Transconjugants of *Agrobacterium radiobacter* harboring sym genes of *Rhizobium galegae* can form an effective symbiosis with *Medicago sativa*. **FEMS Microbiology**, v. 93, p. 261-268, 1992.
- ORLA-JENSEN, S. Die hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems nebst einer Übersicht der Gärungsphänomene. **Zentralbl Bakteriologischen Parasitenkd, Abt II**, v. 22, p. 305-346, 1909.
- ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTINEZ-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.
- OYAIZU, H.; NARUHASHI, N.; GAMOU, T. Molecular methods of analysing bacterial diversity: the case of rhizobia. **Biodiversity and Conservation**, v. 1, p. 237-249, 1992.
- PACE, B.; CAMPBELL, L. L. Homology of ribosomal ribonucleic acid of diverse bacterial species with *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 107, p. 543-547, 1971.
- PALLERONI, N. J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, p. 333-339, 1973.
- PANKHURST, C. E.; GIBSON, A. H. *Rhizobium* strain influence on disruption of clover nodule development at high temperature. **Journal of General Microbiology**, v. 74, p. 219-231, 1973.
- PELEGRIN, R.; MERCANTE, F. M.; OTSUBO, I. M. N.; OTSUBO, A. A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 219-226, 2009.
- PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1851-1864, 2007.
- PINTO, P. P.; RAPOSEIRAS, R.; MACEDO, A. M.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; SÁ, N. M. H. Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating *Rhizobium* strains. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 295-300, 1998.
- PORCH, T. G. Application of stress indices for heat tolerance screening of common bean. **Journal Agronomy & Crop Science**, v. 192, p. 390-394, 2006.
- RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L.; JANSSEN, P. H.; HIPPE, H.; STACKEBRANDT, E. *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. **Microbiology**, v. 142, p. 2087-2095, 1996.

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

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE *Rhizobium* – RELARE. **Ata de I Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium***. Curitiba, 1985, 9p.

REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO DE ESTIRPES DE *Rhizobium* – RELARE. **Ata de XII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)**. Londrina, 2005.

REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 559-566, 2000.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. **Fixação biológica de nitrogênio** – estado da arte. In: AQUINO, A. M. E LINHARES (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia; Brasília DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 151-180.

REIS-JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; REIS, V. M.; HUNGRIA, M. Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura. In: **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: EMBRAPA, 2011. p. 247-281.

RENNIE, R. J.; KEMP, G. A. N₂ fixation in field beans quantified by ¹⁵N isotopic dilution I. Effect of strain of *Rhizobium phaseoli*. **Agronomy Journal**, v. 75, p. 640-644, 1983.

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

RIBEIRO, R. A.; MARTINS, B. T.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DELAMUTA, J. R. M.; ROGEL, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2015 (in press).

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

RIBEIRO, R. A.; ROGEL, M. A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; BARCELLOS, F. G.; MARTINEZ, J.; THOMPSON, F. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1179-1184, 2012.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 752 p.

RINCÓN-ROSALES, R.; LLORET, L.; PONCE, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, p.103-117, 2009.

RINAUDO, M. main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397-430, 2008.

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

ROSSELLÓ-MORA, R. DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. In: STACKEBRANDT, E. (Ed.), **Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p. 23-50.

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

SAWADA, H.; KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the Systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal of Genetic and Applied Microbiology**, v. 49, p. 155-179, 2003.

SCHUBERT, K. R. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. **Annual Review of Plant Physiologic**, v. 37, p. 539-574, 1986.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal Systematics of Bacteriology**, v. 43, p. 374-377, 1993.

SILVA, C.; VINUESA, P.; EGUIARTE, L. E.; MARTINEZ-ROMERO, E.; SOUZA, V. *Rhizobium etli* and *Rhizobium galllicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. **Applied and Environment Microbiology**, v. 69, p. 884-893, 2003.

SILVER, W. S.; POSTGATE, J. R. Evolution of asymbiotic nitrogen fixation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 40, p. 1-10, 1973.

SIMPSON, G. G. **Principles in animal taxonomy**. New York: Columbia University Press, 1961. 247 p.

SIQUEIRA, J.; FRANCO, A. A. O. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília, DF: MEC: ABEAS; Lavras: ESAL: FAEPE, 1998. 236 p.

SKERMAN, V. D. B.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v. 2, p. 3-4, 1980.

SMIBERT, R. M.; KRIEG, N. R. Phenotypic characterization. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E., WOOD, W. A.; KRIEG, N. R (Ed). **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. p. 607-654.

SNEATH, P. H. A. Analysis and interpretation of sequence data for bacterial systematics-the view of a numerical taxonomist. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 12, p. 15-31, 1989.

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

SOBERON-CHAVEZ, G.; NÀJERA, R.; OLIVEIRA, H.; SEGOVIA, L. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. **Journal of Bacteriology**, v. 167, p. 487-491, 1986.

SOUZA, V.; EGUIARTE, L. E.; AVILA, G.; CAPELLO, R.; GALLARDO, C.; MONTOYA, J.; PIÑERO, D. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1260-1268, 1994.

SUOMINEN, L.; JUSSILA, M. M.; MÄKELÄINEN, K.; ROMANTSCHUK, M.; LINDSTROM, K. Evaluation of the Galega – *Rhizobium galegae* system for the bioremediation of oil – contaminated soil. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 239-244, 2000.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p.41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 663-674, 2001.

STACKEBRANDT, E. Diversification and focusing: strategies of microbial culture collections. **Trends in Microbiology**, v. 18, p. 283-287, 2010.

STACKEBRANDT, E. Molecular taxonomy parameters. **Microbiology, In focus**, p. 60-62, 2011.

STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold Standards. **Microbiology Today**, v. 33, p. 152-155, 2006.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUNTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1043-1047, 2002.

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

STEFANOVA, D.; PETKOVAB, V.; DENEVC, I. D. Screening for heat tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris*) lines and cultivars using JIP-test. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 1-6, 2011.

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

STOLZ, J. F.; BOTKIN, D. B.; DASTOOR, M. N. The integral biosphere. In: RAMBLER, M. B.; MARGULIS, L.; FESTER, R. (Eds). **Global ecology**. San Diego: Academic Press, 1989. p. 31-49.

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. O.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; RUMJANEK, N. G. Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 71, p. 531-543, 1999.

TAJINI, F.; TRABELSI, M.; DREVON, J. J. Comparison between the reference *Rhizobium tropici* CIAT 899 and the native *Rhizobium etli* 12 a 3 for some nitrogen fixation parameters in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under water stress. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 4058-4067, 2012.

TAMURA K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolutionary**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, C. C.; AMARAL, R. G.; CAMPEÃO, M.; EDWARDS, R. A.; POLZ, M. F.; DUTILH, B. E.; USSERY, D. W.; SAWABE, T.; SWINGS, J.; THOMPSON, F. L. Microbial taxonomy on the post-genomic era: rebuilding from scratch ? **Archives for Microbiology**, v. 3, p. 359-370, 2014.

THOMPSON, C. C.; CHIMETTO, L.; EDWARDS, R. A.; SWINGS, J.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. **Microbial genomic taxonomy**. *BMC Genomics*, v. 14, p. 913, 2013.

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

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

TREVORS, J. T. Plasmid curing in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 149-157, 1986.

TRUPER, H. G.; Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance. **Biodiversity and Conservation**, v. 1, p. 227- 236, 1992.

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

VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, A.; EARDLY, B. D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified with nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L) Ledebour]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 13 – 22, 1998.

VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, T. A.; EARDLY, B. D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* L.. **International Journal of Systematic of Bacteriology**, v. 48, p. 13-22, 1998.

VAN BERKUM, P; BEYENE, D.; EARDLY, B. D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 240-244, 1996.

VANCE, C. P.; LAMB, J. F. S. Application of biochemical studies to improving nitrogen fixation. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41, p. 403-416, 2001.

VANDAMME, P.; PEETERS, C. Time to revisit polyphasic taxonomy. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, p. 57-65, 2014.

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

- VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Response of Field grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and N fertilization in two Cerrados soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, p. 228-233, 2000.
- VELAZQUEZ, E.; MATEOS, P. F.; VELASCO, N.; SANTOS, F.; BURGOS, P. A.; VILLADAS, P.; TORA, N.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Symbiotic characteristics and selection of autochthonous strains of *Sinorhizobium meliloti* populations in different soils. **Soil Biology Biochemistry**, p. 31, 1999.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes, **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUJIN, F. J.; LUPSKY, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- VĚTROVSKÝ, T; BALDRIAN P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. **Plos One**, v. 8, p. 1-10, 2013.
- VINCENT, J. M.; HUMPHREY, B. A. Taxonomically significant group antigens in *Rhizobium*. **Journal of General Microbiology**, v. 63, p. 379-382, 1970.
- VINUESA, P. Multilocus sequence analysis and bacterial species phylogeny estimation. In: OREN, A.; PAPKE, R. T. (Ed). **Molecular phylogeny of microorganisms**. Portland: Caister Academic Press, 2010. p. 41-64.
- VINUESA, P.; ROJAS-JIMENEZ, K.; CONTRERAS-MOREIRA, B.; MAHNA, S. K.; PRASAD, B. N.; MOE, H.; SELVARAJU, S. B.; THIERFELDER, H.; WERNER, D. Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic continent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 6987-6996, 2008.
- VITOUSEK, P. M.; MENGE, D. N. L.; REED, S. C.; CLEVELAND, C. C. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. **Philosophical transactions of the royal society**, v. 368, p. 1-8, 2013. Disponível em: <http://www.cfc.umt.edu/research/biogeochimistry/files/publications/Vitousek_etal_2013.pdf> .Acesso em: 20 jun. 2015.
- WANG, E. T.; VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; SUI, X. H.; DORADO, O.; CHEN, W. X.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbaceae* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary and Microbiology**, v. 48, p. 687-699, 1998.
- WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWEEL, R. R.; GRIMOXT, P. A. D.; KANIILER, O.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRUPER, H. G. Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 463-464, 1987.

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

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

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

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

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, 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.

YANG, Y.; AMES, G. F. L. DNA gyrase binds to the family repetitive extragenic palindromic sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 8850-8854, 1988.

YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice (review). **Nature**, v. 13, p. 303 - 314, 2012.

ZAKHIA, F.; JEDER, H.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; DE LAJUDIE, P. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH- like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. **Microbial Ecology**, v. 51, p. 375-393, 2006.

ZHANG, X.; LI, B.; WANG, H.; SUI, X.; MA, X.; HONG, Q.; JIANG, R. *Rhizobium petrolearium* sp. Nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1871-1876, 2012.

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