



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

REBECA FUZINATTO DALL'AGNOL

**ANÁLISE POLIFÁSICA APLICADA À TAXONOMIA E
FILOGENIA DE RIZÓBIOS MICROSSIMBIONTES DO
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

REBECA FUZINATTO DALL'AGNOL

**ANÁLISE POLIFÁSICA APLICADA À TAXONOMIA E
FILOGENIA DE RIZÓBIOS MICROSSIMBIONTES DO
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

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

Orientador: Dr^a. Mariangela Hungria

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D144a Dall' Agnol, Rebeca Fuzinato.
Análise polifásica aplicada à taxonomia e filogenia de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) / Rebeca Fuzinato Dall' Agnol. – Londrina, 2013.
103 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola – Teses. 2. Microorganismos fixadores de nitrogênio – Teses. 3. Genética microbiana – Teses. 4. Rizóbio – Teses. 5. Feijão comum – Teses. I. Hungria, Mariangela. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

REBECA FUZINATTO DALL'AGNOL

**ANÁLISE POLIFÁSICA APLICADA À TAXONOMIA E FILOGENIA DE
RIZÓBIOS MICROSSIMBIONTES DO FEIJOEIRO (*Phaseolus
vulgaris* L.)**

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

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Mariangela Hungria da Cunha
Embrapa Soja – Londrina - PR

Dr^a Pamela Menna Pereira Pavanelli
Biagro
Biagro do Brasil – Cambé - PR

Dr. Fernando Gomes Barcellos
UEL – Londrina - PR

Londrina, 20 de março de 2013.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me guiar, me iluminar e me ajudar a vencer obstáculos e persistir na luta.

À toda a minha família, em especial aos meus pais e irmãos, que sempre acreditaram em mim, me apoiando nos momentos difíceis, me incentivando a batalhar pelos meus sonhos e comemorando comigo as minhas conquistas.

À minha orientadora Mariangela Hungria, a quem admiro imensamente, tanto pelo seu profissionalismo quanto pela sua conduta pessoal. Sua amizade, carinho, apoio e excelente orientação foram fundamentais para a realização deste trabalho, e contribuíram muito para meu desenvolvimento profissional.

Aos membros da banca, Dr^a Pamela Menna Pereira Pavanelli e Fernando Gomes Barcellos, pela disponibilidade em participar deste momento importante de minha vida e por agregar conhecimentos valiosos a este trabalho.

À Embrapa Soja, por ceder a estrutura e os materiais necessários à realização deste trabalho, e a todos os funcionários, que colaboraram para a concretização do mesmo.

Aos colegas, funcionários e pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Soja, pela grande amizade, pela ajuda e por fazerem da minha rotina momentos extremamente divertidos e prazerosos. Em especial, à Jakeline, cuja ajuda foi essencial para o desenvolvimento de meu experimento, e cujas explicações e instruções foram fundamentais para que eu o conduzisse de maneira apropriada; e ao Renan, cujas orientações foram igualmente valiosas em diversos momentos de meu experimento.

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

Aos colegas do Mestrado em Biotecnologia, pela amizade e companheirismo em todos os trabalhos e eventos que participamos juntos.

Ao meu namorado, Diego Matias, pelo companheirismo, carinho e apoio.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

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

DALL'AGNOL, Rebeca Fuzinato. **Análise polifásica aplicada à taxonomia e filogenia de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2013. 103f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Solos agrícolas submetidos a práticas de manejo intensivo e inadequado são prejudicados física, química e biologicamente, levando ao esgotamento de nutrientes e perda de atividade biológica, tornando-os ineficazes para o cultivo. Sabe-se que bactérias conhecidas como rizóbios podem fixar o N₂ atmosférico, suprimindo total ou parcialmente as necessidades em nitrogênio de plantas, especialmente da família Leguminosae (=Fabaceae). Desta maneira, a caracterização molecular e filogenética de rizóbios nativos de solos brasileiros é importante para estudos futuros, visando aumentar a produtividade agrícola sem agredir o meio ambiente. Atualmente, a filogenia do gene ribossomal 16S rRNA representa a base para estudos taxonômicos de procaríotos, mas a alta conservação do mesmo dificulta a identificação e a classificação taxonômica de espécies estritamente relacionadas. Além disso, a ocorrência de transferência horizontal e recombinação genética pode comprometer a análise. Assim, o emprego da metodologia de MLSA (*Multilocus Sequencing Analysis*) tem conferido maior confiabilidade a estudos taxonômicos e de filogenia. Tal metodologia consiste em uma análise concatenada de três a cinco genes do metabolismo basal de bactérias (genes *housekeeping*), os quais permitem a discriminação de espécies bastante próximas, mas que são conservados o suficiente para estabelecer relações filogenéticas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade taxonômica e filogenética de estirpes de *Rhizobium* simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Foram realizados dois estudos, ambos contendo estirpes atualmente classificadas como *Rhizobium tropici*, as quais foram submetidas a uma análise polifásica envolvendo caracterização morfofisiológica (aspectos da colônia, utilização de fontes de carbono e tolerância a antibióticos), genética (BOX-PCR) e filogenética (MLSA). No primeiro estudo, os resultados foram congruentes em todas as análises, onde as cinco estirpes apresentaram características que as distinguiram das demais espécies de *Rhizobium* utilizadas como referência. Nos resultados de BOX-PCR e MLSA, as mesmas formaram *clusters* separados das demais espécies do gênero, reforçando a hipótese de que podem representar uma nova espécie de *Rhizobium*. No segundo estudo, as estirpes apresentaram perfis morfofisiológicos e genéticos pouco similares entre si, e os resultados de MLSA agruparam-nas com diferentes estirpes de referência, apontando diversidade entre as mesmas. Em ambos os estudos a metodologia de MLSA mostrou-se bastante eficiente na definição da posição filogenética das estirpes e forneceu suporte para estudos futuros. A aplicação da análise polifásica foi bastante promissora em ambos os estudos, especialmente no primeiro, onde confirmou os dados obtidos com MLSA e indicou as estirpes como fortes candidatas a novas espécies.

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

DALL'AGNOL, Rebeca Fuzinato. **Polyphasic analysis applied to the taxonomy and phylogeny of rhizobia microsymbionts bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2013. 103p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Agricultural soils submitted to intense and inadequate management practices are physically, chemically and biologically damaged, leading to an impoverishment of nutrients and loss of biological activity, thus inefficient for cultivation. It is known that bacteria called rhizobia can fix the atmospheric N₂, supplying totally or partially the nitrogen needs of plants, with an emphasis on plants of the Leguminosae (=Fabaceae) family. Therefore, the molecular and phylogenetic characterization of indigenous Brazilian rhizobia is important for further studies, in order to increase agricultural productivity without harming the environment. Currently, the phylogeny of 16S rRNA represents the basis of the prokaryotic taxonomy, but its high conservation makes it difficult to identify and classify taxonomically closely related species; besides, the occurrence of horizontal gene transfer and genetic recombination may compromise the taxonomic study. Thus, the use of MLSA (Multilocus Sequencing Analysis) methodology has conferred higher reliability to taxonomic and phylogeny studies. The method consists of a concatenated analysis of three to five genes related to the basal metabolism of bacteria (housekeeping genes), that allow the discrimination of very close species, but that are also sufficiently conserved to allow the establishment of phylogenetic relationships. The objective of this study was to characterize taxonomically and phylogenetically the diversity of *Rhizobium* strains symbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Two studies were conducted, both containing strains currently classified as *Rhizobium tropici* which were submitted to a polyphasic analysis, involving morpho-physiologic (colony morphology, carbon source utilization and antibiotic tolerance), genetic (BOX-PCR) and phylogenetic (MLSA) characterization. In the first study, the results were congruent in all tests, and the five strains showed unique properties, which distinguished them from the other *Rhizobium* species utilized as reference. In the BOX-PCR and MLSA analysis, the strains were grouped separated from the other rhizobial species, reinforcing the hypothesis that they might represent a new species of *Rhizobium*. In the second study, the strains showed highly dissimilar morpho-physiologic and genetic profiles, and the MLSA results clustered them with different reference strains, indicating high diversity within this group. In both studies, the MLSA methodology proved to be of great efficiency in defining the phylogenetic position of the strains, and provided support for further studies. The polyphasic analysis was highly promising, especially in the first study, where it confirmed the data obtained by MLSA and pointed out strains as strong candidates of new species.

Keywords: MLSA. Housekeeping. Rhizobia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formação do nódulo radicular em alfafa.....	19
Figura 2 - Filogenia de rizóbios conforme o gene ribossomal 16S.....	26
Figura 3 - Dendograma baseado nos perfis de DNA pela metodologia de BOX-PCR aplicado às estirpes do Estudo 1.....	52
Figura 4 - Árvore filogenética das estirpes do Estudo 1, baseada no sequenciamento do DNA ribossomal 16S.....	54
Figura 5 - Árvores filogenéticas das estirpes do Estudo 1, baseadas no sequenciamento dos genes <i>housekeeping glnII</i> (A), <i>gyrB</i> (B), <i>gltA</i> (C), <i>recA</i> (D) e <i>rpoA</i> (E), analisados separadamente.....	58
Figura 6 - Árvore filogenética das estirpes do Estudo 1, baseada no sequenciamento dos genes <i>housekeeping glnII</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> e <i>rpoA</i> , analisados conjuntamente (concatenados).....	66
Figura 7 - Dendograma baseado no <i>fingerprinting</i> pela metodologia de BOX-PCR aplicado às estirpes do Estudo 2.....	76
Figura 8 - Árvore filogenética das estirpes do Estudo 2, baseada no sequenciamento do DNA ribossomal 16S.....	77
Figura 9 - Árvore filogenética das estirpes do Estudo 2, baseada no sequenciamento dos genes <i>housekeeping</i> (A) <i>glnII</i> , (B) <i>gyrB</i> , (C) <i>recA</i> , (D) <i>rpoA</i> e (E) <i>dnaK</i> , analisados separadamente.....	85
Figura 10 - Árvore filogenética das estirpes do Estudo 2, baseada no sequenciamento dos genes <i>housekeeping glnII</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoA</i> e <i>dnaK</i> , analisados conjuntamente (concatenados).....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação da tolerância de procariotos a determinados antibióticos através da medição dos halos de inibição.....	40
Tabela 2 - <i>Primers</i> e condições de amplificação utilizadas no Estudo 1.....	43
Tabela 3 - <i>Primers</i> e condições de amplificação para o sequenciamento do 16S rRNA.....	45
Tabela 4 - Propriedades morfológicas das estirpes de <i>Rhizobium</i> utilizadas no Estudo 1.....	47
Tabela 5 - Diferenças entre as estirpes do Estudo 1 e estirpes de referência quanto à utilização de fontes de carbono por API 50CH kit.....	49
Tabela 6 - Tolerância das estirpes do Estudo 1 e estirpes de referência a diferentes antibióticos.....	51
Tabela 7 - Informações sobre as sequências obtidas no Estudo 1.....	57
Tabela 8 - Variação de identidade nucleotídica dentro das estirpes do Estudo 1 e dessas com estirpes de referência de <i>Rhizobium</i> nos genes 16S rRNA, <i>glnII</i> , <i>gltA</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoA</i> e concatenados.....	63
Tabela 9 - <i>Primers</i> e condições de amplificação utilizadas no Estudo 2.....	69
Tabela 10 - Propriedades morfológicas das estirpes de <i>Rhizobium</i> utilizadas no Estudo 2.....	72
Tabela 11 - Tolerância das estirpes do Estudo 2 e estirpes de referência a diferentes antibióticos.....	74
Tabela 12 - Informações sobre as sequências obtidas no Estudo 2.....	80
Tabela 13 - Variação de identidade nucleotídica dentro das estirpes analisadas no Estudo 2 e dessas com as estirpes de referência de <i>Rhizobium</i> nos genes 16S rRNA, <i>glnII</i> , <i>dnaK</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoA</i> e concatenados.....	86
Tabela 14 - Porcentagem da variação de identidade nucleotídica dentro das estirpes analisadas neste estudo de acordo com a região de isolamento, e dessas com as estirpes de referência de <i>Rhizobium</i> mais próximas nos genes <i>glnII</i> , <i>dnaK</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoA</i> e concatenados.....	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	SOLO E NUTRIENTES.....	15
3.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	16
3.2.1	Bactérias Simbióticas Fixadoras de Nitrogênio	18
3.3	TAXONOMIA E FILOGENIA DE PROCARIONTES	21
3.3.1	Taxonomia de Rizóbios	22
3.4	FERRAMENTAS DA ANÁLISE TAXONÔMICA ATUAL	27
3.4.1	DNA Ribossomal 16S e Hibridação DNA-DNA.....	27
3.4.2	Multilocus Sequence Analysis (MLSA).....	29
3.4.3	BOX-PCR	31
3.5	ANÁLISE POLIFÁSICA EMPREGADA NA CLASSIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM	32
4	ESTUDO 1 - CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA NA RECLASSIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM TROPICI ISOLADAS DE DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS	35
4.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1.1	Estirpes Utilizadas e Condições de Cultivo	35
4.1.2	Caracterização Morfológica	36
4.1.2.1	Taxa (manifestação) de crescimento.....	36
4.1.2.2	Diâmetro das colônias	37
4.1.2.3	Alteração do pH (Reação Ácida/Básica).....	37
4.1.2.4	Forma das colônias	37
4.1.2.5	Elevação das colônias.....	37
4.1.2.6	Borda das colônias	37
4.1.2.7	Superfície das colônias	38

4.1.2.8	Produção de muco	38
4.1.2.9	Consistência da massa de crescimento	38
4.1.2.10	Detalhes ópticos	38
4.1.2.11	Cromogênese	39
4.1.3	Caracterização Fisiológica.....	39
4.1.3.1	Utilização de fontes de C.....	39
4.1.3.2	Tolerância a antibióticos	40
4.1.4	Extração de DNA.....	41
4.1.5	Multilocus Sequence Analysis (MLSA)	42
4.1.6	Amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction).....	42
4.1.6.1	Amplificação e purificação do gene ribossomal 16S	42
4.1.6.2	Amplificação dos genes housekeeping	43
4.1.6.3	Amplificação do DNA para a reação de BOX-PCR	43
4.1.7	Sequenciamento dos Genes e Análise Filogenética	44
4.1.8	Análise dos Resultados	45
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.2.1	Caracterização Morfológica	45
4.2.2	Caracterização Fisiológica.....	47
4.2.2.1	Utilização de fontes de carbono	47
4.2.2.2	Tolerância a antibióticos	50
4.2.3	BOX – PCR	51
4.2.4	16S rRNA	52
4.2.5	Diversidade dos Genes glnII, gyrB, gltA, recA e rpoA	54
4.2.6	Multilocus Sequence Analysis (MLSA)	63
4.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
5	ESTUDO 2 - ABORDAGEM POLIFÁSICA NA CARACTERIZAÇÃO DA ESTIRPE PRF 81 E NO ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM ISOLADAS EM SANTA CATARINA, SC.....	66
5.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	68
5.1.1	Estirpes e Condições de Cultura	68
5.1.2	Caracterização Morfológica	68
5.1.3	Caracterização Fisiológica.....	68

5.1.3.1	Tolerância à antibióticos	69
5.1.4	Extração de DNA.....	69
5.1.5	Multilocus Sequence Analysis (MLSA)	69
5.1.6	Amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction).....	70
5.1.7	Sequenciamento dos Genes e Análise Filogenética	70
5.1.8	Análise dos Resultados	70
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.2.1	Caracterização Morfológica	70
5.2.2	Caracterização Fisiológica.....	73
5.2.2.1	Tolerância à antibióticos	73
5.2.2.2	BOX-PCR	75
5.2.3	16S rRNA	76
5.2.4	Diversidade dos Genes dnaK, glnII, gyrB, recA e rpoA	78
5.2.5	Multilocus Sequence Analysis (MLSA)	87
5.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
6	REFERÊNCIAS.....	91

1 INTRODUÇÃO

O manejo intensivo e inadequado dos solos agrícolas brasileiros leva a um contínuo empobrecimento físico, químico e biológico dos mesmos, resultando em limitações para a vida biológica. Uma vez que tais organismos são fundamentais nos processos de ciclagem de nutrientes, organização estrutural e fertilidade dos solos, esta condição se torna alarmante (GILLER, 2001; HUNGRIA; CAMPO, 2005).

Em solos tropicais a fertilidade é reduzida e agravada pelas condições climáticas (altas temperaturas e pluviosidade, que aceleram a decomposição da matéria orgânica, provocando perdas na forma de gases e lixiviação), esgotando ainda mais o aporte de nutrientes. Sabe-se que o nitrogênio (N) é um dos elementos mais requisitados pelas culturas, fazendo com que o desenvolvimento das mesmas seja produtivo ou limitado, de acordo com sua disponibilidade no solo. Um solo escasso em nitrogênio pode levar a perdas agrícolas significativas. No entanto, graças a um grupo de bactérias conhecidas como bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas, a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (N₂) pode suprir, total ou parcialmente, essa carência. Além dos benefícios ecológicos, a utilização dessas bactérias como inoculantes agrícolas em detrimento de fertilizantes nitrogenados promove uma economia significativa para os agricultores. No caso da cultura de soja, Hungria, Campo e Mendes (2007) estimaram uma economia de cerca de 6,6 bilhões/ano no gasto com fertilizantes.

Por essas razões, cada vez mais destacam-se os estudos e o uso da fixação biológica do N₂ por bactérias diazotróficas no fornecimento desse nutriente para os vegetais cultiváveis. Algumas plantas, principalmente da família Leguminosae (=Fabaceae), associam-se intimamente com um grupo de bactérias Gram-negativas, coletivamente denominadas de rizóbios, acarretando na formação de órgãos altamente especializados na fixação biológica de nitrogênio, chamados nódulos radiculares (HUNGRIA *et al.*, 1994; SANTOS; REIS, 2008).

Aproximadamente metade da fixação global de nitrogênio é realizada por rizóbios (WANG; MARTINEZ-ROMERO, 2000), permitindo a comparação da fixação biológica de N₂ à fotossíntese, em termos de importância ecológica. Sendo assim, a caracterização molecular e filogenética de rizóbios nativos de solos brasileiros é uma ação de considerável importância na recomendação de estirpes selecionadas para serem usadas como inoculantes, possibilitando a

utilização mais eficiente destas bactérias nos sistemas de produção agrícola (BRILL, 1979; ZILLI *et al.*, 1998; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009, 2012; DELAMUTA *et al.*, 2012).

Para a classificação adequada das estirpes é necessário realizar testes rigorosos, capazes de determinar características gerais e específicas das culturas bacterianas. Quanto maior a integração de diferentes tipos de dados e informações acerca do microrganismo em estudo, maior a confiabilidade nos resultados. Atualmente, busca-se integrar os estudos fenotípicos, genotípicos e filogenéticos, a fim de se alcançar um melhor consenso taxonômico. Esse estudo integrado é chamado de taxonomia polifásica.

O maior nível da classificação bacteriana consiste no Domínio, compreendendo *Archaea* e *Bacteria*. Para cada Domínio são descritos os Filos, Classes, Ordens, Famílias, Gêneros, Espécies e Subespécies (GARRITY; HOLT, 2001), respeitando-se as regras internacionais descritas pelo “*International Code of Nomenclature of Bacteria*” (SNEATH, 1992; VANDAMME *et al.*, 1996).

Segundo Garrity e Holt (2001), a família Rhizobiaceae possui cinco gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* (=Ensifer) e *Mesorhizobium*. O gênero *Rhizobium* foi descrito pela primeira vez em 1896 por Kirchner e representava o único grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio que se associavam a certas espécies de leguminosas, formando nódulos. O gênero foi criado para diferenciar os rizóbios de outras bactérias do solo, pois as características contidas no código de Ferdinand Cohn (pai da taxonomia), o qual classificava os procariontes conforme tamanho e aparência geral das bactérias, não eram suficientes (COHN, 1942).

Nas décadas seguintes, o advento de novas técnicas de biologia molecular suscitou um grande avanço na taxonomia procariótica. Os conceitos iniciais das relações evolutivas entre microrganismos puderam ser estudados através de moléculas biológicas, que foram utilizadas como registros históricos. Aliado a isso, o desenvolvimento de técnicas cada vez mais elaboradas de análises de sequências gênicas (análises microbiológicas e genéticas aliadas a *softwares* sofisticados) implicou em um volume cada vez maior de dados, permitindo a descoberta e a reclassificação de espécies, ou complementando dados de espécies já existentes (KLENK; GOKER, 2010).

Pesquisas que visem à classificação e descrição de espécies com potenciais agronômicos contribuem largamente para a descoberta de estirpes cada vez mais eficientes e adaptadas aos solos e culturas brasileiras. O empenho em se utilizar rizóbios como inoculantes agrícolas é justificável pelos benefícios que os mesmos proporcionam, tanto ecológicos quanto econômicos, sendo os estudos envolvendo tais bactérias de interesse global. Nesse contexto, este estudo teve por objetivo utilizar uma abordagem polifásica para obter uma melhor definição da posição taxonômica e sobre as relações filogenéticas de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade taxonômica e filogenética de estirpes de *Rhizobium* microsimbiontes de feijão identificadas como fortes candidatas a novas espécies.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterização fenotípica das estirpes quanto à utilização de diferentes fontes de carbono e tolerância a antibióticos, dentre outros parâmetros.
- b) Avaliar a diversidade genética das estirpes por meio da técnica de BOX-PCR.
- c) Utilizar a metodologia de MLSA (*Multilocus Sequencing Analysis*) para inferir as relações filogenéticas entre as estirpes analisadas.
- d) Realizar uma análise polifásica de todas as características avaliadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SOLO E NUTRIENTES

As práticas de manejo intensivo e inadequado dos solos brasileiros levam a um empobrecimento físico, químico e biológico, resultando em solos desestruturados, suscetíveis à erosão, deficientes em relação ao aporte de nutrientes e, portanto, ineficazes para servirem de hábitat à vida biológica. Tal condição é preocupante, uma vez que tais organismos são fundamentais aos processos de ciclagem de nutrientes, organização estrutural e fertilidade dos solos, acarretando em um empobrecimento contínuo (GILLER, 2001; HUNGRIA; CAMPO, 2005).

Com o crescimento populacional (estima-se que deva atingir oito bilhões em 2030) há uma demanda cada vez maior na oferta de alimentos, os quais são frequentemente cultivados em áreas impróprias, com excesso de fertilizantes e defensivos agrícolas danosos ao solo, o que agrava ainda mais a degradação ambiental. Dessa forma, o desenvolvimento de tecnologias que garantam a segurança alimentar e, ao mesmo tempo, preservem os recursos naturais torna-se necessário. De 1960 até os dias atuais, cerca de 8,7 bilhões de hectares de terras agricultáveis, pastagens permanentes e florestas do mundo já foram degradadas (CASSMAN, 1999; FRESCO, 2003; NORSE, 2003; PINSTRUP-ANDERSEN, 2003). No Brasil, a deterioração é acentuada pelos estresses ambientais frequentes, como temperaturas elevadas e longos períodos de estiagem, além do fato de muitas regiões do solo brasileiro apresentarem conteúdo e composição de nutrientes aquém dos necessários para cultivos de interesse agrônômico (HUNGRIA; VARGAS, 2000; HUNGRIA; CAMPO, 2005).

Sabe-se que o nitrogênio (N) e o fósforo (P) são nutrientes exigidos pelas culturas em grandes quantidades e, por isso, têm relação direta com a produtividade agrícola. A carência de P é, geralmente, suprida com fertilizantes fosfatados, disponíveis comercialmente. No entanto, diversos microrganismos, em especial fungos micorrízicos, são capazes de incrementar a captação do P pelas plantas, uma vez que se associam intimamente com as raízes, aumentando a área de absorção do mesmo. O P possui mobilidade muito baixa no solo, sendo sua captação, muitas vezes, prejudicada pela incapacidade da raiz do vegetal alcançar

as regiões mais abastadas do mineral (MALAVOLTA, 2006). Além das micorrizas, bactérias do gênero *Pseudomonas* (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; PEIX *et al.*, 2003) e outros gêneros de fungos já utilizados como inoculantes em alguns países, como *Aspergillus* e *Penicillium*, são capazes de solubilizar fontes fosfatadas pouco disponíveis para os vegetais.

Já a carência de N pode ser suprida, total ou parcialmente, pelo processo da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N₂). Tal processo vem recebendo atenção crescente, pois além de prover a demanda de N requerida pela planta, constitui um procedimento não danoso ao meio ambiente, enriquecendo o solo e evitando as perdas de nutrientes por lixiviação (MALAVOLTA, 2006; HUNGRIA; CAMPO, 2007). Ainda, a substituição de fertilizantes nitrogenados por inoculantes bacteriológicos reduz os custos da produção agrícola, visto que a produção de fertilizantes se dá através de derivados do petróleo, sujeitos a ajustes constantes no preço, e os utilizados no Brasil são, em sua maioria, importados, ou seja, cotados em dólares.

3.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O N é o quarto elemento mais abundante nos vegetais, presente na estrutura de ácidos nucleicos, bases nitrogenadas, hormônios, proteínas, entre outras moléculas de grande importância para a sobrevivência do organismo, sendo por isso fundamental em diversos processos metabólicos. Nas células vegetais, o nitrogênio representa cerca de 8 a 16% da sua composição, sendo superado apenas pelo carbono (C), pelo oxigênio (O) e pelo hidrogênio (H) (MORGANTE, 2003).

Nos solos pouco férteis das regiões tropicais o nitrogênio é o elemento que mais limita o desenvolvimento das plantas. Suas fontes constituem o solo, essencialmente na forma orgânica (98%), mas também nas formas inorgânicas amônia (NH₃, convertida em NH₄⁺ em contato com H₂O), nitratos (NO₃⁻) e nitritos (NO₂⁻) (MORGANTE, 2003; ALFAIA, 2006), resultantes da decomposição da matéria orgânica; os fertilizantes nitrogenados; os processos de fixação não-biológica, decorrentes de descargas elétricas (promovem a oxidação do N₂ em NO₃), combustão e vulcanismo (liberação de NH₃); e o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) (BRILL, 1979; POSTGATE; HILL, 1979; POSTGATE, 1982; NEWTON, 2000; MALAVOLTA, 2006). A atmosfera, apesar de conter quase

80% de nitrogênio na forma gasosa (N_2), não representa uma fonte disponível para as plantas, nem para outros organismos eucariontes, que são incapazes de absorver o gás nitrogênio e convertê-lo em uma forma assimilável. Tal inabilidade deve-se à tripla ligação existente entre os dois átomos de N, uma das mais fortes ligações já registradas na natureza (HUNGRIA *et al.*, 1994). Somente microrganismos conhecidos como fixadores de nitrogênio possuem o aparato enzimático capaz de converter a forma gasosa do nitrogênio em formas assimiláveis pelas plantas (ZILLI *et al.*, 1998).

Com o cultivo, o reservatório de nitrogênio do solo pode ser rapidamente esgotado. Além disso, as condições climáticas dos solos brasileiros (alta temperatura e umidade) aceleram a decomposição da matéria orgânica, levando a perdas na forma de gases e por lixiviação, antecipando o esgotamento do nutriente no solo (MALAVOLTA, 2006; MELO; ALLEONI, 2009). As perdas na forma de gases ocorrem porque no solo também existem bactérias que convertem o NH_4^+ em NO_2^- (*Nitrossomonas* sp.) e, depois, em NO_3^- (*Nitrobacter* sp.) – bactérias nitrificantes – sendo este último transformado em gás N_2 por bactérias desnitrificantes. Os fertilizantes nitrogenados, obtidos pela fixação industrial (também chamado processo de Haber-Bosch) fornecem nitrogênio na forma amoniacal (NH_4^+). No entanto, o processo é bastante dispendioso, requerendo altas temperaturas (cerca de 300 a 600° C), pressões (100 a 800 atm), hidrogênio derivado de petróleo e catalisador contendo ferro (ALFAIA, 2006; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007, MME, 2009). Além do alto custo, grande parte do N presente nos fertilizantes é incorporado nas substâncias húmicas por imobilização (transformação do N inorgânico para N orgânico) por certos grupos de microrganismos do solo — cerca de 20 a 50% (CASSMAN, 2003; ALFAIA, 2006, MELO; ALLEONI, 2009) — ou perdidos por lixiviação, sendo este último responsável pela poluição de rios, lagos e lençóis freáticos (CASSMAN, 2003; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009). Segundo Kelley e Stevenson (1995), aproximadamente 1/3 do N contido nos fertilizantes aplicados em um primeiro cultivo permanece no solo na forma orgânica, sendo menos de 15% aproveitado no cultivo seguinte.

Por essas razões, cada vez mais destaca-se a pesquisa e o uso da fixação biológica de N_2 por bactérias denominadas fixadoras de N_2 ou diazotróficas, visando o fornecimento desse nutriente para os vegetais cultiváveis. A fixação é possível porque esse grupo de procariontes possui uma enzima chamada

dinitrogenase, a qual possui subunidades proteicas capazes de transportar elétrons para que a redução do N_2 ocorra. Essas subunidades correspondem à Ferro-proteína (Fe-proteína) e à Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína). A redução do N_2 se dá por várias transferências de elétrons, e requer alta quantidade de ATP (Adenosina Trifosfato). A unidade de Fe-proteína recebe elétrons de uma terceira molécula, que também auxilia esse processo, a ferredoxina. Após recebê-lo, a Fe-proteína doa elétrons para a MoFe-proteína, que os acumula até concentrar oito elétrons. Somente com os oito elétrons é que a redução completa do N_2 a NH_3 ocorre pela reação $N_2 + 16 ATP + 8e^- + 8H^+ \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$ (MORGANTE, 2003; MALAVOLTA, 2006).

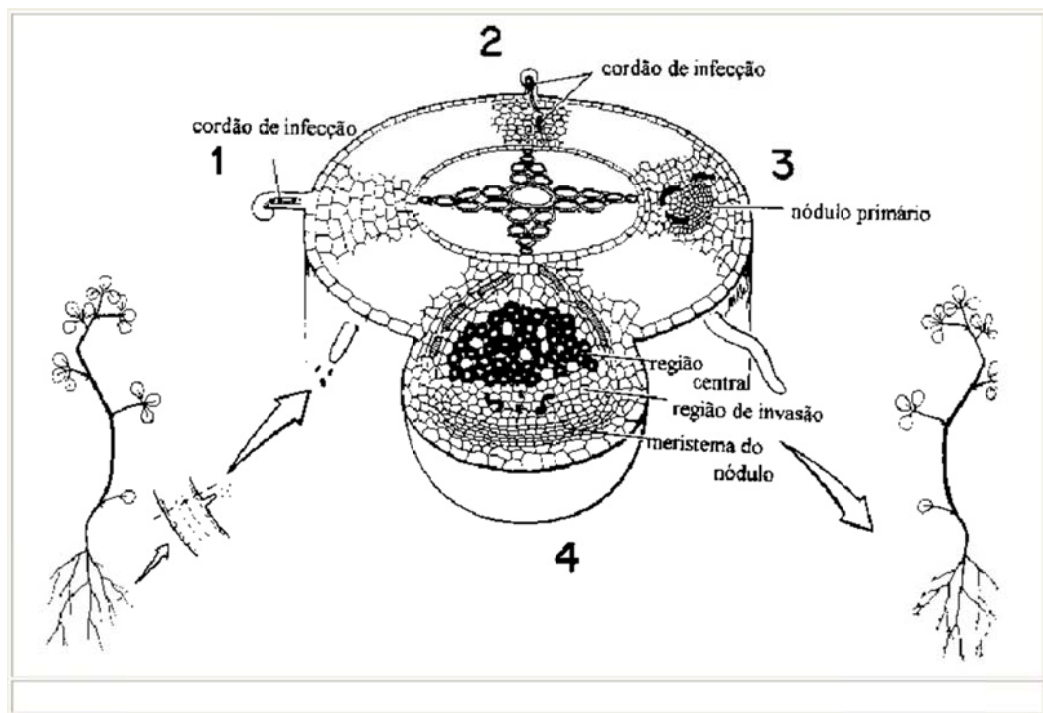
3.2.1 Bactérias Simbióticas Fixadoras de Nitrogênio

Diferentes graus de associação da bactéria com a planta são observados na natureza, sendo essa especificidade utilizada como critério de classificação. Como exemplo, têm-se as associativas (associam-se a raízes de plantas, sem invadir as células), endofíticas (invadem as células, mas não provocam formação de nódulos) e simbióticas, (POSTGATE, 1982; MAGNANI, 2005; MOREIRA *et al.*, 2010). A este último grupo pertencem gêneros de bactérias Gram-negativas coletivamente denominadas de rizóbios, albergando os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* (=Ensifer) e *Mesorhizobium* (GARRITY; HOLT, 2001). A simbiose ocorre principalmente com determinadas espécies da família Leguminosae (=Fabaceae), acarretando na formação de órgãos altamente especializados na fixação biológica de nitrogênio, chamados nódulos radiculares (HUNGRIA *et al.*, 1994; SANTOS; REIS, 2008).

A formação de nódulos (Figura 1) é um processo complexo, envolvendo várias etapas de alterações fisiológicas e morfológicas, tanto na planta hospedeira, quanto na bactéria. Eles consistem principalmente de células da planta que sofreram alterações estruturais para conter inúmeros grupos de bactérias individualizadas por uma membrana, os bacteroides, formas endo-simbióticas de células bacterianas que sofreram várias modificações bioquímicas e se tornaram especializadas na fixação biológica do N_2 (MORGANTE, 2003; SANTOS; REIS, 2008). Tais mudanças visam à obtenção de carboidratos pela bactéria que,

abastecida com fontes de ATP, possui o poder redutor necessário ao processo de formação de NH_3 a partir do N_2 , à qual logo são incorporados prótons, passando a NH_4^+ . Como os íons de amônio são tóxicos para a planta, eles são rapidamente convertidos em compostos orgânicos, como as amidas e ureídos, capazes de nutrir a planta hospedeira (HUNGRIA *et al.*, 1994).

Figura 1 - Formação do nódulo radicular em alfafa.



Fonte: (MORGANTE, 2003).

A intrincada interação molecular entre bactérias simbióticas e as plantas hospedeiras na complexa formação dos nódulos permite às bactérias simbióticas viverem saprofiticamente no solo e, a partir do momento em que recebem sinais químicos sintetizados pela planta hospedeira, iniciar o processo de infecção (DROZDOWICZ, 1997; MORGANTE, 2003; SANTOS; REIS, 2008). Os sinais geralmente correspondem a flavonoides, moléculas que atraem as bactérias para a região da rizosfera por quimiotactismo positivo e que são, também, responsáveis por produzirem indutores da transcrição de genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) das bactérias, resultando na síntese dos fatores de nodulação (Nod). Esses fatores são moléculas de lipo-quitino-oligossacarídeos, determinantes para o reconhecimento entre a bactéria e a planta hospedeira e pela indução de uma intensa divisão celular no córtex da raiz. Após responderem aos sinais quimiotáticos

e atingirem a rizosfera, as bactérias se multiplicam, colonizando os tricomas (pelos) radiculares. Os tricomas enrolam-se, envolvendo grupos de bactérias que, em seguida, degradam uma porção da parede celular do tricoma, levando à invaginação do plasmalema. Por fim, as bactérias invadem o tricoma através do canal formado pela invaginação do plasmalema, dando origem ao cordão de infecção (HUNGRIA *et al.*, 1994; MORGANTE, 2003).

O cordão de infecção cresce em direção às células em divisão no córtex da raiz. No seu interior, as bactérias continuam se multiplicando. Essa região do córtex da raiz, com intensa divisão celular, recebe o nome de nódulo primário. Quando o cordão de infecção chega às proximidades do nódulo primário, ele se ramifica para invadir as células vegetais. Pequenos grupos de bactérias são liberados dentro do citoplasma das células vegetais no nódulo primário, envoltas por membranas derivadas do cordão de infecção. Assim, a célula vegetal passa a conter vários grupos de bactérias individualizadas em membranas. A partir do estabelecimento do nódulo radicular, essas bactérias param de se multiplicar, aumentam em tamanho e sofrem as alterações bioquímicas que as tornam especializadas em fixação de N₂, caracterizando-as como bacteroides (MORGANTE, 2003).

Para que a relação simbiótica entre a planta hospedeira e o rizóbio possa ocorrer é necessário que as bactérias portem genes responsáveis pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), denominados genes *nif* e *fix*, e pelo processo de nodulação, chamados genes *nod* *nol* e *noe* (HUNGRIA; STACEY, 1997; MORGANTE, 2003; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009). Esses genes estão localizados em elementos genômicos potencialmente transferíveis, que podem ser plasmídeos ou megaplasmídeos, nas espécies de *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium amorphae* e *Mesorhizobium huakuii*, ou regiões cromossômicas transferíveis, em *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (WANG; MARTÍNEZ-ROMERO, 2000; SANTOS; REIS, 2008).

Aproximadamente metade da fixação global de nitrogênio é realizada por rizóbios (WANG; MARTINEZ-ROMERO, 2000), evidenciando a sua importância ecológica e econômica (no Brasil, o uso de inoculantes de rizóbio em soja reduzem em cerca de 6,6 bilhões de dólares/ano os gastos com fertilizantes - a demanda nacional atual gira em torno de dois milhões de toneladas por ano)

(HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Sendo assim, a caracterização molecular e filogenética de rizóbios nativos de solos brasileiros é uma ação de considerável importância para a recomendação de estirpes selecionadas para serem usadas como inoculantes, possibilitando a utilização mais eficiente destas bactérias nos sistemas de produção agrícola (BRILL, 1979; ZILLI *et al.*, 1998; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; DELAMUTA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2009, 2012).

3.3 TAXONOMIA E FILOGENIA DE PROCARIONTES

A taxonomia bacteriana, também chamada sistemática bacteriana ou biosistemática, pode ser definida como a ciência que lida com a classificação (ordenação dos microrganismos em taxas, de acordo com a similaridade entre eles), identificação (alocação de estirpes desconhecidas dentro de grupos taxonômicos condizentes com suas características) e nomenclatura (nomeação dos grupos taxonômicos de acordo com as regras internacionais descritas pelo “*International Code of Nomenclature of Bacteria*”) (SNEATH, 1992; VANDAMME *et al.*, 1996). O maior nível da classificação bacteriana consiste no Domínio, representados por *Archaea* e *Bacteria*. Para cada Domínio são descritos os Filos, Classes, Ordens, Famílias, Gêneros, Espécies e Subespécies (GARRITY; HOLT, 2001).

Uma classificação apropriada deve estar baseada em processos rigorosos, a fim de evitar erros ou dúvidas durante o desenvolvimento de uma pesquisa científica, ou durante a reprodução de um produto baseado em culturas microbianas. Atualmente, busca-se a integração de diferentes tipos de dados e informações acerca do microrganismo em estudo, o que fornece um melhor consenso taxonômico. Este estudo integrado é chamado de taxonomia polifásica, e consiste em análises fenotípicas, genotípicas e filogenéticas, as quais contribuem para uma completa definição da biosistemática moderna.

As informações fenotípicas são obtidas através de estudos envolvendo a expressão dos genes, como análises de proteínas e suas funções, marcadores quimiotaxonômicos, ou outras características que correspondam à expressão final dos genes. Dentre elas, incluem-se análises de morfologia, fisiologia, sorologia, perfil de ácidos graxos celulares e exopolissacarídeos, padrões enzimáticos (*Multilocus Enzyme Electrophoresis* - MLEE), entre outros (GILLIS, *et al.*, 1995; VANDAMME *et al.*, 1996).

As técnicas fenotípicas são utilizadas principalmente como meio de complementariedade, dando maior sustentabilidade aos dados obtidos de uma determinada espécie. Isto porque o conhecimento pleno de um genoma não pode ser obtido apenas com informações fenotípicas, uma vez que a expressão destes pode ser alterada conforme as condições ambientais e laboratoriais.

Nos estudos genotípicos são analisados os ácidos nucleicos (DNA e RNA) como moléculas informativas. Diversas técnicas podem ser empregadas para se obterem as informações pretendidas, como porcentagem de G+C, hibridação DNA-DNA, padrões de restrição (RFLP, PFGE), sequenciamento de genes e PCR-*fingerprinting*, entre outras (VANDAMME *et al.*, 1996; STACKEBRANDT *et al.*, 2002).

A metodologia de análise a ser utilizada vai depender do objetivo do estudo, como o nível de resolução taxonômica que se deseja obter. Para atingir classificações em nível de gênero ou espécie, nem sempre é necessária a aplicação de mais de uma técnica; no entanto, quando se deseja descrever uma nova espécie, são necessárias técnicas fenotípicas, genotípicas e filogenéticas. Atualmente, conta-se com um grande volume de informações de sequências de nucleotídeos e aminoácidos, de diversas espécies de microrganismos, que podem ser acessadas pela internet a qualquer momento. O desenvolvimento de técnicas cada vez mais elaboradas de análises de sequências gênicas (análises microbiológicas e genéticas aliadas a *softwares* sofisticados) implica no aprimoramento de programas matemáticos, estatísticos e computacionais, utilizados para a organização e avaliação dos dados. Esse grande volume de dados reflete a importância que estas técnicas, especialmente o sequenciamento do DNA, conquistaram dentro de diferentes ramos da Ciência, sobretudo na ciência taxonômica (KLENK; GOKER, 2010).

3.3.1 Taxonomia de Rizóbios

O gênero *Rhizobium*, descrito pela primeira vez em 1896 por Kirchner, a partir de características fenotípicas, representava o único grupo de bactérias nodulantes fixadoras de nitrogênio, conhecidas por se associarem simbioticamente com leguminosas. Em 1932, Fred, Baldwin e McCoy descreveram a espécie *Rhizobium phaseoli*, nodulante do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Nessa

época, Ferdinand Conn, considerado pai da taxonomia bacteriana, publicou um código para a classificação de procariontes baseado no tamanho e aparência geral das bactérias (CONN, 1942). Mais tarde, os rizóbios foram reclassificados em *Rhizobium leguminosarum*, com três biovars, nomeados de acordo com a planta hospedeira, bv. *viciae* (*Pisum sativum*), bv. *trifolii* (*Trifolium spp.*) e bv. *phaseoli* (*Phaseolus vulgaris*) (JORDAN, 1984; RIBEIRO *et al.*, 2009; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009).

No entanto, essas características (tamanho e aparência geral), bem como outros aspectos fenotípicos considerados no início do século XX com o Manual de Bergey (BERGEY *et al.*, 1923), não diferenciavam os rizóbios de outras bactérias do solo. A partir de então, todas as bactérias que possuíam capacidade nodulífera eram alocadas no gênero *Rhizobium*, sendo esta a característica considerada para diferenciá-las de outras bactérias do solo (COHN, 1942; ORLA-JENSEN, 1909 **apud** RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009). Em 1974, quando o Manual de taxonomia Bergey foi oficialmente validado, seis espécies de *Rhizobium*, foram descritas, utilizando como critério a inoculação cruzada (conceito de que cada rizóbio nodulava apenas uma espécie de Leguminosae) entre o microsimbionte e a planta hospedeira, os quais correspondem às espécies *Rhizobium leguminosarum*, *R. japonicum*, *R. lupini*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* e *R. trifoli* (JORDAN; ALLEN, 1974).

Esse mesmo conceito de inoculação cruzada foi utilizado para descrever espécies de *Agrobacterium*, também incluídas na família Rhizobiaceae, diferindo de *Rhizobium* por apresentarem, em seu plasmídeo, genes de patogenicidade ao invés de genes de nodulação. No entanto, essa concepção foi desconsiderada, visto que uma única espécie de leguminosa pode abrigar mais de uma espécie de bactéria (promiscuidade na nodulação), como é o caso do feijoeiro (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991; VARGAS; HUNGRIA, 1997; MICHIELS *et al.*, 1998).

Nas décadas seguintes, características fisiológicas, bioquímicas e genéticas passaram a ser consideradas na classificação bacteriana de rizóbios, permitindo a divisão dos mesmos em dois grupos, os de crescimento rápido ou crescimento lento, ainda dentro do gênero *Rhizobium* (JORDAN; ALLEN, 1974; BUCHANAN, 1980). A seguir, em 1982, surgiu o gênero *Bradyrhizobium*, sendo a nomenclatura referente à baixa taxa de crescimento (*bradus* = lento) dos exemplares

de *Rhizobium japonicum*, que passou, então, a ser reclassificada como *Bradyrhizobium japonicum* (JORDAN, 1982, 1984).

Posteriormente, mais quatro gêneros foram inseridos na família Rhizobiaceae, sendo eles: *Azorhizobium* (DREYFUS; GARCIA; GILLIS, 1988), *Mesorhizobium* (JARVIS *et al.*, 1997), *Sinorhizobium* (CHEN; YAN; LI, 1988) e *Allorhizobium* (DE LAJUDIE *et al.*, 1998), o qual voltou a pertencer ao gênero *Rhizobium*, segundo Rivas, García-Fraile e Velázquez (2009).

Com o advento de novas técnicas de biologia molecular, a taxonomia procariótica passou por uma verdadeira revolução. Ideias iniciais de Zuckerkandl e Pauling (1965), os quais propuseram que a relação evolutiva entre microrganismos pode ser estudada utilizando-se moléculas biológicas como registros históricos, foram aplicadas nas novas metodologias, como reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento molecular (INNES *et al.*, 1988; SAIKI *et al.*, 1988; WINSHIP, 1989).

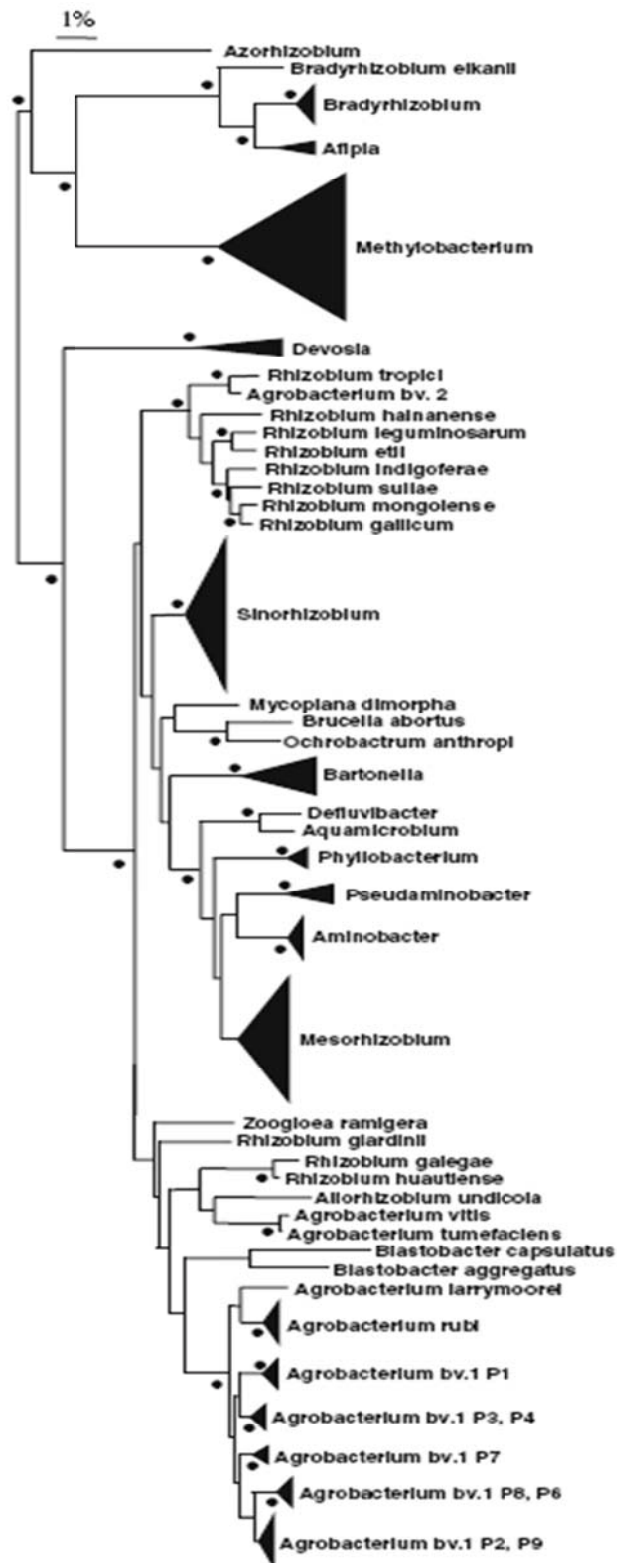
De acordo com a taxonomia atual, os rizóbios encontram-se classificados como pertencentes a: Domínio: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Classe: Alphaproteobacteria; Ordem: Rhizobiales; distribuídos nas Famílias Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Methylobacteriaceae e Hiphomicrobiaceae; e compreendendo dez gêneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Blastobacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (GARRITY; HOLT, 2001; NCBI, 2011). Em número, as espécies descritas, para os respectivos gêneros são: duas de *Azorhizobium*, 14 de *Bradyrhizobium*, 14 de *Devosia*, oito de *Phyllobacterium*, 17 de *Ochrobactrum*, cinco de *Blastobacter*, 23 de *Mesorhizobium*, 41 de *Methylobacterium*, 63 de *Rhizobium* e 13 de *Sinorhizobium* (STRAININFO, 2012).

Agrobacterium, apesar de constituir um gênero à parte, ainda possui uma classificação imprecisa dentro de Rhizobiacea. Alguns autores consideram a relação *Agrobacterium* – *Rhizobium* próxima o suficiente para ser incluída no mesmo gênero (YOUNG *et al.*, 2001; YOUNG, 2003); outros afirmam que as diferenças entre os gêneros são suficientes para distingui-los (FARRAND; VAN BERKUM; OGER, 2003). Pesquisas filogenéticas com base em genes conservados como o 16S rRNA e genes do metabolismo basal revelaram uma posição muito próxima de *Agrobacterium* ao gênero *Rhizobium*, sendo necessários mais estudos para definir a taxonomia apropriada deste gênero (RIBEIRO *et al.*, 2009). A nomenclatura de

Sinorhizobium também é controversa; propôs-se a união de todos os microrganismos classificados como *Sinorhizobium* para o gênero *Ensifer* (MARTENS *et al.*, 2007; YOUNG, 2003), uma vez que este último possui prioridade quanto à data de publicação (1982 para *Ensifer* e 1988 para *Sinorhizobium*), porém, tal modificação ainda gera implicações quanto à validade do táxon (YOUNG, 2010).

Algumas espécies de bactérias capazes de nodular e fixar N₂ em simbiose com leguminosas foram identificadas como pertencentes à classe das Betaproteobacteria; Ordem: Burkholderiales; Família: Burkholderiaceae; gênero: *Burkholderia* (MOULIN *et al.*, 2001). A Figura 2 apresenta a relação dos gêneros e similaridades entre eles, conforme Willems (2006), que ainda considera *Agrobacterium* e *Allorhizobium* como gêneros distintos dentro de Rhizobiaceae.

Figura 2 - Filogenia de rizóbios conforme o gene ribossomal 16S



Fonte: (WILLEMS, 2006)

3.4 FERRAMENTAS DA ANÁLISE TAXONÔMICA ATUAL

3.4.1 DNA Ribossomal 16S e Hibridação DNA-DNA

Um dos estudos envolvendo macromoléculas consiste na utilização do gene ribossomal 16S como marcador filogenético universal para procariontes. Os principais motivos desta escolha estão baseados no fato do 16S rRNA ser um gene envolvido na síntese proteica e, portanto, universal; no fato de a taxa de evolução do mesmo ser baixa, retendo informações filogenéticas valiosas; e por acreditar-se que eventos de transferência horizontal seriam raros nesses genes (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990; HARRIS *et al.*, 2003).

Assim, tanto o 16S rRNA como outros genes conservados evolutivamente e com potencial para refletir relações evolutivas entre os microrganismos começaram a ser utilizados como relógios moleculares. As substituições nucleotídicas no DNA são consideradas diretamente proporcionais ao tempo evolutivo transcorrido na diferenciação das espécies, permitindo-se estimar o tempo e o grau de divergência entre as espécies (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005).

A classificação em nível de espécie, unidade básica da taxonomia, requer que a estirpe desconhecida apresente 70% ou mais de similaridade com a estirpe-tipo, por hibridação DNA-DNA (HDD) e 5°C, ou menos, nos valores de ΔT_m (diferença na temperatura de *melting*, ou seja, diferença na temperatura de desnaturação da dupla fita entre os híbridos e os homólogos, em condições padronizadas) (VANDAMME *et al.*, 1996; GEVERS *et al.*, 2005). A HDD permite a comparação dos genomas inteiros das duas espécies analisadas, por similaridade de pareamento entre as fitas de DNA. Ao misturarem-se dois genomas distintos, desnaturá-los e, sob condições controladas, promover a reassociação das fitas, as moléculas resultantes conterão uma fita de cada DNA (molécula híbrida). Quanto maior for a similaridade entre as sequências de bases nitrogenadas, maior será a interação entre as diferentes fitas e, portanto, maior a temperatura necessária para dissociá-las. Dessa forma, se na molécula de DNA original a temperatura necessária para a reassociação é de 50°C e, na molécula híbrida, essa temperatura for de 48°C, tem-se uma diferença de apenas 2°C na T_m , indicando alta similaridade.

Apesar de amplamente utilizada, a hibridação apresenta variações nos valores quando reproduzida em diferentes laboratórios (VANDAMME *et al.*, 1996; GEVERS *et al.*, 2005) e constitui um procedimento extremamente laborioso, de alto custo, o que dificulta as análises, especialmente em países de maior biodiversidade, onde se requer a hibridação de um grande número de estirpes. Além disso, não existe um banco de dados que permita a comparação de resultados obtidos por HDD entre diferentes estudos (RAMOS *et al.*, 2011).

Em relação ao gene 16S rRNA, admite-se que bactérias apresentando sequências com menos de 97% de similaridade com a espécie-tipo possam representar uma nova espécie (VANDAMME *et al.*, 1996). Com os resultados de análises envolvendo esse gene, podem-se identificar estirpes desconhecidas por comparação de suas sequências com sequências já disponíveis em bancos de dados (GEVERS *et al.*, 2005). A utilização do gene ribossomal 16S tem vantagens como: 1) são encontrados em todos os organismos vivos, uma vez que os organismos não viveriam sem proteínas ribossomais; 2) sua estrutura, altamente conservada, permite o alinhamento correto das sequências nucleotídicas; 3) são componentes principais da estrutura dos ribossomos e, portanto, abundantes nas células, facilitando a sua identificação; 4) diferenças nas sequências desses genes indicam evoluções em taxas diferentes, elucidando as relações filogenéticas (WOESE, 1987; DELONG; WICKHAM; PACE, 1989; AMANN; KRUMHOLZ; STAHL, 1990; WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990; WEISBURG *et al.*, 1991; WILLEMS; COLLINS, 1993; OLSEN; WOESE; OVERBEEK, 1994; VANDAMME *et al.*, 1996; MARTÍNEZ-ROMERO; CABALLERO-MELLADO, 1996; PACE, 1997; VAN BERKUM *et al.*, 1998; GARRITY; HOLT, 2001; CANNONE *et al.*, 2002).

No entanto, assim como na hibridação DNA-DNA, estudos recentes indicam que a análise filogenética com base apenas no gene ribossomal 16S pode resultar em dados incongruentes (MARTENS *et al.*, 2007). Isso porque o 16S rRNA apresenta um grau muito elevado de conservação, podendo não diferenciar estirpes pertencentes a espécies distintas, porém, com nível elevado de similaridade no 16S rRNA. Além disso, há evidências de que esses genes podem sofrer transferência horizontal e recombinação, resultando em sequências mosaicas (VAN BERKUM *et al.*, 2003; GEVERS *et al.*, 2005; VINUESA *et al.*, 2005; MARTENS *et al.*, 2007), quebrando o pressuposto evolucionário de que em genes ribossomais não ocorriam tais processos. Dessa forma, embora os genes ribossomais ainda sejam as

macromoléculas mais utilizadas para estimar as relações filogenéticas entre as bactérias, a intensidade da divergência na sequência do gene 16S rRNA é limitada e insuficiente para distinguir claramente as espécies (OLSEN; WOESE, 1993; LUDWIG; SCHLEIFER, 1994; BARRERA *et al.*, 1997; WANG; MARTÍNEZ-ROMERO, 2000; COENYE *et al.*, 2001; COENYE; VANDAMME, 2003). Tais observações implicam na necessidade de utilização de outras metodologias que possam complementar os resultados do gene 16S e da hibridação DNA-DNA na análise filogenética.

3.4.2 Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

Uma nova estratégia para os estudos de taxonomia e filogenia bacteriana consiste na análise conjunta de múltiplos genes (*loci*), os quais apresentem taxa de evolução mais rápida do que os genes ribossomais, mas com nível de conservação suficientemente alto para conter informações evolutivas (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; GEVERS *et al.*, 2005; MARTENS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009). Assim, a análise conjunta desses vários genes funcionaria como um “tampão” contra os efeitos de recombinação genética ou transferência horizontal ocorridos em um único gene, além de esclarecer a distinção entre espécies altamente relacionadas.

Tendo em vista essa estratégia, muitos grupos bacterianos foram estudados de acordo com a metodologia de *Multilocus Sequence Typing* (MLST), que consiste no sequenciamento e análise conjunta (uma única sequência concatenada) de, no mínimo, cinco genes *housekeeping* (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; ZEIGLER, 2003; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009), os quais consistem em genes relacionados ao metabolismo celular, ou seja, genes essenciais para a sobrevivência do microrganismo. Segundo Zeigler (2003) e Thompson *et al.* (2005), a escolha dos genes *housekeeping* precisa obedecer alguns critérios, como: 1) estarem no genoma em uma única cópia; 2) estarem distribuídos no genoma com uma distância mínima entre os genes de 100 kb; 3) apresentarem extensão nucleotídica suficiente para permitir o sequenciamento; e 4) devem conter informações suficientes para a análise.

Baseada na MLST foi proposta a metodologia de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*), a fim de ser aplicada na taxonomia bacteriana para a definição de espécies. Na metodologia de MLSA são utilizados grupos de linhagens representativas de um gênero, e os estudos incluem análises filogenéticas, com base em sequências presentes em todas as linhagens representativas do táxon (gênero ou família). Devido a estas características o MLSA tem demonstrado alto poder de resolução, permitindo a discriminação de estirpes em nível de espécie (ZEIGLER, 2003; GEVERS *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2009) que não seriam atingidas somente com a análise do gene 16S rRNA.

A diferença, em relação ao MLST, está pautada no fato de que, por MLSA, se utilizam grupos mais diversos de estirpes e os genes não são necessariamente *housekeeping*, mas estão presentes em todos os microrganismos em análise e cumprem os mesmos requisitos do MLST, incluindo um critério a mais na escolha dos genes, que é a necessidade dos mesmos apresentarem dados correlacionados com os obtidos com o gene ribossomal 16S e com os percentuais de similaridade obtidos por hibridação DNA-DNA (GEVERS *et al.*, 2005; MENNA *et al.*, 2009b; MARTENS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009).

Na análise das sequências geradas por MLSA são utilizados programas com algoritmos capazes de calcular a distância evolutiva entre as linhagens, permitindo, assim, a distinção em nível de espécie; já na metodologia de MLST é possível identificar apenas o grau de similaridade entre as sequências em estudo (GEVERS *et al.*, 2005), sendo utilizada em estudos onde se deseja discriminar estirpes em nível intraespecífico, ou seja, estirpes de uma mesma espécie.

Dessa maneira, a metodologia de MLSA aparece como uma ferramenta bastante útil no fornecimento de informações sobre o processo de identificação e evolução bacteriana, permitindo um melhor entendimento das interações biológicas e, conseqüentemente, auxiliando amplamente na conservação e restauração biológica. Ainda, tal metodologia pode contribuir em outros estudos, por exemplo, de diversidade bacteriana, que refletem os distúrbios causados no solo pela agricultura, poluição e outros estresses (ELLIOT; LYNCH, 1994; ZILLI *et al.*, 2003), para aprimorar o entendimento da qualidade do solo e o desenvolvimento de agrossistemas sustentáveis (THOMAS; KEVAN, 1993) e colabora com a identificação de bactérias com elevado potencial agrônomo.

Alguns dos genes *housekeeping* utilizados nos últimos anos como marcadores filogenéticos na classificação de estirpes de rizóbios são o *atpD* e o *recA* (GAUNT *et al.*, 2001; ZEIGLER, 2003; MENNA; HUNGRIA; BARCELLOS, 2009a; RIBEIRO *et al.*, 2009; REN *et al.*, 2011), o *glnA* e o *glnB* (WERNEGREN; RILEY, 1999; TURNER; YOUNG, 2000; MARTENS *et al.*, 2007), o *dnaK* (STEPKOWSKI *et al.*, 2003; MENNA; HUNGRIA; BARCELLOS, 2009a; RIBEIRO *et al.*, 2009; REN *et al.*, 2011), o *thrC* e o *gltA* (HERNÁNDEZ-LUCAS *et al.*, 2004; MARTENS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009).

Novas espécies de rizóbios vêm sendo descritas nos últimos anos, refletindo o número crescente de grupos de pesquisa envolvidos em estudos da diversidade de rizóbios. A maior parte das novas espécies tem sido isolada de regiões tropicais, realçando a importância dos trópicos como fonte de biodiversidade. Considerando o grande número de microrganismos que ainda existem para serem identificados e classificados, e o notável avanço das técnicas de biologia molecular (as quais têm gerado uma quantidade consideravelmente grande de dados, permitido um refinamento nas análises taxonômicas), a moderna biosistemática adquire cada vez mais importância dentro da microbiologia.

3.4.3 BOX-PCR

A caracterização de estirpes por BOX-PCR representa um método internacionalmente reconhecido pelo seu poder de discriminação, confiabilidade em diferenciar estirpes distintas e repetibilidade do método (HUNGRIA *et al.*, 2008; MENNA *et al.*, , 2009b). Os elementos box consistem em regiões repetitivas e conservadas do genoma, geralmente nos espaços intergênicos, e correspondem às subunidades box A (54 pb), box B (43 pb) e box C (50 pb) (MARTIN *et al.* 1992). A amplificação ocorre na região do box A, a única subunidade que mostrou-se altamente conservada entre bactérias (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995), e análises de perfis de DNA obtidos através da mesma têm se mostrado adequadas entre procaríotos, incluindo rizóbios (MARTIN *et al.*, 1992; KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995; FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003; KASCHUK *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2007; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007). Um único *primer* é suficiente para gerar polimorfismo no caso dessas regiões, por estarem

presentes em orientações invertidas no genoma (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; VERSALOVIC *et al.*, 1994; RADEMAKER; LOUWS; DE BRUIJN, 1998).

Segundo van Berkum (1999), pelo fato dessas regiões gênicas estarem associadas a graus elevados de polimorfismo é provável que as mesmas atuem em processos de evolução adaptativa, respondendo às mudanças sofridas pelos microrganismos conforme estes são submetidos às pressões ambientais.

Diferentes autores utilizaram a metodologia por BOX-PCR em suas análises de diversidade e obtiveram resultados esclarecedores, como Mostasso *et al.* (2002); Kaschuk *et al.* (2006); Hungria *et al.* (2006); Wang *et al.* (2006); Pinto, Hungria e Mercante (2007); Menna *et al.* (2009b); Torres *et al.* (2009), e Cardoso, Hungria e Andrade (2012); Ribeiro *et al.* (2012).

3.5 ANÁLISE POLIFÁSICA EMPREGADA NA CLASSIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM

Um exemplo de progresso adquirido com as técnicas de biologia molecular está entre os isolados que nodulam o feijoeiro. Em 1932, as bactérias que se associavam simbioticamente com plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro) foram denominadas *Rhizobium phaseoli* (FRED; BALDWIN; MCCOY, 1932). Como já mencionado anteriormente, essa espécie foi, posteriormente, reclassificada em *Rhizobium leguminosarum*, a qual foi subdividida em três biovars, segundo a espécie vegetal que nodulavam: *R. leguminosarum* bv. *viciae* para *Pisum sativum* (ervilha), *Vicia sativa* (ervilhaca) e, *Vicia fava* (fava); *R. leguminosarum* bv. *trifolii* para *Trifolium* spp. (trevo) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, para *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro) (JORDAN, 1984; RIBEIRO *et al.*, 2009; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009).

Nos anos seguintes, as pesquisas entre isolados de rizóbios que se associam com *P. vulgaris* prosperaram e o avanço nas identificações permitiram a divisão dessas estirpes em dois grupos, tipo I e tipo II, conforme algumas características fenotípicas e genotípicas. Dentre elas, podem-se citar a presença de múltiplas cópias dos genes codificadores da nitrogenase (genes *nif*) (MARTÍNEZ *et al.*, 1985; QUINTO *et al.*, 1985); a capacidade de nodular outras espécies de leguminosas (MARTÍNEZ *et al.*, 1985) e as diferenças entre os plasmídeos simbióticos (BROM *et al.*, 1988). Estirpes do tipo I apresentam plasmídeos contendo, juntamente com outras características, reiterações dos genes *nif* e uma baixa

abrangência de hospedeiros, enquanto que estirpes do tipo II apresentam plasmídeos contendo uma única cópia dos genes *nif* e uma maior abrangência de hospedeiros. Além disso, bactérias do tipo II conferem alta habilidade de fixação do nitrogênio em transconjugados de *Agrobacterium*, o que não ocorre nas bactérias do tipo I (BROM *et al.*, 1988).

Em 1991, Martínez-Romero e colaboradores, através de estudos com o gene ribossomal 16S, hibridação DNA-DNA e MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) reclassificaram as estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli do tipo II em uma nova espécie, *Rhizobium tropici*. No entanto, como as estirpes desse grupo ainda apresentavam diferenças fenotípicas e genotípicas entre si, os mesmos autores dividiram-nas em outros dois grupos: *R. tropici* tipo A e *R. tropici* tipo B, sendo CFN 299 e CIAT 899 as estirpes de referência, respectivamente, para cada grupo e CIAT 899 a estirpe tipo (*type strain*) para *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991).

Estirpes do grupo I foram classificadas na mesma época, por Segovia, Young e Martínez-Romero (1993), os quais propuseram, através de análises do gene ribossomal 16S, a denominação de *Rhizobium etli* para as estirpes desse grupo, definindo a CFN 42 como estirpe tipo. Desde então, outras espécies de rizóbios nodulantes do feijoeiro foram descritas como *R. giardinii*, *R. gallicum* (AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997), *R. lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2006) e *R. multihospitium* (HAN *et al.*, 2008).

Devido a sua alta eficiência na nodulação, estirpes de *Rhizobium tropici* vêm sendo utilizadas há alguns anos como inoculante para a cultura do feijoeiro no Brasil. Sua eficácia, segundo Hungria *et al.* (2000) e Hungria, Campo e Mendes (2003) está relacionada à alta tolerância aos estresses ambientais e alta estabilidade genética. Esses mesmos autores verificaram, pautados em análises de diferentes ácidos graxos, que estirpes de referência do tipo A formam *clusters* separados das estirpes de referência do tipo B. Ainda, características fisiológicas, morfológicas, perfil dos fatores Nod, composição de fosfolipídeos, entre outros atributos de algumas estirpes brasileiras utilizadas como inoculantes e classificadas como *R. tropici* são compartilhadas com ambos os tipos de *R. tropici* mas, filogeneticamente, formam um grupo separado, posicionando-se entre os tipos A e B (HUNGRIA *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2009). Sendo assim, desde a sua descrição, muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de distinguir,

claramente, as estirpes existentes nestes dois grupos de *R. tropici* e, possivelmente, revelar novas espécies.

Mais recentemente, Ribeiro *et al.* (2009), através da metodologia de MLSA relataram diferenças genéticas relevantes entre as estirpes dos tipos A e B de *R. tropici*, ratificando as descobertas de estudos anteriores e sugerindo estudos mais aprofundados, visando atingir uma nova classificação para estes dois grupos e para os subgrupos formados entre os mesmos. A seguir, através de análises taxonômicas polifásicas (análises de sequências nucleotídicas do 16S rRNA, genes *housekeeping*, HDD e análises fenotípicas), Ribeiro e colaboradores (2012) reclassificaram as estirpes de *R. tropici* do tipo A em uma nova espécie, *Rhizobium leucaenae*.

Visto que ainda há alta diversidade nas estirpes de *R. tropici* e que os subgrupos formados entre as estirpes do tipo A e do tipo B são bastante evidentes, indicando possíveis novas espécies, é interessante que mais estudos sejam feitos com o intuito de desvendá-los.

Análises polifásicas e filogenéticas apresentam grande valia na reclassificação de estirpes de rizóbios, conseguindo diferenciar estirpes inicialmente identificadas como pertencentes à mesma espécie. Com o crescente interesse e necessidade de se utilizar inoculantes bacterianos em detrimento de fertilizantes nitrogenados, a identificação correta das estirpes já disponíveis comercialmente e de novas estirpes com potencial agrônomo é de fundamental importância, para que se ampliem as chances de se identificar estirpes cada vez mais eficientes e adaptadas aos solos e culturas brasileiras. Com isso, justifica-se a necessidade de conduzir estudos para refinar a taxonomia e filogenia de rizóbios, particularmente os de importância agrícola.

4 ESTUDO 1 - CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA NA RECLASSIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM TROPICI* ISOLADAS DE DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Estirpes Utilizadas e Condições de Cultivo

Foram utilizadas cinco estirpes de *Rhizobium*, todas isoladas de nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e, atualmente, classificadas como *R. tropici* que, em estudos prévios de filogenia realizados por nosso grupo de pesquisa (CHUEIRE *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009), foram agrupadas separadamente dos outros representantes *R. tropici*, bem como de outras espécies deste gênero, indicando-as como potenciais novas espécies. Os exemplares correspondem à CPAO 1135, proveniente de Dourados, MS (PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007); PRF 35 e PRF 54, provenientes de Pitanga, PR (HUNGRIA *et al.* 2000; CHUEIRE *et al.*, 2003; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009); H 52 (MOSTASSO *et al.*, 2002; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009) e H 53 (MOSTASSO *et al.*, 2002; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007), provenientes de Planaltina, GO. A estirpe CPAO 1135 foi isolada e fornecida pelo Dr. Fábio M. Mercante (Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS), as estirpes PRF 35 e PRF 54 foram isoladas e fornecidas pela Dra. Diva S. Andrade (Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, Londrina, PR) e as estirpes H 52 e H 53 foram isoladas e fornecidas pelo Dr. Milton A. T. Vargas (Embrapa Cerrados, Planaltina, DF).

Além das estirpes já citadas, foram utilizadas as seguintes estirpes de referência: *Rhizobium leucaenae* CFN 299^T (=USDA 9039; =LMG 9517; =UMR1026; =CENA 183; =SEMIA 4083), *R. tropici* CIAT 899^T(= USDA 9030; = ATCC 49672; = UMR1899; = TAL 1797; = HAMBÍ 1163; = CM01; = SEMIA 4077; = DSM 11418; = BR 322); *R. etli* CFN 42^T (= USDA 9032; = ATCC 51251; = DSM 11541), *R. galegae* LMG 6214^T (=DSM 11542; = ATCC 43677; = HAMBÍ 540); *R. huautlense* S02^T; *R. lusitanum* P1-7^T (= CECT 7016; = LMG 22705); *R. miluonense* CCBAU 41251^T (= HAMBÍ 2971; = LMG 24208), *R. multihospitium* CCBAU 83401^T (= HAMBÍ 2975; = LMG 23946) e *R. hainanense* I66^T, fornecidas pela Dr. Esperanza

Martínez-Romero (Centro de Ciências Genômicas, Cuernavaca, Mexico); *R. leguminosarum* bv. phaseoli USDA 2671^T (= RCR 3644) e *R. leguminosarum* bv. viciae LMG 14904^T (= 3Hoq18; = ATCC 10004; = USDA 2370); fornecidas pelo Dr. Peter van Berkum (USDA, Beltsville, MD, USA); *R. gallicum* R602^T (= USDA 2918; =MSDJ1109) e *R. giardinii* H152^T (= USDA 2914; = MSDJ0144), fornecidas pela Dra. Noelle Amarger (INRA, Dijon, France) e *R. rhizogenes* ATCC 11325^T, fornecida pela Dr. Rosa M. Pittard (Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ). Todas as estirpes estão depositadas na Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas da Embrapa Soja.

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura YMA (extrato de levedura e manitol, Vincent, 1970) e estocadas em glicerol a 30%, a – 4°C para estocagens curtas e a – 80°C e liofilizadas para estocagens de longo prazo, conforme descrito por Menna *et al.* (2006).

4.1.2 Caracterização Morfológica

A caracterização morfofisiológica das colônias foi realizada conforme Vincent (1970), Somasegaran e Hoben (1985) e Martínez-Romero *et al.* (1991), com algumas adaptações. As análises incluíram a avaliação da taxa de crescimento em meio YMA contendo vermelho Congo (VC) (rápida, intermediária, lenta ou muito lenta); da morfologia das colônias em relação à forma, bordas, superfície, produção de muco, elevação, consistência e detalhes ópticos; da mudança de coloração (reação ácido/básico) em YMA contendo o indicador azul de bromotimol (ABT); e da cromogênese da cultura em meio YMA contendo ABT e VC.

4.1.2.1 Taxa (Manifestação) de Crescimento

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

4.1.2.2 Diâmetro das colônias

Três dias após o registro da manifestação de crescimento das colônias isoladas, mediu-se o tamanho do diâmetro das colônias com um paquímetro sob estereomicroscópio com luz incidente superior. A média foi dada em milímetros (mm).

4.1.2.3 Alteração do pH (Reação Ácida/Básica)

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

4.1.2.4 Forma das colônias

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

4.1.2.5 Elevação das colônias

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

4.1.2.6 Borda das colônias

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

4.1.2.7 Superfície das colônias

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

4.1.2.8 Produção de muco

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

4.1.2.9 Consistência da massa de crescimento

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

4.1.2.10 Detalhes ópticos

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

feito com a caneta aparece sob a massa celular), ou opacas (risco encontra-se pouco visível ou totalmente coberto pela massa celular).

4.1.2.11 Cromogênese

a) Meio YMA contendo Azul de bromotimol (ABT)

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

b) Meio YMA contendo vermelho Congo (VC)

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

4.1.3 Caracterização Fisiológica

4.1.3.1 Utilização de fontes de C

As estirpes em estudo e as estirpes de referência foram crescidas em meio YM e incubadas sob agitação a 100 rpm, por 48 horas.

Após atingido o crescimento, cada cultura foi centrifugada a 6.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O pélete foi ressuspenso em 5 mL de solução salina a 0,9% e novamente centrifugado. Após o descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se o pélete em 2 mL de água Milli-Q. Em seguida, a solução foi transferida para um tubo de ensaio estéril e a concentração das células foi ajustada para, aproximadamente, 10^9 células/mL, através da escala de McFarland. O ajuste da concentração foi feito através da transferência, por um conta-gotas, desta última solução para um tubo de ensaio contendo 5 mL de água Milli-Q. Posteriormente, o inóculo foi transferido, através do mesmo conta-gotas, para um frasco de vidro contendo 10 mL de meio de cultura modificado (YM sem

manitol, extrato de levedura, indicador azul de bromotimol) e testado em placas de API 50CH kit (BioMérieux), com 49 fontes de carbono. A quantidade de inóculo transferida corresponde à 2 vezes o número de gotas utilizadas para se ajustar à concentração de células. A incubação na placa de API foi realizada a 28°C por 72 h. Cada bactéria foi analisada em duplicata.

4.1.3.2 Tolerância a antibióticos

As estirpes foram avaliadas quanto à sua tolerância a determinados antibióticos pelo método de Disco-Difusão (BAUER; KIRBY, 1966), o qual avalia a sensibilidade ou resistência da bactéria ao antimicrobiano pela medida direta do diâmetro do halo de inibição que se forma ao redor do disco. As culturas foram crescidas em meio YMA durante dois a três dias, sob agitação constante de 100 rpm. Após atingido o crescimento, 100 µL do pré-inóculo foram transferidos para uma placa de Petri contendo YMA sólido e dois discos de um mesmo antibiótico foram adicionados. Foi feita uma placa para cada antibiótico. Após dois dias de crescimento, o halo de inibição foi medido com um paquímetro e as bactérias classificadas em sensível, moderadamente resistente ou resistente, segundo o padrão demonstrado na Tabela 1.

Todas as bactérias foram testadas quanto à sua tolerância a ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), clorafenicol (30 µg), cefuroxima (30 µg), eritromicina (15 µg), estreptomicina (10 µg), neomicina (30 µg), penicilina g (10 u) e tetraciclina (30 µg).

Tabela 1 – Determinação da tolerância de procariotos a determinados antibióticos através da medição dos halos de inibição.

ANTIBIÓTICOS OU QUIMIOTERÁPICOS	SÍMBOLO	POTÊNCIA DO DISCO	DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS		
			Resistente	Moderadamente resistente	Sensível
Ampicilina (enterococos, germes Gram negativos)	AP	10 µg	≤ 11	12 – 13	≥ 14
Clorafenicol	CO	30 µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18
Eritromicina	EI	15 µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18

Estreptomicina	ET	10 µg	≤ 11	12 – 14	≥ 15
Nalidíxico, ácido	NA	30 µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19
Neomicina	NO	30 µg	≤ 12	13 – 16	≥ 17
Penicilina G (interpretação não aplicável à estafilococos)	PN	10 U	≤ 11	12 – 21	≥ 22
Cefuroxima (cefalosporinas)	CF	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Tetraciclina	TT	30 µg	≤ 14	15 – 18	≥ 19

4.1.4 Extração de DNA

O DNA genômico de cada estirpe foi extraído conforme descrito por Menna *et al.* (2006). As culturas foram crescidas em meio YMA por cerca de dois dias e centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 min, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pélete em 5 mL de solução fisiológica (NaCl, 0,85%). As amostras foram novamente centrifugadas sob as mesmas condições e esta etapa de lavagem foi repetida por mais duas vezes. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução fisiológica, homogeneizada e diluída para aproximadamente 10⁹ células/mL, segundo o padrão de McFarland. Em seguida, 1,5 mL das amostras diluídas foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 400 µL de TE (Tris-EDTA) 50/20 foram adicionados, homogeneizando-se o pélete.

A fim de se obter amostras mais puras de DNA, foram adicionados 50 µL de SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) a 10%; 10 µL de proteinase K (20 mg/mL); 10 µL de lisozima (5 mg/mL) e 4 µL de RNase (10 mg/mL, preparada em Tris HCl 10 mM, pH 7.5 e NaCl 15 mM, conforme descrito por Fernandes, Fernandes e Hungria (2003). As amostras foram, então, incubadas em banho-maria a 37°C por 1 h, homogeneizadas, acrescidas de 30 µL de NaCl 5 mol/L, 70 µL de AcONa 3 mol/L e 28 µL de H₂O, e deixadas em geladeira por 1 h. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min em temperatura ambiente. Do sobrenadante foram recolhidos 300 µL e, a este volume, foi adicionado o dobro do volume de etanol puro gelado. Após homogeneização e armazenamento a -20°C por uma noite, as amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores e o

sobrenadante foi descartado. Para completar esta etapa de purificação, 400 µL de etanol 70% foram adicionados ao pélete e as amostras foram centrifugadas por 5 min. Após descartar o sobrenadante, as amostras foram secas em estufa por 1 h (ou em temperatura ambiente por 3 h), ressuspensas em 50 µL de TE 10/1 e armazenadas em geladeira para análises posteriores.

4.1.5 Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

Os genes *housekeeping* utilizados neste estudo foram selecionados com base em estudos conduzidos anteriormente (GAUNT *et al.*, 2001; STEPKOWSKI *et al.*, 2005; MARTENS *et al.*, 2007; MARTENS *et al.*, 2008; MENNA; HUNGRIA; BARCELLOS, 2009a.; RIBEIRO *et al.*, 2009; ROMA-NETO; RIBEIRO; HUNGRIA, 2010). Foram utilizados os genes *recA* (proteína de recombinação RecA), *gyrB* (DNA girase, subunidade beta), *gltA* (citrato sintase), *glnI* (glutamina sintetase) e *rpoA* (RNA polimerase, subunidade alfa). Além da análise por MLSA, todas as estirpes foram submetidas à PCR e sequenciamento do gene ribossomal 16S rRNA, conforme descrito anteriormente (MENNA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2009).

4.1.6 Amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

4.1.6.1 Amplificação e purificação do gene ribossomal 16S

Foram utilizados os *primers* fD1 e rD1, descritos previamente para o 16S rRNA (WEISBURG *et al.*, 1991). A reação foi conduzida conforme Menna *et al.* (2006), em termociclador (MJ Research Inc. PTC 200). Os *primers* e as condições de amplificação estão representadas na Tabela 2.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com o kit *PureLink* (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificação da concentração através da intensidade da banda. Amostras que apresentassem bandas muito fracas foram concentradas em concentrador à vácuo (*Concentrador Plus*, Eppendorf).

4.1.6.2 Amplificação dos genes *housekeeping*

Os genes *housekeeping* foram amplificados de forma semelhante, com algumas adaptações conforme o gene em análise. Os ciclos de amplificação para cada gene *housekeeping* estão descritos na Tabela 2.

A purificação foi realizada como descrito para o gene 16S rRNA.

Tabela 2 - *Primers* e condições de amplificação utilizadas no Estudo 1.

GENE	PRIMER	SEQUENCIA 5'- 3'	*TAMANHO	CONDIÇÕES DA PCR	REFERÊNCIAS
16S rRNA	fD1	5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'	1338 pb	2 min 95°C, 30 x (15s 94°C, 45s 93°C, 45s 55°C, 2 min 72°C), 5 min 72°C	WEISBURG <i>et al.</i> , (1991)
	rD1	5' - AAGGAGGTGATCCAGCC- 3'			
<i>glnI</i>	TSglnIlf	5'- AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG-3'	480 pb	2 min 95°C, 35 x (45s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	STEPKOWSKI <i>et al.</i> , (2005)
	TSglnIlr	5'-SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG-3'			
<i>rpoA</i>	RRrpoAf	5'- GGAAATCGCCATCAAGATGG-3'	603 pb	2 min 95°C, 35 x (45s 94°C, 45s 55°C, 2 min 72°C), 7 min 72°C	RIBEIRO <i>et al.</i> , (2009)
	RRrpoAr	5'- ACGCTTGGCGAGATCTTC -3'			
<i>recA</i>	recA6f	5'- CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA-3	396 pb	2 min 95°C, 35 x (45s 95°C, 30s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	STEPKOWSKI <i>et al.</i> , (2005)
	recA555r	5'-CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT -3'			
<i>gyrB</i>	gyrB343f	5'- TTCGACCAGAAAYTCTAYAAGG-3'	580 pb	5 min 95°C, 5 x (2 min 94°C, 2 min 58°C, 1 min 72°C) 28 x (30 s 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C), 5 min 72°C	MARTENS <i>et al.</i> , (2008)
	gyrB1043r	5'- AGCTTGCTCCTTSGTCTGCG-3'			
<i>gltA</i>	gltA428f	5'- CSGCCTTCTAYCAYGACTC – 3'	480 pb	5 min 95°C, 3 x (2 min 94°C, 2 min 51°C, 1 min 72°C) 30 x (30 s 94°C, 1 min 51°C, 1 min 72°C), 5 min 72°C	MARTENS <i>et al.</i> , (2007)
	gltA1111r	5'- GGGAGCCSAKCGCCTTCAG – 3'			

* Tamanho das sequencias utilizadas neste estudo

4.1.6.3 Amplificação do DNA para a reação de BOX-PCR

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

As amostras foram submetidas ao termociclador (MJ Research Inc. PTC 200) com 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 7 min; 30 a 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 53°C) e extensão (8 min a 65°C);

1 ciclo de extensão final a 65°C por 16 min; manutenção a 4°C (Hungria *et al.*, 2008).

4.1.7 Sequenciamento dos Genes e Análise Filogenética

Os produtos de PCR obtidos após a etapa de purificação foram submetidos a uma nova amplificação, necessária para a etapa de sequenciamento. Esta consiste na adição de 2 µL de DNA (produto de PCR purificado), à aproximadamente 15µg/mL, 3 µL de dye (DYEnamic ET terminator reagente premix for the MegaBACE, Amersham Biosciences) e 2 µL de *primers* (1,5 pmol) em placas de ELISA. Devido a grande extensão do 16S rRNA foram necessários cinco *primers* para a amplificação do mesmo, como observado na Tabela 3. As condições da PCR utilizadas para este gene foram as mesmas aplicadas aos genes *housekeeping*.

Em seguida, as amostras amplificadas foram precipitadas de acordo com o método descrito por Menna *et al.* (2006), com algumas modificações. Cada poço da placa foi acrescido de 2 µL de acetato de amônio estéril 7,5 M e 65 µL de etanol a 99,5%, em temperatura ambiente. A placa foi selada, homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 45 min. Descartou-se o sobrenadante e inverteu-se a placa em papel absorvente para secar. Em seguida, foram adicionados 150 µL de etanol 70% recém-preparado aos poços da placa, e a mesma foi novamente selada, homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 10 min. Novamente descartou-se o sobrenadante e inverteu-se a placa em papel absorvente, centrifugando-a a 300 rpm por 25 s e deixando-a secar à temperatura ambiente por cerca de 30 min, ou a 37°C por 15 min. Finalmente, os péletes foram ressuspensos em 7 µL de água ultra pura e submetidos ao sequenciamento no MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences).

Tabela 3 - Primers e condições de amplificação para o sequenciamento do 16S rRNA.

GENE	PRIMER	SEQUENCIA 5'- 3'	CONDIÇÕES DA PCR	REFERÊNCIAS
16S rRNA (1500)	fd1	5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'		WEINSBURG <i>et al.</i> , (1991)
	Y2	5'- CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT – 3'		YOUNG; DOWNER; EARDLY (1991)
	1203f	5'- GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC – 3'	1 min 95°C, 40 x (20s 95° C, 30s 55° C, 1 min 60° C)	MENNA <i>et al.</i> (2006)
	362f	5'- CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG – 3'		MENNA <i>et al.</i> (2006)
	786f	5'- CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG – 3'		MENNA <i>et al.</i> (2006)

4.1.8 Análise dos Resultados

O dendograma de BOX-PCR foi gerado pelo programa Bionumerics (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Bélgica, v.4.6), utilizando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*, SNEATH, SOKAL; 1973) para a análise do agrupamento e o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912), com 1% de tolerância.

As sequencias de bases nitrogenadas obtidas no sequenciamento foram reunidas em "contigs", utilizando-se o pacote de programas Phred (EWING; GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998) Phrap (www.phrap.org) e Consed (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). As sequências geradas nesta última etapa foram analisadas individualmente e concatenadas, utilizando-se o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 5.1 com modelo de distância K2P (KIMURA, 1980) e algoritmo Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). O suporte estatístico para as árvores foi avaliado por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições (HEDGES, 1992). A identidade nucleotídica entre as estirpes foi calculada pelo programa Bioedit, versão 7.1.3.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Caracterização Morfológica

Em geral, as propriedades morfológicas foram similares às aquelas pertencentes ao gênero *Rhizobium*, como por exemplo, o crescimento rápido, a reação ácida em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono, forma circular, borda e superfície da colônia lisa e elevação convexa (YOUNG *et al.*, 2001; dados não apresentados).

Entretanto, comparando-as com as demais estirpes de referência, todas as estirpes avaliadas apresentaram diferenças em relação às características de produção de muco, de detalhes ópticos, de diâmetro médio e de coloração da colônia em meio de cultura YMA com vermelho Congo, como pode ser visualizado na Tabela 4.

As estirpes deste estudo apresentaram diâmetro médio de 4,8 mm no terceiro dia após a manifestação de crescimento, característica que foi compartilhada com *R. tropici* e *R. hainanense*, mas, diferindo das demais espécies descritas. A produção de muco foi abundante, como a maioria das outras espécies, com exceção de *R. leucaenae* e *R. multihospitium*, cujas produções de muco foram moderadas.

Em relação aos detalhes ópticos, as estirpes analisadas neste trabalho apresentaram opacidade para esta característica, diferindo de *R. tropici*, *R. hainanense* e *R. rhizogenes*, os quais apresentaram transparência. Por fim, as cinco estirpes deste estudo apresentaram colônia com coloração branca quando crescidas em meio de cultura contendo vermelho Congo como indicador. Para esta última característica, a disparidade ocorreu com as espécies *R. leucaenae*, *R. lusitanum* e *R. rhizogenes*, as quais exibiram coloração rosada.

Apesar de não serem suficientes para discriminar espécies (a expressão fenotípica pode ser alterada com as condições ambientais e laboratoriais), os parâmetros fenotípicos fornecem informações importantes acerca do microrganismo em estudo. Além da obtenção de um perfil morfológico para as estirpes deste estudo, constataram-se diferenças entre estas últimas e espécies já descritas para o gênero *Rhizobium*, dando maior sustentabilidade para melhor classificá-las quanto a outras características, que serão relatadas a seguir.

Tabela 4 - Propriedades morfológicas das estirpes de *Rhizobium* utilizadas no Estudo 1.

CNPSO	SINÓNIMO	DIÂMETRO (5 DIAS APÓS A MANIF. CRESCIMENTO)	PRODUÇÃO DE MUCO	DETALHES ÓPTICOS	VERMELHO CONGO
120	PRF 35	4,67 mm	Abundante	Opaco	Branco
121	PRF 54	4,88 mm	Abundante	Opaco	Branco
234	CPAO 1135	4,42 mm	Abundante	Opaco	Branco
731	H 52	5,76 mm	Abundante	Opaco	Branco
732	H 53	4,43 mm	Abundante	Opaco	Branco
241	<i>R. leucaenae</i>	3,91 mm	Moderado	Opaco	Rosado
242	<i>R. tropici</i>	4,89 mm	Abundante	Transparente	Branco
2054	<i>R. multihospitium</i>	3,62 mm	Moderado	Opaco	Branco
2055	<i>R. lusitanum</i>	4,34 mm	Abundante	Opaco	Rosado
2056	<i>R. miluonense</i>	7,22 mm	Abundante	Opaco	Branco
2450	<i>R. hainanense</i>	4,84 mm	Abundante	Transparente	Branco
86	<i>R. rhizogenes</i>	5,68 mm	Abundante	Transparente	Rosado

*Todas as estirpes apresentaram resultados idênticos em relação à taxa de crescimento, reação ácido/básica, forma, borda, superfície, elevação, consistência e coloração em azul de bromotimol.

4.2.2 Caracterização Fisiológica

4.2.2.1 Utilização de fontes de carbono

As estirpes analisadas neste trabalho apresentaram um perfil de utilização das fontes de carbono distinto das demais estirpes de referência. Das 49 fontes de carbono testadas no kit API 50CH, somente aquelas que apresentaram diferenças entre as estirpes deste estudo e as estirpes de referência *R. tropici* ou *R. leucaenae* foram incluídas na Tabela 5. Dessa comparação, resultaram 21 fontes, o que indica que pelo menos uma dessas duas estirpes de referência apresentou comportamento distinto das cinco estirpes em estudo.

Todas as estirpes avaliadas apresentaram reação positiva para as fontes Glicerol, Eritritol, D-Arabinose, D-Ribose, D-Xilose, L-Xilose, D-Adonitol, D-Glucose, D-Frutose, D-Manose, Inositol, D-Manitol, Salicina, D-Celobiose, D-Maltose, D-Lactose, Glicogênio, Gentiobiose e D-Arabitól, e utilizaram fracamente Xilitol. Já os meios Dulcitol, Metil- α -D-Manopiranosido e L-Arabitól não foram utilizados por nenhuma das cinco estirpes analisadas.

Algumas particularidades ocorreram dentro do grupo em estudo (Tabela 5). A estirpe PRF 35 utilizou fracamente as fontes D-Melibiose, D-Sacarose, D-Trealose, D-Turanose, Arbutina, N-Acetilglucosamina e Metil- β -D-Xilopiranosido, enquanto as demais apresentaram reação positiva. Também houve fraca utilização do meio D-Rafinose, porém, essa característica foi compartilhada com a estirpe H 52, enquanto as demais foram positivas. Além disso, PRF 35 utilizou o meio D-Melezitose, diferente das demais estirpes do grupo, e apresentou reação negativa para o meio L-Sorbose, ao passo que as demais utilizaram-no fracamente.

O meio D-Sorbitol foi pouco utilizado pela estirpe PRF 54, enquanto as demais estirpes do grupo apresentaram reação negativa. O mesmo aconteceu com o meio D-Tagatose, no entanto, essa característica também foi compartilhada com a H 53.

A estirpe CPAO 1135 usou fracamente o meio L-Ramnose, enquanto as demais apresentaram reação positiva. Por fim, enquanto a estirpe H 52 levemente Amigdalina, as demais apresentaram reação negativa.

Um resultado interessante foi observado para o meio Metil- α -Glucopiranosido. A utilização dessa fonte foi a mais diversa entre as estirpes deste estudo. PRF 35 e PRF 54 usaram-no fracamente, ao passo que CPAO 1135 e H 53 apresentaram reação positiva e H 52 apresentou reação negativa.

Ao comparar-se as bactérias deste estudo com espécies utilizadas como referência, as maiores dessemelhanças foram encontradas com *R. leucaenae* (15 diferenças) e *R. gallicum* (14 diferenças).

Embora já houvesse na literatura dados sobre a utilização de algumas fontes de carbono pelas estirpes de referência, os resultados apresentados na Tabela 5 foram obtidos através de uma nova experimentação, e alguns deles diferem dos resultados publicados por outros autores como Martínez-Romero *et al.* (1991) e Han *et al.*, (2008), especialmente em relação à *R. tropici* e *R. leucaenae*. Isso pode estar relacionado ao fato desses autores terem utilizado placas com fontes

de C em concentrações distintas da placa de API, além de possíveis diferenças relacionadas a outros componentes presentes nessas fontes, como sais, vitaminas, fonte de N e pH.

Tabela 5 - Diferenças entre as estirpes do Estudo 1 e estirpes de referência quanto à utilização de fontes de carbono por API 50CH kit. 1) PRF 35; 2) PRF 54; 3) CPAO 1135; 4) H 52; 5) H 53; 6) *R. leucaenae*; 7) *R. tropici*; 8) *R. lusitanum*; 9) *R. miluonense*; 10) *R. multihospitium*; 11) *R. hainanense*; 12) *R. rhizogenes*; 13) *R. etli*; 14) *R. gallicum*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	f
Eritritol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+
D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	f	+
L-Xilose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	-	+
Metil-βd-Xilopiranosido	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	f	+
D-Frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+
D-Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	f	+
L-Sorbose	-	f	f	f	f	-	-	f	+	f	f	f	-	-
L-Ramnose	+	+	f	+	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	f	-	-	f	f	f	f	-	-
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	f	f	f
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	f	f	+
D-Sorbitol	-	f	-	-	-	-	-	f	+	f	+	f	f	+
Metil-αd-Manopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	f	-	f	-	-	-	-
Metil-αd-Glucopiranosido	f	f	+	-	+	-	+	f	+	+	+	+	f	-
N-Acetilglucosamina	f	+	+	+	+	-	-	-	+	+	f	+	-	f
Amigdalina	-	-	-	f	-	-	-	f	f	f	+	+	-	-
Arbutina	f	+	+	+	+	-	f	+	+	+	+	+	f	-
Salicina	+	+	+	+	+	-	f	+	+	+	f	+	f	f
D-Celobiose	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+	f	f
D-Maltose	+	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	f	+	f
D-Lactose	+	+	+	+	+	f	f	+	+	+	f	f	+	f
D-Melibiose	f	+	+	+	+	f	f	+	+	+	f	f	f	f
D-Sacarose	f	+	+	+	+	f	+	+	+	+	f	+	+	f
D-Trealose	f	+	+	+	+	f	+	+	+	+	+	+	+	f
D-Melezitose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	f	-	-	-
D-Rafinose	f	+	+	+	f	f	f	+	+	+	f	f	f	f
Glicogênio	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Xilitol	f	f	f	f	f	-	-	f	+	f	+	f	+	f
Gentiobiose	+	+	+	+	+	f	f	+	+	+	+	+	f	f

D-Turanose	f	+	+	+	+	f	f	f	+	+	+	f	+	f
D-Tagatose	-	f	-	-	f	f	-	f	+	f	f	+	-	-
D-Arabitol	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	+	f	+	+
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	f	f	f	f	+	+	f	-

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

4.2.2.2 Tolerância a antibióticos

Em relação à resistência ou sensibilidade a antimicrobianos pelo método de Disco-Difusão, houve diferenças entre as estirpes analisadas neste estudo com as demais estirpes de referência, como pode ser observado na Tabela 6.

As cinco estirpes avaliadas neste estudo exibiram um padrão quase idêntico entre si. Todas apresentaram resistência aos antibióticos ácido nalidíxico (30 µg) e eritromicina (15 µg). Com exceção da estirpe H 52, a qual apresentou resistência moderada à penicilina (10 U), todas as demais mostraram-se resistentes a este último. A sensibilidade foi observada quanto aos antibióticos ampicilina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), cefuroxima (30 µg), estreptomicina (10 µg), neomicina (30 µg) e tetraciclina (30 µg).

Em comparação com as estirpes de referência, houve alta identidade com *R. leucaenae*, que diferiu apenas em relação ao antibiótico penicilina, sendo sensível ao mesmo. A maior diferença foi encontrada com *R. tropici* e *R. multihospitium*, diferindo em quatro dos nove antibióticos testados, sendo essa dissimilaridade quanto aos antimicrobianos ampicilina, clorafenicol e cefuroxima (aos quais ambas as espécies de referência são resistentes) e estreptomicina (ao qual *R. tropici* é resistente e *R. multihospitium* é moderadamente resistente).

Alguns dos antibióticos já tinham sido testados por outros autores em estirpes de *Rhizobium*, como Chen *et al.* (1997) (clorafenicol, na concentração de 100 µg/ml), Valverde *et al.* (2006) (ampicilina, eritromicina, penicilina, cefuroxima e neomicina, nas concentrações de 2 mg, 2 mg, 10 IU, 30 µg e 5 mg, respectivamente), Gu *et al.* (2008) (ampicilina, clorafenicol e estreptomicina, nas concentrações de 300 µg, 50 µg e 50 µg, respectivamente.) e Han *et al.* (2008) (ampicilina, clorafenicol, eritromicina, estreptomicina na concentração de 50 µg).

Os resultados deste trabalho diferiram em algumas estirpes tipo quando comparado com estes outros autores, fato que pode estar relacionado à diferença na concentração e método empregado para análise. Além disso, genes extracromossomais de resistência a antibióticos podem ser transferidos entre diferentes espécies por conjugação (BERINGER, 1974). Ainda assim, a avaliação da tolerância a diferentes antimicrobianos é importante na caracterização de estirpes e fornece suporte para classificações futuras.

Tabela 6 - Tolerância das estirpes do Estudo 1 e estirpes de referência a diferentes antibióticos. 1) PRF 35; 2) PRF 54; 3) CPAO 1135; 4) H 52; 5) H 53; 6) *R. leucaenae*; 7) *R. tropici*; 8) *R. lusitanum*; 9) *R. miluonense*; 10) *R. multihospitium*; 11) *R. hainanense*; 12) *R. rhizogenes*.

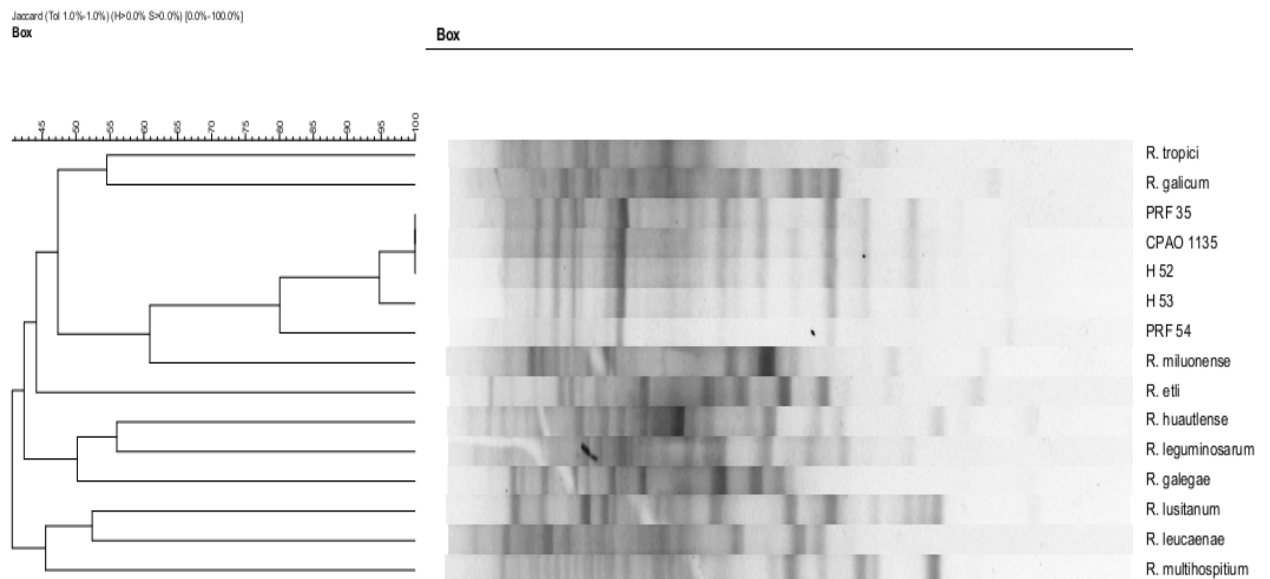
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ac. Nalidíxico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	mr	-
Ampicilina	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Clorafenicol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	mr
Cefuroxima	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Eritromicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Estreptomicina	-	-	-	-	-	-	+	-	mr	mr	+	mr
Neomicina	-	-	-	-	-	-	-	mr	mr	-	mr	-
Penicilina	+	+	+	mr	+	-	+	+	+	+	+	+
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) resistente; (mr) moderadamente resistente; (-) sensível

4.2.3 BOX – PCR

No dendograma construído com base nos perfis de DNA obtidos por BOX-A1R PCR as cinco estirpes estudadas neste trabalho encontram-se agrupadas (Figura 3). As estirpes PRF 35, CPAO 1135 e H 52, apesar de provirem de regiões diferentes (Pitanga, PR, Dourados, MS e Planaltina, GO, respectivamente) apresentaram 100% de similaridade entre si; a H 53 exibiu 95% de similaridade com essas três estirpes e a PRF 54 foi a que apresentou maior dissimilaridade genética, com 80% de similaridade com as demais. Ainda, esta última apresentou 60% de similaridade com *R. miluonense*, única estirpe-tipo que posicionou-se no mesmo agrupamento formado para as estirpes deste estudo, porém, com uma porcentagem de similaridade baixa.

Figura 3 - Dendograma baseado nos perfis de DNA pela metodologia de BOX-PCR, aplicado às estirpes do Estudo 1



Os agrupamentos foram obtidos pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.4.6). Para a análise de agrupamento, foi utilizado o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) e o coeficiente de Jaccard com 1% de tolerância.

Em um estudo comparativo dos perfis de BOX-PCR de várias espécies de rizóbios, Menna *et al.* (2009b) verificaram que a correlação com o 16S rRNA era baixa, 7,6%. Contudo, estirpes de espécies diferentes nunca apresentaram similaridade superior a 70% (MENNA *et al.*, 2009b), nível esse que também já havia sido sugerido em trabalhos anteriores, por exemplo, Grange e Hungria (2004) e Kaschuk *et al.* (2006). Neste trabalho, as cinco bactérias apresentaram valores superiores a 70% de similaridade entre si, e inferiores a 70% com as estirpes de referência (*R. miluonense*, a espécie mais próxima das estirpes deste grupo, apresentou nível de similaridade de 60%, como já citado anteriormente) tornando mais robusta a hipótese de que as mesmas representam uma potencial nova espécie.

4.2.4 16S rRNA

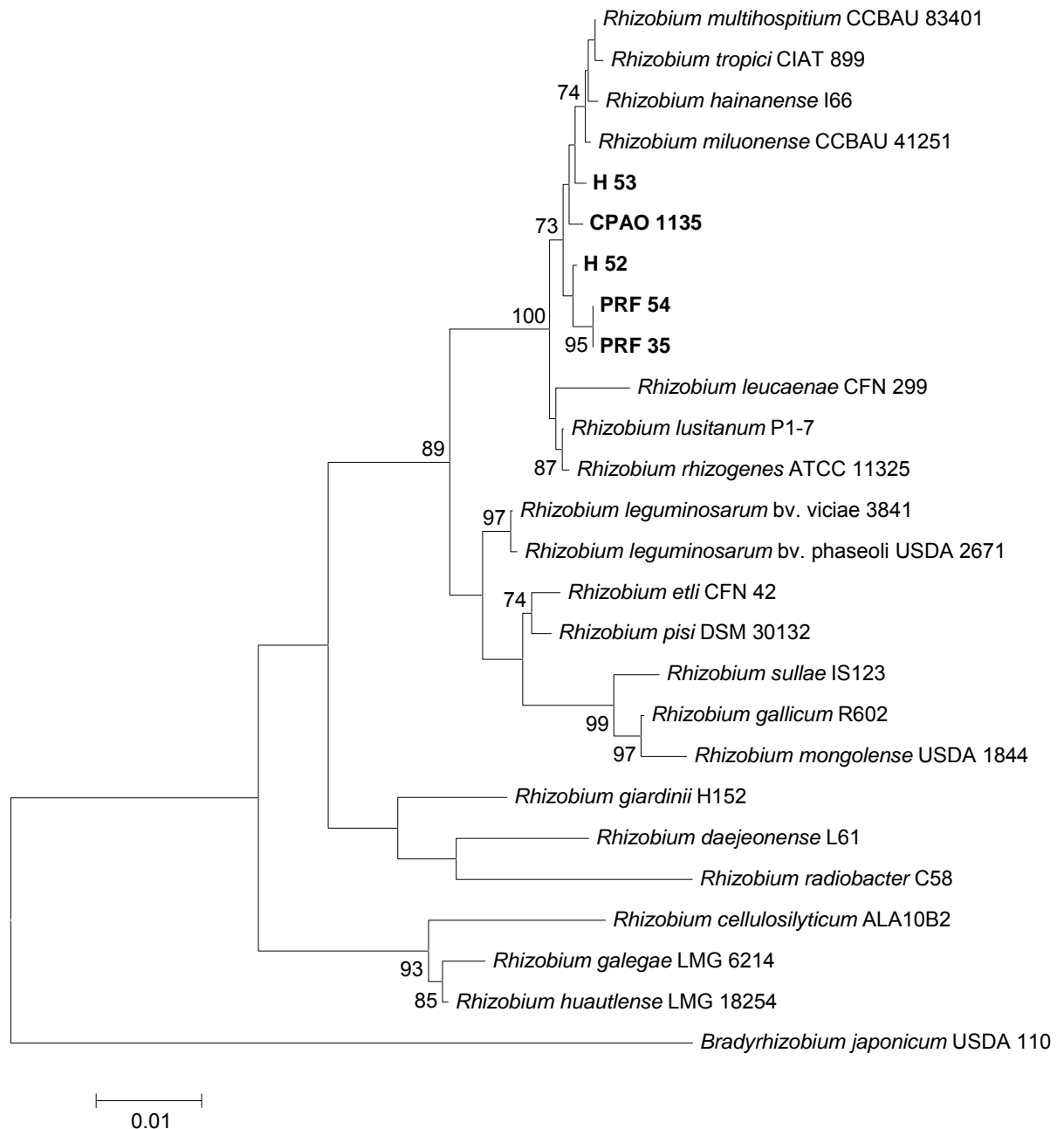
A árvore filogenética construída com base nas sequências do 16S rRNA posicionou as estirpes deste estudo no mesmo agrupamento formado pelas estirpes que compõem o chamado “grupo tropici”, compreendendo *R. miluonense*, *R. hainanense*, *R. lusitanum*, *R. rhizogenes*, *R. multihospitium*, *R. leucaenae* e *R. tropici*

(RIBEIRO *et al.*, 2012), com um valor *bootstrap* de 100%, como pode ser observado na Figura 4. *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 foi utilizado como grupo externo.

As estirpes PRF 35 e PRF 54 mostraram-se altamente relacionadas (*bootstrap* de 95%) ficando, também, próximas de H 52. Ainda dentro do cluster formado pelas estirpes deste estudo e estirpes do “grupo tropici”, nota-se a formação de dois subgrupos, o primeiro composto pelas estirpes avaliadas neste estudo e as estirpes de referência *R. miluonense*, *R. hainanense*, *R. multihospitium* e *R. tropici* (*bootstrap* – 73%), e o segundo formado pelas estirpes de referência *R. miluonense*, *R. lusitanum*, *R. rhizogenes* e *R. leucaenae*, sendo que esta última exibiu a maior distância filogenética dentro do agrupamento.

A caracterização de espécies através das sequências do 16S rRNA ainda é amplamente utilizada, por definir posições filogenéticas em nível de gênero, porém, nota-se que uma análise com base unicamente nestas sequências não define claramente a posição filogenética das estirpes em nível de espécie, conforme já constatado por outros autores (WANG; MARTÍNEZ-ROMERO, 2000; COENYE *et al.*, 2001; MARTENS *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2009; DELAMUTA *et al.*, 2012).

Figura 4 - Árvore filogenética das estirpes do Estudo 1, baseada no sequenciamento do DNA ribossomal 16S.



A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 5,1 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-joining, com *bootstrap* de 1000 repetições. Valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.

4.2.5 Diversidade dos Genes *glnII*, *gyrB*, *gltA*, *recA* e *rpoA*

Outros genes foram utilizados neste trabalho, a fim de refinar a caracterização das cinco estirpes avaliadas neste estudo. Os genes escolhidos são altamente conservados entre espécies de *Rhizobium*, e correspondem aos genes do

metabolismo basal das mesmas. Informações sobre a porcentagem dos sítios conservados, sítios variáveis, frequência nucleotídica e a parcimônia informativa de cada gene *housekeeping* podem ser observadas na Tabela 7. Nesta análise, somente as estirpes deste estudo e as estirpes de referência do gênero *Rhizobium* foram consideradas. Para cada gene *housekeeping* foi construída uma árvore filogenética, como pode ser visualizado na Figura 5.

Nota-se que os genes *housekeeping* resultaram em mais informações sobre a posição filogenética dos microrganismos do que o 16S rRNA (Tabela 7). Dos genes utilizados na análise concatenada, *gyrB* foi o que possuiu a maior parcimônia informativa, com 35,5 % (206 pb) de sítios informativos, seguido de *recA* e *glnII*, com 22,9% (91 pb e 110 pb, respectivamente), *gltA*, com 20,5% (129 pb) e *rpoA* com 14,7% (89 pb), enquanto o 16S rRNA foi o que apresentou a menor parcimônia informativa, com apenas 7,9% (106 pb).

Observa-se que, em todas as árvores, com exceção da árvore construída com base no gene *gltA*, as cinco estirpes de *Rhizobium* analisadas neste estudo formaram um grupo à parte, com alto valor de *bootstrap*, sendo 100% o valor obtido no agrupamento formado para os genes *gyrB* (Fig. 5B) e *recA* (Fig. 5D); 99% no agrupamento formado para o gene *glnII* (Fig.5A) e 86% para o agrupamento formado para o gene *rpoA* (Fig.5E). Em quase todas, a estirpe-tipo mais próxima do agrupamento em estudo foi *R. leucaenae*, exibindo mais de 94% de identidade nucleotídica (Tabela 8).

Apenas a árvore construída para o gene *gltA* comportou-se diferente das demais. Nesta última, as estirpes PRF 35, PRF 54, CPAO 1135 e H 53 formaram um único *cluster*, com *bootstrap* de 100%, tendo como grupo-irmão o agrupamento formado por *R. tropici*, *R. lusitanum* e *R. leucaenae* (*bootstrap* de 98%), onde a estirpe H 52 foi posicionada (Fig. 5C). Esta heterogeneidade genética poderia ter resultado de uma história evolutiva diferenciada para este gene em particular (CHARLES *et al.*, 2005), ou de recombinação genética, advertindo que o gene *gltA*, apesar de bastante útil na determinação genética de espécies microbianas (ACHTMAN; WAGNER, 2008), deve ser utilizado com cautela em estudos de filogenia e taxonomia envolvendo estirpes de *Rhizobium*.

Em comparação com o gene 16S rRNA, o estudo de mais de um gene altamente conservado elucidou com mais precisão a posição filogenética das estirpes, esclarecendo a relação filogenética entre elas. A hipótese de que essas

estirpes podem representar uma nova espécie dentro do gênero *Rhizobium* é reforçada ao se observar o nítido agrupamento formado nas árvores filogenéticas dos genes *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoA*. Ainda, os valores de identidade nucleotídica observados dentro do grupo de estirpes deste estudo foi de 100% para os genes *glnII* e *gyrB*, de 99 a 100% para os genes *recA* e *rpoA* e 95,6 a 100% para o gene *gltA* (Tabela 8). Quando comparadas com estirpes de referência esses valores foram, em sua maioria, inferiores a 94% para todos os genes *housekeeping* analisados. Somente para a espécie recém-descrita *R. leucaenae* (RIBEIRO *et al.*, 2012) houve identidade nucleotídica superior a 94% em todos os genes, como já citado anteriormente.

Thompson *et al.* (2005), em seu estudo de filogenia e identificação de vibriões por MLSA verificaram que estirpes pertencentes à mesma espécie possuíram pelo menos 94% de identidade nucleotídica entre seus genes *housekeeping*. Este nível de identidade também foi constatado por Lu *et al.* (2011) e Aserse *et al.* (2012) em seus trabalhos, e também por Puławska *et al.* (2012) na descrição de uma nova espécie de *Rhizobium* (*R. nepotum*).

As estirpes deste estudo, quando comparadas com as espécies já descritas, apresentaram identidade inferior a 94% para a maior parte dos genes *housekeeping* analisados, com exceção de *R. leucaenae*, e sempre superior a 98% quando esta comparação foi feita dentro do grupo. Dessa forma, os resultados obtidos pela avaliação dos genes *housekeeping* individuais indicam a possibilidade deste grupo de estirpes representarem uma nova espécie dentro de *Rhizobium* ou, pelo menos, diversidade genética elevada dentro da espécie *R. leucaenae*.

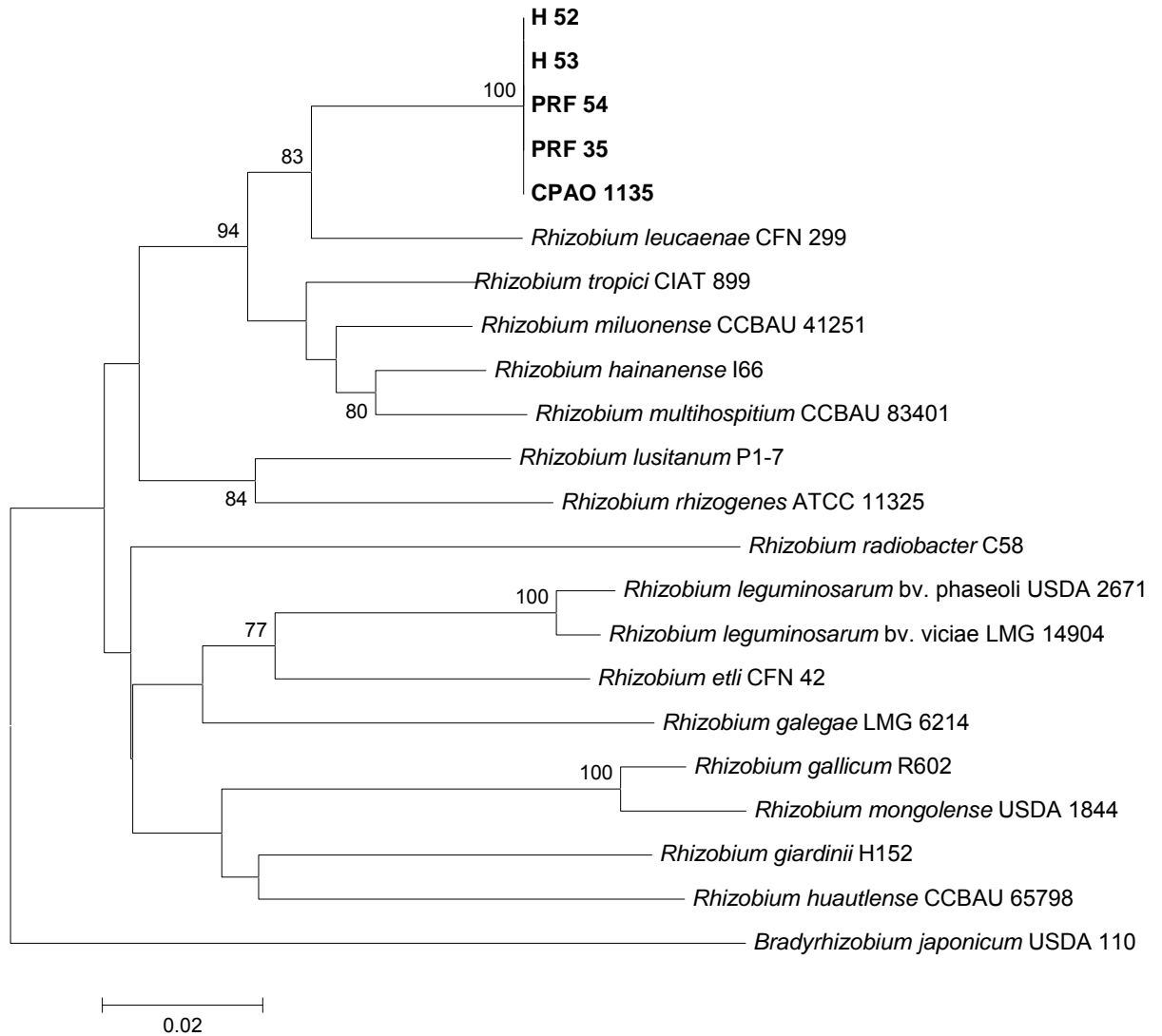
Tabela 7 - Informações sobre as sequências obtidas no Estudo 1. Cinco estirpes foram analisadas, juntamente com 13 - 20 estirpes de referência, conforme descrito anteriormente.

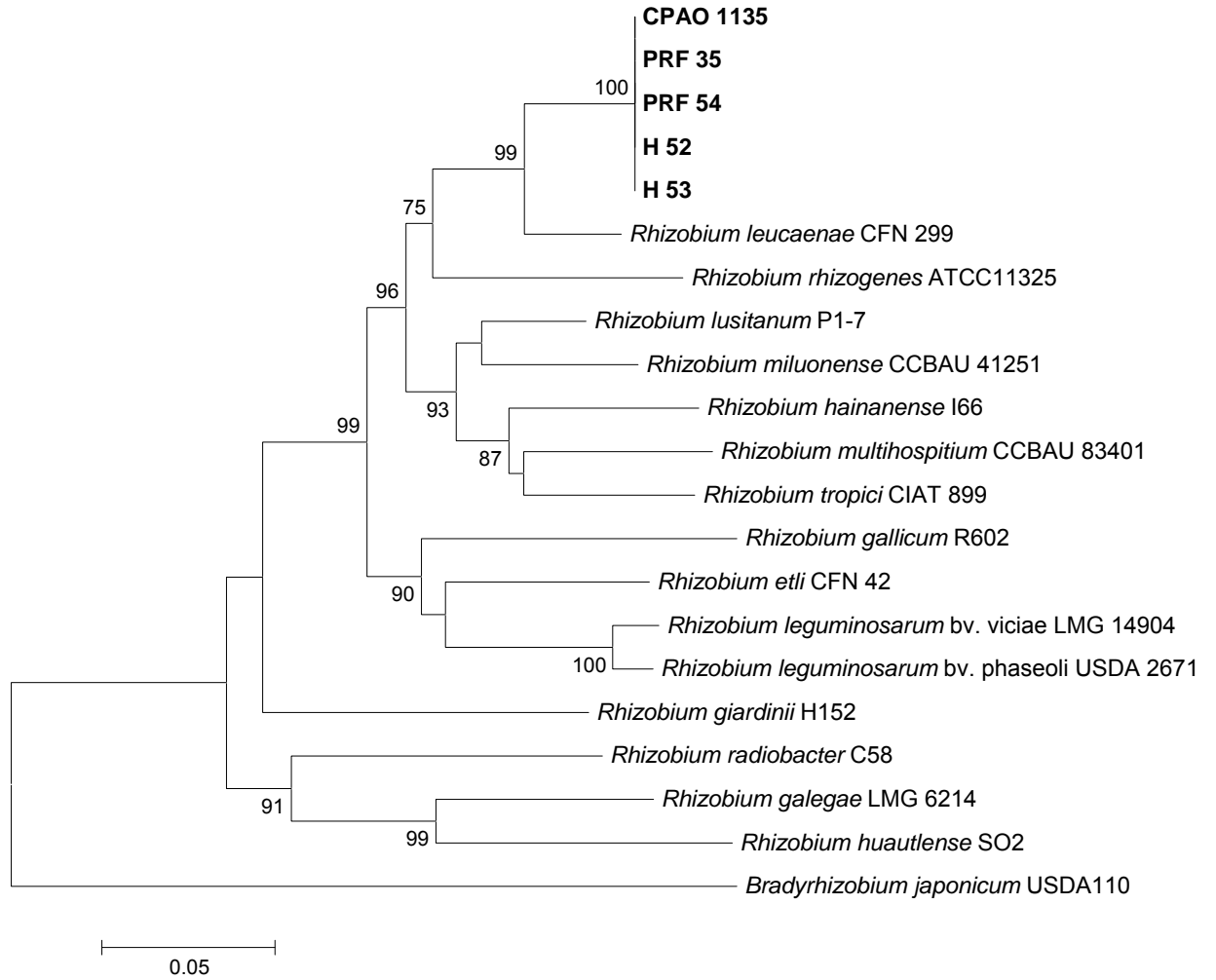
Locus	Estirpes analisadas	Nucleotídeos (%)			*Total	Frequência (%)			
		Conservados	Variáveis	Parcimônia informativa		A	T	C	G
16S rRNA	25	1192 (89,1)	139 (10,9)	106 (7,9)	1326/1338	24,5	20,6	23,1	31,8
<i>glnII</i>	21	338 (70,4)	142 (29,6)	110 (22,9)	480/480	20,6	18,1	31,5	29,8
<i>gltA</i>	18	460 (73,4)	167 (26,6)	129 (20,5)	627/627	20,9	20,2	32,0	26,9
<i>gyrB</i>	20	315 (54,3)	265 (45,7)	206 (35,5)	580/580	22,6	17,6	30,3	29,5
<i>recA</i>	22	263 (66,4)	133 (33,6)	91 (22,9)	396/396	19,2	17,7	32,6	30,6
<i>rpoA</i>	19	456 (75,6)	143 (23,7)	89 (14,7)	599/603	25,4	18,5	29,4	26,7
Concatenados	19	1381 (67,1)	674 (32,7)	480 (23,3)	2055/2059	19,9	20,3	29,7	30,1

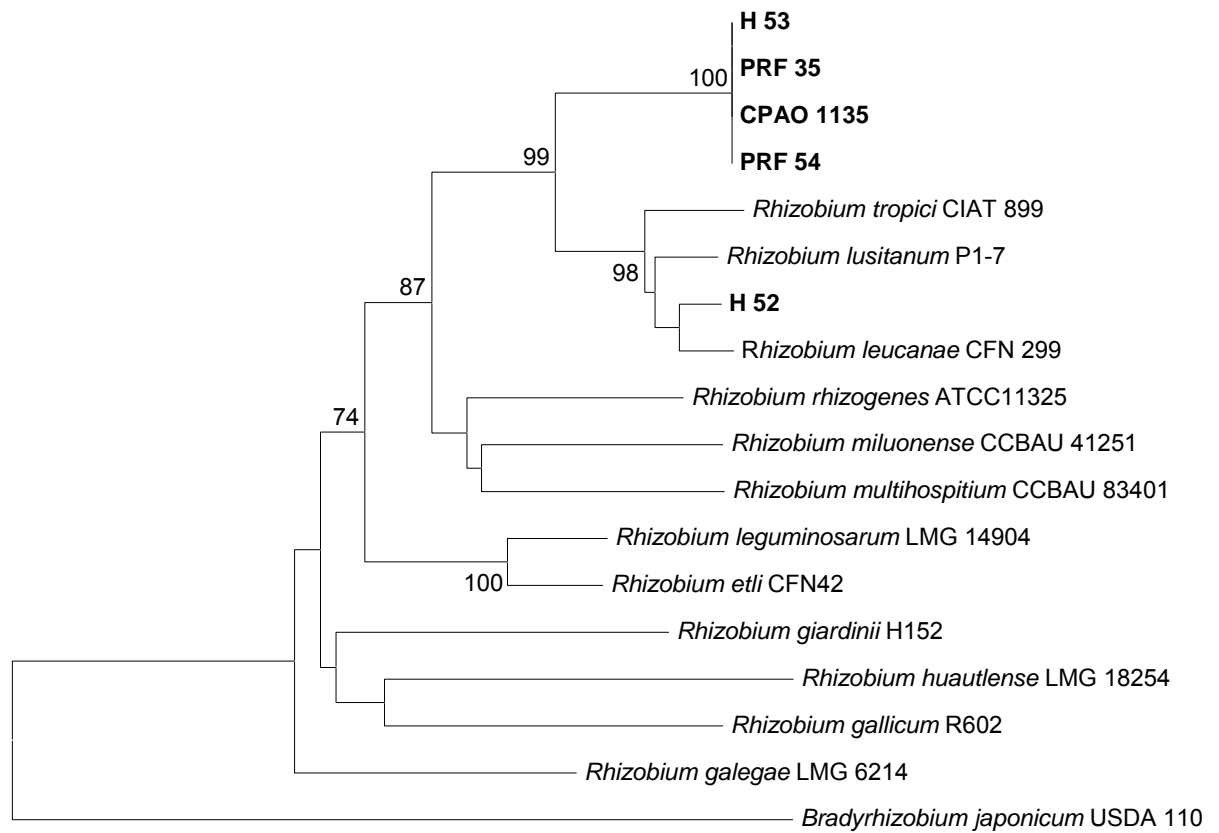
*Valores correspondentes ao tamanho total da sequência sem *gap* e com *gap*.

Figura 5 - Árvores filogenéticas das estirpes do Estudo 1, baseadas no sequenciamento dos genes *housekeeping glnII* (A), *gyrB* (B), *gltA* (C), *recA* (D) e *rpoA* (E), analisados separadamente.

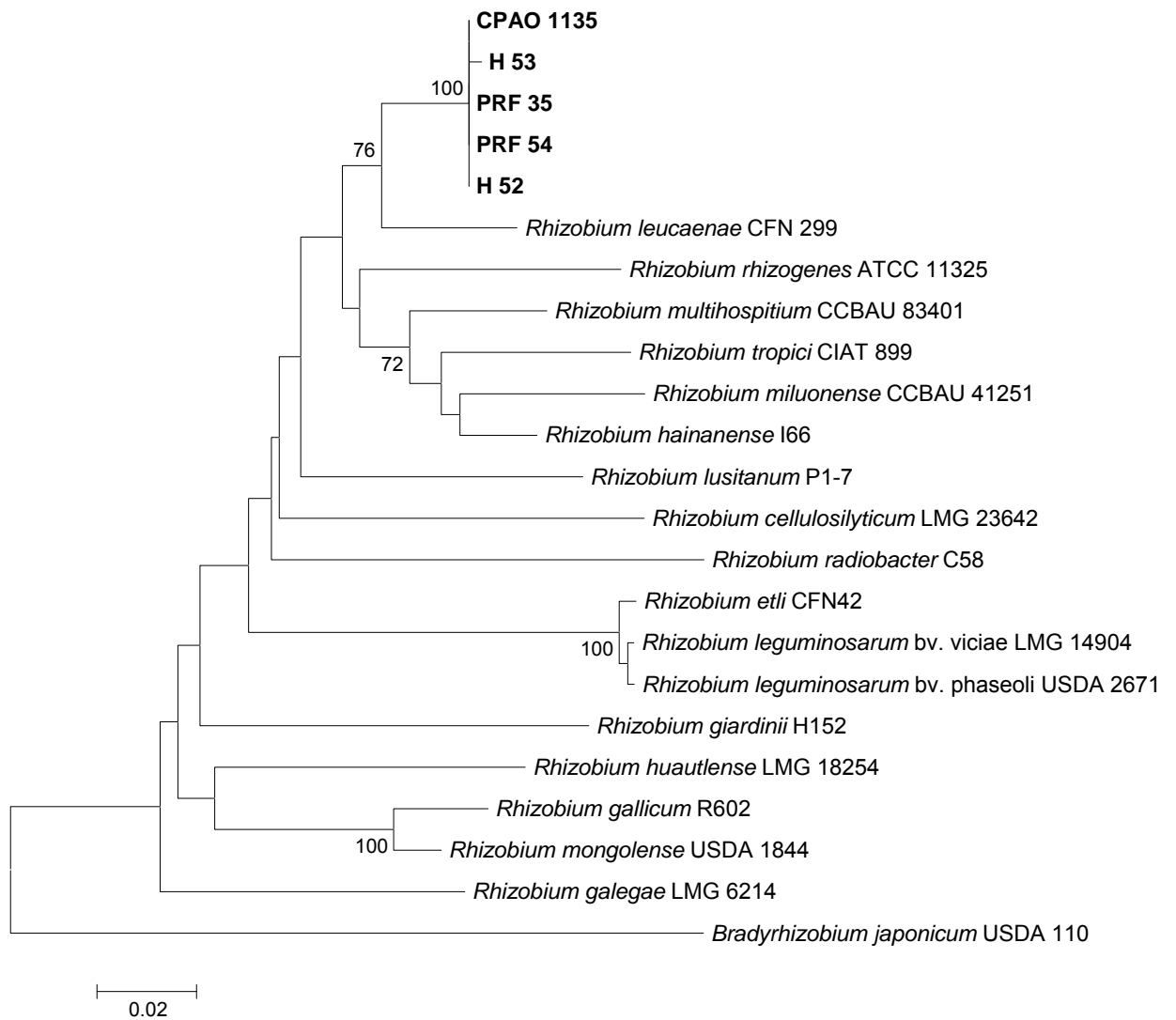
(A) *glnII*

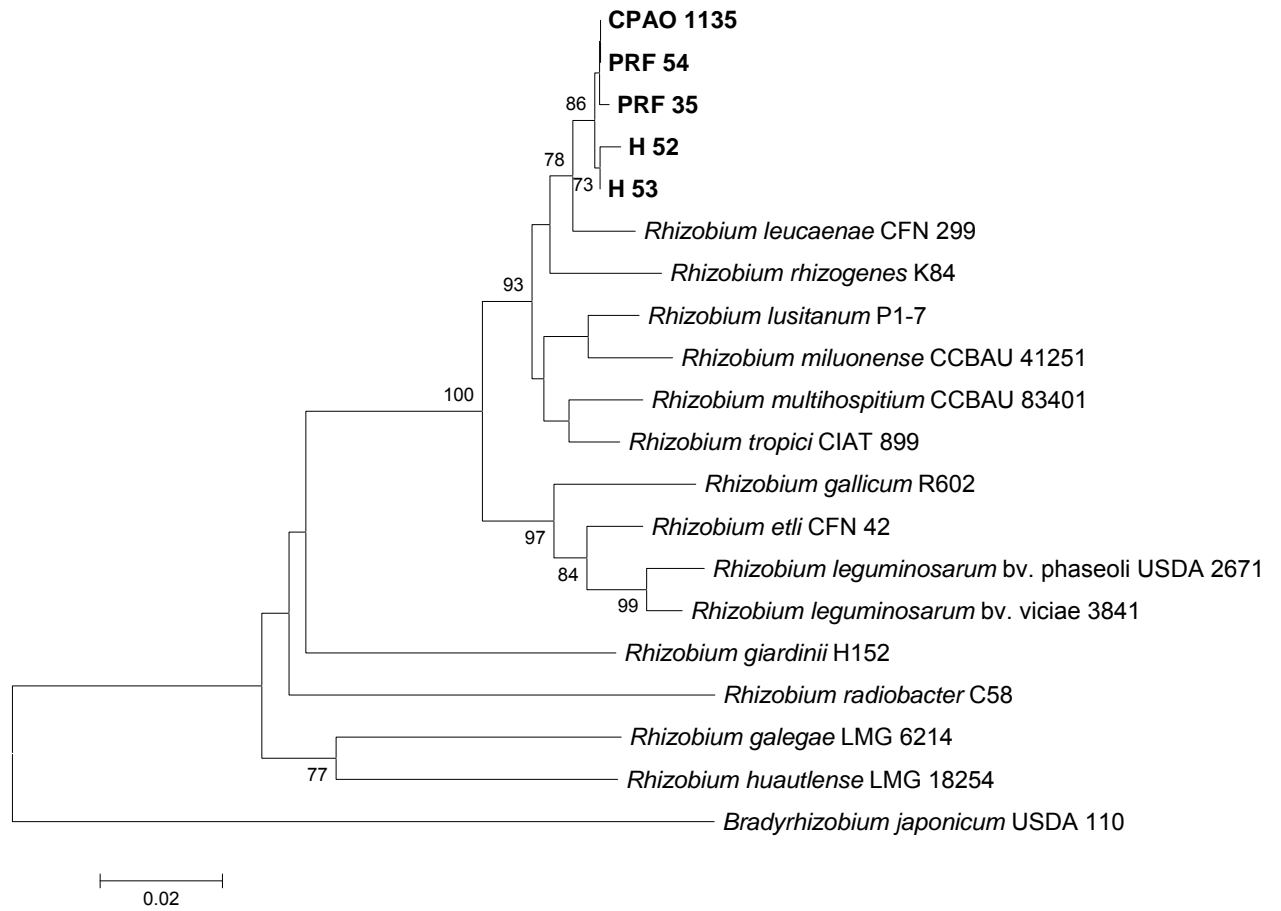


(B) *gyrB*

(C) *gltA*

0.02

(D) *recA*

(E) *rpoA*

Bradyrhizobium japonicum foi utilizado como grupo externo. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 5,1 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-joining, com *bootstrap* de 1000 repetições. Valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.

Tabela 8 - Variação de identidade nucleotídica dentro das estirpes do Estudo 1 e dessas com estirpes de referência de *Rhizobium* nos genes 16S rRNA, *glnII*, *gltA*, *gyrB*, *recA*, *rpoA* e concatenados.

ESTIRPES	GENES (%)						
	16 S	<i>glnII</i>	<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	concatenados
Similaridade:							
- dentro das estirpes deste estudo *	99,3 - 99,9	100	95,6-100	100	99,7 - 100	99,3 – 100	99,8 - 100
- entre as estirpes deste estudo e estirpes de referência:							
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2	93 - 93,3				89,6 - 89,8		
<i>Rhizobium daejeonense</i> L61	94,8 – 94,9						
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	97,2 - 97,7	87,9	90,9 – 91,3	85,8	87,8 - 88,1	94,6 – 95,1	89,3 – 89,5
<i>Rhizobium galegae</i> LMG 6214	94,2 - 94,5	87,2	88,8	80,3	87,8 - 88,1	89,1 - 89,4	86 – 86,1
<i>Rhizobium gallicum</i> R602	96,6 - 96,9	89,5	87,7 – 87,8	83,9	88,1 - 88,3	94,4 - 94,9	89,1 – 89,3
<i>Rhizobium giardinii</i> H152	95,5 - 95,7	88,9	88,3 – 88,5	82,2	87,3 - 87,6	90,3 - 90,6	87,2
<i>Rhizobium hainanense</i> I66	99 - 99, 4	94,7		86,3	93,4 - 93,6		
<i>Rhizobium huautlense</i> CCBAU 65798	94,6 - 94,8	87,7	87,2 - 86,7	78,6	86,3 - 86,6	88,9 – 89,3	85,2 – 85,4
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. phaseoli USDA 2671	97,8 - 98,2	87,9		85,5	87,8 - 88,1	93,6 - 94,1	88,8 – 89
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae LMG 14904	97,7 - 98,2	87,5	91 – 91,3	85,3	88,1 - 88,3	94,1 - 94,6	89 – 89,2
<i>Rhizobium leucaenae</i> CFN 299	98,2 - 98,5	94,5	94,5 – 98,4	94,1	95,4 - 95,7	98,3 - 98,6	95,7 – 95,8
<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7	99,2 - 99,4	90,8	94,5 - 98	89,1	91,4 - 91,6	97,3 - 97,6	92,4
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251	99,3 - 99,6	94,7	89,4 – 90,2	87,5	91,4 - 91,6	95,8 - 96,3	92,4 – 92,6
<i>Rhizobium mongolense</i> USDA 1844	96 - 96,3	89,1			89,1 - 89,3		
<i>Rhizobium multihospitium</i> CCBAU	99,1 - 99,6	92	91,2 – 91,8	85,6	93,4 - 93,6	96,6 - 97,1	91,9 – 92
<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132	97,3 - 97,8						
<i>Rhizobium radiobacter</i> C58	93,8 - 94	87,9		80,8	88,6 - 88,8	88,8 - 89,3	86,3 – 86,5
<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC 11325 **	99,2 - 99,5	91	91,2 - 90,7	87,5	91,9 - 92,4	96,9 – 97,4	92 – 92,2
<i>Rhizobium sullae</i> IS123	96,2 - 96,5						
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	99 - 99,5	93,1	93,7 - 97,6	85,8	91,4 - 91,6	96,9 - 97,4	91,9 - 92

* Estirpes PRF 35, PRF 54, CPAO 1135, H 52 e H 53.

** Sequencias do gene *rpoA* foram obtidas da estirpe *R. rhizogenes* K84.

4.2.6 Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

Os resultados obtidos com a análise concatenada dos genes *housekeeping* foram similares aqueles obtidos com os genes *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoA* individuais.

O gene *gltA* não foi utilizado na análise concatenada, uma vez que os resultados obtidos na árvore filogenética construída individualmente para este gene indicaram a possibilidade da estirpe H 52 ter sofrido recombinação genética, diminuindo a precisão da análise. Delamuta e colaboradores (2012) constataram a

eficiência do método de MLSA utilizando quatro, ao invés de cinco genes *housekeeping* em seus estudos envolvendo estirpes de *Bradyrhizobium*, dando suporte ao uso de quatro genes neste estudo com *Rhizobium*.

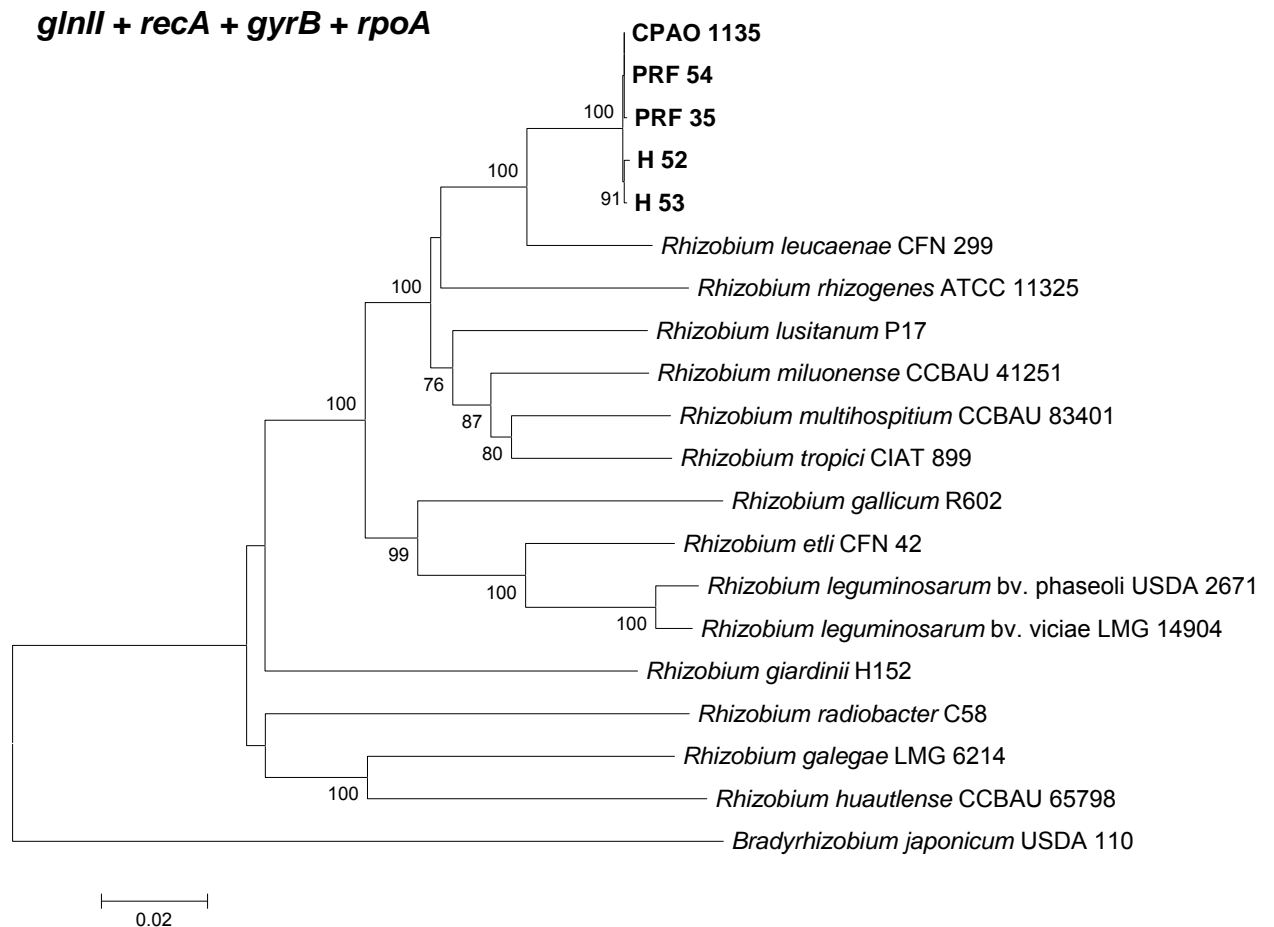
Na Figura 6 pode ser visualizado o nítido agrupamento formado por todas as cinco estirpes avaliadas neste estudo, que se posicionaram separadas das demais espécies de *Rhizobium* utilizadas como referência, com um suporte *bootstrap* de 100%. Do mesmo modo que nas árvores filogenéticas construídas para cada gene em particular, na árvore concatenada a estirpe-tipo mais próxima do agrupamento foi *R. leucaenae*, enquanto que *R. tropici* posicionou-se mais distante do mesmo, compondo um grupo em que estão presentes as espécies de referência *R. multihospitium*, *R. miluonense* e *R. lusitanum*.

A vantagem em relação à análise com base apenas do 16S rRNA foi, principalmente, o esclarecimento da real posição filogenética das estirpes utilizadas neste trabalho. Os valores de identidade nucleotídica entre espécies de referência reforçam a falta de precisão do 16S rRNA na distinção de espécies de *Rhizobium*, como pode ser visto na Tabela 8, onde as espécies já descritas apresentam valores de identidade nucleotídica superiores a 99% em suas sequências de 16S rRNA, acima do valor verificado por Vandamme *et al.* (1996), onde espécies diferentes apresentam menos de 97% de identidade em suas sequências de 16S rRNA.

Avaliando-se a identidade nucleotídica entre as sequências concatenadas observa-se uma alta identidade (> 94%) entre as estirpes deste estudo e uma baixa identidade entre estas estirpes e espécies de referência (Tabela 8). A espécie mais próxima foi, novamente, *R. leucaenae*, com 95,7% de identidade nucleotídica na análise concatenada. Konstantinidis, Ramette e Tiedje, (2006), em estudo de filogenia, utilizaram de seis a oito genes *housekeeping* para avaliar a ANI (*Average Nucleotide Identity*) de diferentes gêneros de bactérias, e verificaram que espécies diferentes apresentam menos de 96% de identidade nucleotídica na análise concatenada. Ainda, esses mesmos autores constataram que esta porcentagem corresponde precisamente ao limiar de 70% estabelecido em análises de genomas inteiros, realizados por hibridação DNA-DNA. Sendo assim, os resultados obtidos nesta avaliação por MLSA indicam que as estirpes deste estudo são fortes candidatas a representarem uma nova espécie ou subespécie de *Rhizobium*.

Cabe ainda ressaltar que a distância evolutiva observada entre as estirpes avaliadas neste estudo e a espécie de referência mais próxima, *R. leucaenae* foi considerável (Figura 6) e quase tão pronunciada quanto a distância encontrada entre espécies já descritas, como por exemplo, entre *R. tropici* e *R. multihospitium*, fortalecendo ainda mais a hipótese de que estas estirpes possam representar uma nova espécie dentro do gênero *Rhizobium*.

Figura 6 - Árvore filogenética das estirpes do Estudo 1, baseada no sequenciamento dos genes *housekeeping glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoA*, analisados conjuntamente (concatenados).



Bradyrhizobium japonicum foi utilizado como grupo externo. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 5,1 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-Joining, com *bootstrap* de 1000 repetições. Valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.

4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estirpes avaliadas neste estudo apresentaram resultados singulares em todas as análises realizadas, diferenciando-se das espécies já descritas. Os dados fenotípicos exibiram diferenças entre as estirpes deste estudo e estirpes de referência. Já os dados genotípicos de BOX e MLSA apresentaram distinções mais claras entre as estirpes deste estudo e estirpes de referência. Em relação a estes últimos, as estirpes testadas neste estudo apresentaram valores altos entre si, em relação aos limites estabelecidos para cada metodologia na discriminação de espécies (limite de 70% de similaridade para cladogramas de BOX,

de 94% de identidade nucleotídica para genes *housekeeping* e de 96% de identidade nucleotídica em árvores concatenadas de MLSA), e valores baixos quando contrastadas com espécies utilizadas como referência.

Levando em conta que estas estirpes provêm de regiões brasileiras distintas, os resultados obtidos neste trabalho sugerem fortemente que as mesmas podem representar uma nova espécie ou subespécie. Experimentos adicionais de hibridação DNA-DNA e perfil de ácidos graxos estão sendo conduzidos com a finalidade de confirmar essa hipótese.

A metodologia de MLSA permitiu discriminar efetivamente as espécies altamente relacionadas, como já havia sido constatado por outros autores em suas pesquisas de filogenia e taxonomia comentadas neste trabalho. Ainda, a proposta de Stackebrandt *et al.* (2002) de utilizar no mínimo cinco genes *housekeeping* para análises filogenéticas e classificação taxonômica foi eficazmente confirmada nesta abordagem, sendo que alguns autores confirmaram a efetividade do método com quatro (DELAMUTA *et al.*, 2012) e três (KONSTANTINIDIS; RAMETTE; TIEDJE, 2006) genes *housekeeping*. Nesse contexto, a utilização da metodologia de MLSA em detrimento da custosa e laboriosa técnica de hibridação DNA-DNA representa, claramente, uma alternativa bastante útil e confiável, além de consistir em uma ferramenta mais acessível e reproduzível em estudos de filogenia e taxonomia de procariotos.

Segundo o Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos (ICSP) (<http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/node/12>), o delineamento de uma nova espécie bacteriana deve seguir regras padronizadas, a fim de garantir a qualidade dos resultados. Neste processo, análises polifásicas são exigidas e seus resultados devem demonstrar coerência genotípica, fenotípica e filogenética entre os membros da suposta nova espécie, além da discriminação eficiente quando os mesmos são comparados com os táxons mais relacionados. Sendo assim, pode-se inferir que a abordagem polifásica realizada neste trabalho foi bastante satisfatória e promissora no que diz respeito à identificação de uma possível nova espécie para o gênero *Rhizobium*.

5 ESTUDO 2 - ABORDAGEM POLIFÁSICA NA CARACTERIZAÇÃO DA ESTIRPE PRF 81 E NO ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM* ISOLADAS EM SANTA CATARINA, SC.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Estirpes e Condições de Cultura

Neste estudo, foram utilizadas sete estirpes de *Rhizobium*, sendo uma delas atualmente classificada como *R. tropici*, mas que apresentou características distintas desta e de outras espécies do gênero em estudos antecedentes (STOCCO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009), indicando-a como potencial nova espécie, em adição a seis isolados do estado de Santa Catarina, os quais agruparam-se juntamente com PRF 81 em perfis de RFLP realizado por Stocco e colaboradores (2008).

As estirpes correspondem à própria PRF 81 (= SEMIA 4080), procedente da coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Soja, a qual já é utilizada em inoculantes comerciais no Brasil, e mais seis isolados provenientes de três diferentes cidades do estado de Santa Catarina, sendo dois deles de Curitiba (22 e 25), dois de Paineira (40 e 41) e dois de Guaiabera (80 e 81). Todas as estirpes foram isoladas por Stocco *et al.* (2008) a partir de nódulos de feijoeiro.

Além dessas estirpes, foram utilizadas espécies de referências, já mencionadas no Estudo 1.

5.1.2 Caracterização Morfológica

A caracterização foi realizada conforme descrito no Estudo 1.

5.1.3 Caracterização Fisiológica

5.1.3.1 Tolerância à antibióticos

A avaliação da resistência à determinados antimicrobianos foi realizada conforme descrito anteriormente. Foram testados os mesmos antibióticos citados no Estudo 1.

5.1.4 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada conforme descrito no Estudo 1.

5.1.5 Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

Foram utilizados os mesmos genes *housekeeping* utilizados escolhidos para o Estudo 1, com exceção de *gltA* (citrato sintase), o qual foi substituído por *dnaK* (chaperona de 70 kDa - *heat shock protein*, HSP70), também selecionado com base em estudos anteriores (MENNA; HUNGRIA; BARCELLOS, 2009a). Os ciclos de amplificação para cada gene *housekeeping* estão descritos na Tabela 9.

A purificação foi realizada como descrito no primeiro estudo.

Tabela 9 - Primers e condições de amplificação utilizadas no Estudo 2.

GENE	PRIMER	SEQUENCIA 5'- 3'	*TAMANHO	CONDIÇÕES DA PCR	REFERÊNCIAS
16S rRNA	fD1	5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'	1291 pb	2 min 95 °C, 30 x (15s 94°C, 45s 93°C, 45s 55°C, 2 min 72°C), 5 min 72°C	WEISBURG <i>et al.</i> , (1991)
	rD1	5' - AAGGAGGTGATCCAGCC– 3'			
<i>glnI</i>	TSglnIlf	5'- AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG-3'	480 pb	2 min 95°C, 35 x (45s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	STEPKOWSKI <i>et al.</i> , (2005)
	TSglnIlr	5'-SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG-3'			
<i>rpoA</i>	RRrpoAf	5'- GGAAATCGCCATCAAGATGG-3'	605 pb	2 min 95°C, 35 x (45s 94°C, 45s 55°C, 2 min 72°C), 7 min 72°C	RIBEIRO <i>et al.</i> , (2009)
	RRrpoAr	5'- ACGCTTGCGGAGATCTTC -3'			
<i>recA</i>	recA6f	5'- CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA-3	397 pb	2 min 95°C, 35 x (45s 95°C, 30s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	STEPKOWSKI <i>et al.</i> , (2005)
	recA555r	5'-CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT -3'			
<i>gyrB</i>	gyrB343f	5'- TTCGACCAGAAAYTCTAYAAGG-3'	577 pb	5 min 95°C, 5 x (2 min 94°C, 2 min 58°C, 1 min 72°C) 28 x (30 s 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C), 5 min 72°C	MARTENS <i>et al.</i> (2008)
	gyrB1043r	5'- AGCTTGCTCTSGTCTGCG-3'			
<i>dnaK</i>	dnaK1466f	5'- AAGGARCANCAGATCCGCATCCA- 3'	255 pb	2 min 95°C, 35 x (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72 °C), 7 min 72°C	MARTENS <i>et al.</i> (2007)
	dnaK1777r	5'- TASATSGCCTSRCCRAGCTTCAT – 3'			

* Tamanho das sequencias utilizadas neste estudo

5.1.6 Amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A amplificação do gene ribossomal 16S, dos genes *housekeeping* e dos elementos BOX foi realizada conforme descrito no Estudo 1.

5.1.7 Sequenciamento dos Genes e Análise Filogenética

O sequenciamento dos genes e análise filogenética foram avaliados conforme descrito no Estudo 1.

5.1.8 Análise dos Resultados

A análise dos resultados foi realizada conforme descrito no Estudo 1.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Caracterização Morfológica

Em relação às características morfológicas, pode-se observar que as estirpes provenientes das mesmas cidades apresentaram morfologia semelhante, enquanto as provenientes de cidades distintas apresentaram diferenças morfológicas (Tabela 10). Apenas a coloração rosada em vermelho Congo foi compartilhada com todas as sete estirpes avaliadas neste estudo, diferindo das espécies de referência *R. tropici*, *R. multihospitium*, *R. miluonense* e *R. hainanense*, que apresentaram coloração branca.

Os isolados 22 e 25 (provenientes de Curitiba) exibiram alto valor de diâmetro médio (6,7 mm) aos 5 dias de medição quando comparados com as outras estirpes analisadas. Entre as espécies de referência, a única a apresentar valor igualmente alto de diâmetro foi *R. miluonense*, com 7,22 mm. Já a produção de muco foi abundante, característica que pode ser compartilhada com todas as estirpes utilizadas como referência, com exceção de *R. multihospitium*, que apresentou produção moderada. A consistência da colônia foi aquosa, característica compartilhada com os isolados 40 e 41 (provenientes de Painel) e diferindo de todas

as demais, que apresentaram consistência gomosa. Esses dois isolados apresentaram transparência em suas propriedades ópticas, assemelhando-se à *R. tropici* e aos isolados 40 e 41, e diferenciando-se das demais estirpes, que apresentaram opacidade.

Os isolados 40 e 41 foram similares entre si em todas as características apresentadas. Em relação à produção de muco, esses isolados se assemelharam à PRF 81, isolados 80 e 81 e às estirpes de referência *R. leucaenae* e *R. multihospitium*, todos apresentando produção moderada. A consistência da colônia e suas propriedades ópticas já foram discutidas anteriormente.

Os isolados 80 e 81, provenientes de Guaiabeira, apresentaram duas características distintas das outras estirpes em estudo, sendo elas a consistência da colônia gomosa (diferindo dos isolados 22, 25, 40 e 41) e opacidade em relação às propriedades ópticas (diferindo de PRF 81). Essas características, juntamente com as demais propriedades morfológicas aproximam esses dois isolados da espécie de referência *R. leucaenae*, que apresentou os mesmos atributos.

Foi interessante observar que a estirpe PRF 81 (atualmente classificada como *R. tropici*), quando comparada com demais estirpes de referência, apresentou propriedades morfológicas mais próximas de *R. leucaenae* e *R. rhizogenes*, das quais a mesma diferiu somente em relação às propriedades ópticas (*R. leucaenae*) e produção de muco (*R. rhizogenes*), enquanto que, quando comparada com *R. tropici*, diferiu em relação à produção de muco e coloração da colônia em meio de cultura YMA contendo vermelho Congo.

Tabela 10 - Propriedades morfológicas das estirpes de *Rhizobium* utilizadas no Estudo 2.

CNPSO	SINÔNIMO	DIÂMETRO (5 DIAS APOS MANIF. CRESCIMENTO)	PRODUÇÃO DE MUÇO	CONSISTÊNCIA	PROPRIEDADES ÓPTICAS	VERMELHO CONGO
122	PRF 81	3,78 mm	Moderado	Gomosa	Transparente	Rosado
2099	22	7,42 mm	Abundante	Aquosa	Transparente	Rosado
2101	25	5,97 mm	Abundante	Aquosa	Transparente	Rosado
2110	40	3,23 mm	Moderado	Aquosa	Transparente	Rosado
2111	41	3,10 mm	Moderado	Aquosa	Transparente	Rosado
2267	80	2,26 mm	Moderado	Gomosa	Opaco	Rosado
2268	81	2,22 mm	Moderado	Gomosa	Opaco	Rosado
241	<i>R. leucaenae</i>	3,91 mm	Moderado	Gomosa	Opaco	Rosado
242	<i>R. tropici</i>	4,89 mm	Abundante	Gomosa	Transparente	Branco
2054	<i>R. multihospitium</i>	3,62 mm	Moderado	Gomosa	Opaco	Branco
2055	<i>R. lusitanum</i>	4,34 mm	Abundante	Gomosa	Opaco	Rosado
2056	<i>R. miluonense</i>	7,22 mm	Abundante	Gomosa	Opaco	Branco
2450	<i>R. hainanense</i>	4,84 mm	Abundante	Gomosa	Transparente	Branco
86	<i>R. rhizogenes</i>	5,68 mm	Abundante	Gomosa	Transparente	Rosado

* Todas as estirpes apresentaram resultados idênticos em relação à taxa de crescimento, reação ácido/básica, forma, borda, superfície, elevação e coloração em azul de bromotimol.

5.2.2 Caracterização Fisiológica

5.2.2.1 Tolerância à antibióticos

Os perfis obtidos na avaliação da tolerância a antibióticos pelas estirpes deste estudo foram diversos, sendo encontradas diferenças tanto entre as estirpes analisadas, quanto entre essas estirpes e espécies de referência. Igualmente ao ocorrido nos perfis morfológicos, estirpes de mesma procedência apresentaram resultados semelhantes, enquanto estirpes provenientes de cidades distintas apresentaram tolerâncias diferenciadas aos antibióticos testados (Tabela 11). Foram encontradas semelhanças apenas em relação aos antibióticos penicilina (10 U) e ácido nalidíxico (30 µg), aos quais todas as sete estirpes analisadas apresentaram resistência.

Em relação aos demais antimicrobianos, os isolados 22 e 25 (Curitibanos) apresentaram-se resistentes à clorafenicol (30 µg), cefuroxima (30 µg) e ampicilina (10 µg), sensíveis em relação à eritromicina (15 µg) e tetraciclina (30 µg) e moderadamente resistentes em relação à neomicina (30 µg). Já em relação à estreptomicina (10 µg), o isolado 22 mostrou-se moderadamente resistente, enquanto o isolado 25 mostrou-se tolerante. Em comparação com estirpes de referência, o isolado 22 apresentou perfil mais próximo de *R. miluonense* e *R. multihospitium*, diferindo em dois dos nove antibióticos testados, sendo estes antibióticos clorafenicol, para *R. miluonense*, neomicina, para *R. multihospitium* e eritromicina, para ambos. Já o isolado 25 apresentou perfil mais próximo de *R. tropici*, diferindo em relação à neomicina e eritromicina.

As estirpes 40 e 41 apresentaram as maiores disparidades dentre as bactérias oriundas de mesma região de isolamento. Essas diferenças foram encontradas em relação aos antibióticos clorafenicol, estreptomicina, ampicilina e tetraciclina, aos quais o isolado 40 exibiu resistência e o isolado 41 exibiu tolerância moderada ao primeiro e sensibilidade aos três últimos. Em relação aos demais antibióticos, ambos apresentaram resistência à cefuroxima, eritromicina, penicilina e ácido nalidíxico, e resistência moderada à neomicina. Em relação às estirpes de referência, o isolado 40, assim como o isolado 25, apresentou perfil com maior semelhança à *R. tropici*, no entanto, foram observadas diferenças quanto aos antibióticos neomicina e tetraciclina. Já o isolado 41 apresentou perfil mais próximo de *R. miluonense*, diferindo em relação ao clorafenicol e à estreptomicina.

Os isolados 80 e 81 apresentaram perfis idênticos entre si, apresentando sensibilidade a todos os antibióticos testados, com exceção dos já mencionados, ácido nalidíxico e penicilina, aos quais apresentaram resistência. Assim como ocorrido na avaliação morfológica, esses dois isolados apresentaram perfis que os aproximaram de *R.*

leucaenae, sendo que, nesta avaliação fisiológica, os mesmos diferiram em relação à eritromicina e penicilina.

A estirpe PRF 81 apresentou resistência aos antibióticos ácido nalidíxico, cefuroxima, eritromicina e penicilina; resistência moderada aos antibióticos ampicilina e neomicina; e sensibilidade a clorafenicol, estreptomicina e tetraciclina. Quando comparada com as demais estirpes deste segundo estudo, a PRF 81 apresentou perfil com maior semelhança ao do isolado 40, diferindo em relação aos antimicrobianos ampicilina e clorafenicol (sendo moderadamente resistente ao primeiro e sensível ao segundo, enquanto o isolado 40 apresentou resultado inverso, ou seja, sensibilidade ao primeiro e resistência moderada ao segundo). Já quando comparada com estirpes de referência, esta estirpe apresentou perfil mais semelhante à espécie *R. lusitanum*, diferindo apenas em relação à ampicilina, onde a mesma exibiu resistência moderada e *R. lusitanum* exibiu sensibilidade.

Assim como já comentado no Estudo 1, perfis de tolerância a antibióticos podem variar entre indivíduos de uma mesma espécie, uma vez que as estirpes podem doar e receber plasmídeos de resistência por conjugação bacteriana (BERINGER, 1974). Entretanto, caracterizações fenotípicas são importantes na classificação de espécies, uma vez que servem de suporte para outras avaliações aplicadas no microrganismo em estudo.

Tabela 11 - Tolerância das estirpes do Estudo 2 e estirpes de referência a diferentes antibióticos. 1) Isolado 22; 2) Isolado 25; 3) Isolado 40; 4) Isolado 41; 5) Isolado 80; 6) Isolado 81; 7) PRF 81 8) *R. leucaenae*; 9) *R. tropici*; 10) *R. lusitanum*; 11) *R. miluonense*; 12) *R. multihospitium*; 13) *R. hainanense*; 14) *R. rhizogenes*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ac. Nalidíxico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	mr	-
Ampicilina	+	+	+	-	-	-	mr	-	+	-	+	+	-	-
Clorafenicol	+	+	+	mr	-	-	-	-	+	-	-	+	+	mr
Cefuroxima	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Eritromicina	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Estreptomicina	mr	+	+	-	-	-	-	-	+	-	mr	mr	+	mr
Neomicina	mr	mr	mr	mr	-	-	mr	-	-	mr	mr	-	mr	-
Penicilina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Tetraciclina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

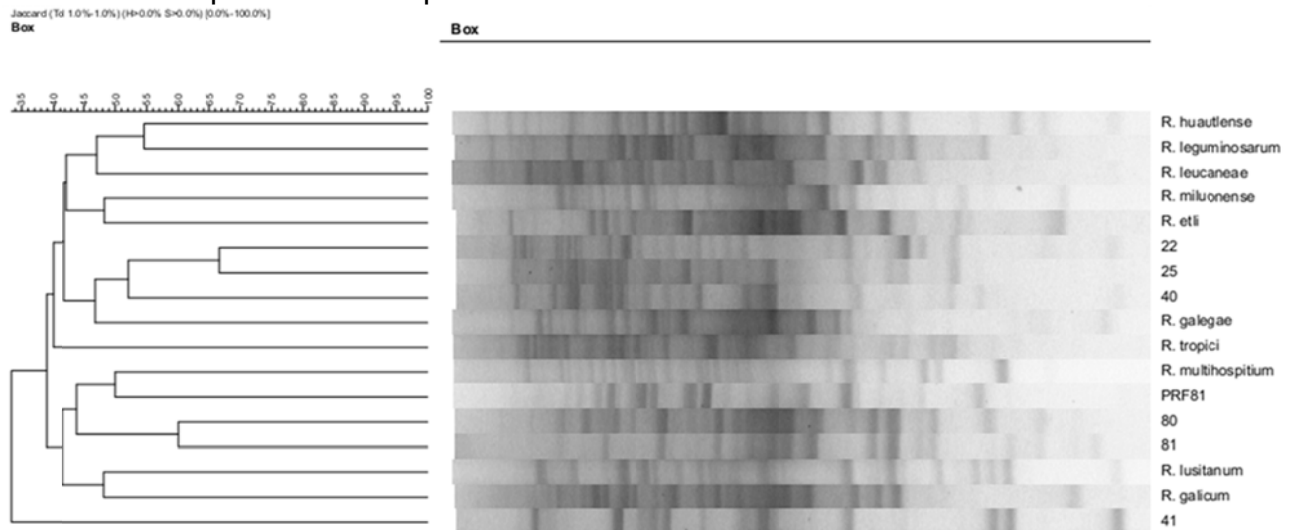
(+) resistente; (mr) moderadamente resistente; (-) sensível.

5.2.2.2 BOX-PCR

No dendograma gerado ao nível de 70% (Figura 7), observa-se que os isolados 22, 25 e 40 agruparam-se próximos de *R. galegae*, e apresentaram um nível de similaridade baixo entre si, sendo 66% entre os isolados 22 e 25, 52% entre estes e o isolado 40, e 47% deste último com *R. galegae*. Os isolados 80, 81, a estirpe PRF 81 e a estirpe de referência *R. multihospitium* formaram um agrupamento com similaridade inferior ao grupo anterior. Os níveis correspondem à 59% entre 80 e 81, 49% entre PRF 81 e *R. multihospitium* e 43,5% entre os isolados e estes últimos. O isolado 41 ocupou uma posição bastante distinta, sendo o perfil com maior disimilaridade entre todas as estirpes do dendograma. Nota-se que, mesmo no subgrupo formado entre isolados provenientes das mesmas cidades, a similaridade entre eles foi baixa (< 70%).

Como já comentado no primeiro estudo, espécies distintas não apresentam níveis de similaridade superiores a 70%, segundo os trabalhos de Grange e Hungria (2004), Kaschuk *et al.* (2006) e Menna *et al.* (2009b), indicando que, em análises genéticas obtidas por comparação de perfis de BOX, as estirpes deste estudo não apresentam similaridade suficiente para serem alocadas dentro de uma mesma espécie.

Figura 7 - Dendograma baseado no *fingerprinting* pela metodologia de BOX-PCR, aplicado às estirpes do Estudo 2.



Os *clusters* foram obtidos pelo programa Bionumerics (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Bélgica, v. 4.6). Para a análise de agrupamento, foi utilizado o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) e o coeficiente de Jaccard com 1% de tolerância.

5.2.3 16S rRNA

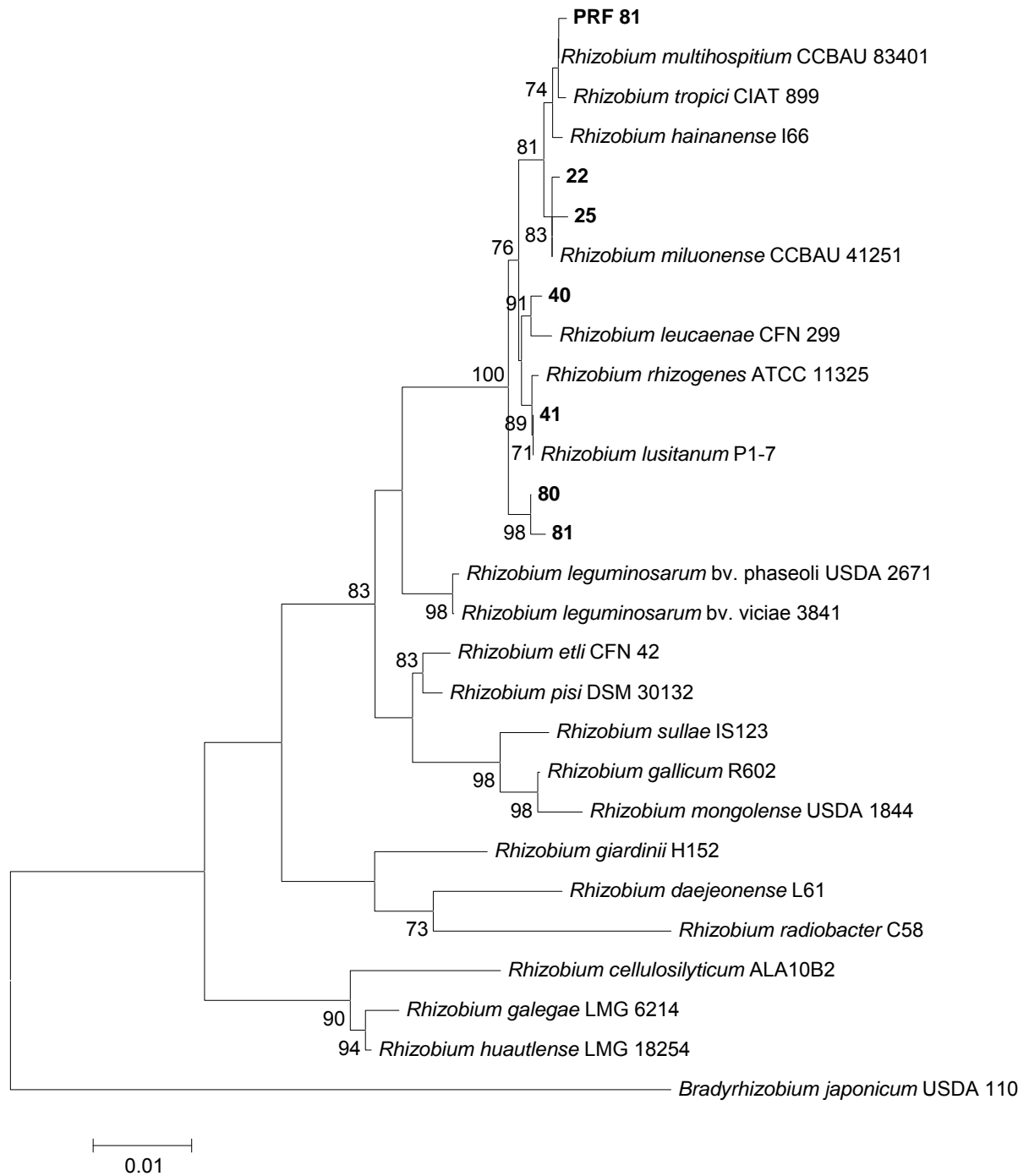
A árvore filogenética construída com base no gene ribossomal 16S posicionou juntos os isolados provenientes das mesmas cidades (com exceção dos isolados 40 e 41, os quais ficaram em grupos separados) e distantes os isolados provenientes de cidades diferentes (Figura 8). Assim como ocorrido anteriormente, as representantes deste estudo posicionaram-se no mesmo agrupamento que contém as estirpes de referência do “grupo tropici”.

As estirpes provenientes de Curitiba, que correspondem aos isolados 22 e 25, agruparam-se com *R. miluonense*, com um suporte *bootstrap* de 79%, enquanto as provenientes de Guaiabera (isolados 80 e 81) formaram um subgrupo separado das demais estirpes de referência (*bootstrap* - 96%). O isolado 41, proveniente de Painel, alocou-se juntamente com *R. lusitanum* e *R. rhizogenes*. Já o isolado 40, também proveniente de Painel, agrupou-se com *R. leucaenae*. A estirpe PRF 81 posicionou-se no subgrupo composto pelas estirpes de referência de *R. tropici*, *R. hainanense* e *R. multihospitium*, ficando mais próxima desta última (*bootstrap* - 71%).

Tais resultados apontam a existência de diversidade entre os isolados de *Rhizobium* provenientes de Santa Catarina e contrastam com os

resultados de RFLP e BOX obtidos por Stocco *et al.* (2008). Isso demonstra que análises com base unicamente no 16S rRNA não são suficientes para discriminar com clareza a posição filogenética das espécies, como já comentado anteriormente.

Figura 8 - Árvore filogenética das estirpes do Estudo 2, baseada no sequenciamento do DNA ribossomal 16S.



Bradyrhizobium japonicum foi utilizado como grupo externo. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 5,1 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-joining, com *bootstrap* de 1000 repetições. Valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.

5.2.4 Diversidade dos Genes *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA* e *rpoA*

As árvores filogenéticas construídas com base nos genes *housekeeping* individuais apresentaram padrões semelhantes entre si, porém, diferentes do padrão obtido com o 16S rRNA. Os isolados 22 e 25, por exemplo, agruparam-se juntamente com *R. tropici* em quase todas as árvores (Figura 9), com exceção da árvore filogenética construída com base no gene *rpoA*, onde os mesmos formaram um grupo à parte, tendo como grupo irmão aquele composto pela estirpe PRF 81, *R. miluonense* e *R. lusitanum* (Figura 9D). Os isolados 80 e 81 agruparam-se com *R. leucaenae* em todas as árvores filogenéticas. Os isolados 40 e 41, apesar de provirem da mesma cidade (Painel), agruparam-se próximos somente na árvore filogenética do gene *rpoA*, onde se posicionaram com *R. radiobacter*. O isolado 41 agrupou-se com *R. lusitanum* em todas as outras árvores (*bootstrap* – 100% em *glnII*, *dnaK*, *gyrB* e *recA*), e o isolado 40 agrupou-se com *R. multihospitium* na árvore filogenética do gene *gyrB* (*bootstrap* - 97%, Figura 9B), com *R. radiobacter* na árvore filogenética do gene *rpoA* (*bootstrap* – 91%, Figura 9D) e em posição isolada nas demais árvores (Figura 9A, C e E). A estirpe PRF 81 agrupou-se com *R. miluonense* nas árvores filogenéticas dos genes *gyrB*, *recA* e *dnaK*; com *R. miluonense*, *R. hainanense*, *R. multihospitium* e *R. lusitanum* na árvore filogenética do gene *glnII* (Figura 9A) e com *R. miluonense* e *R. lusitanum* na árvore construída para o gene *rpoA* (Figura 9D). Esse resultado é interessante, pois demonstrou que esta estirpe, a qual está atualmente classificada como *R. tropici*, possuiu um perfil genético mais semelhante à *R. miluonense* do que à *R. tropici* em relação aos genes do metabolismo basal analisados neste trabalho.

Em todas as árvores filogenéticas as estirpes apresentaram diversidade entre si, no entanto, algumas estirpes apresentaram diversidade distinta da encontrada na análise pelo 16S rRNA. Um exemplo é a posição dos isolados 22 e 25, os quais agruparam-se com *R. miluonense* na árvore do 16S rRNA e com *R. tropici* na maior parte das outras árvores (Figura 9).

A única semelhança encontrada entre as duas análises foi o fato das estirpes procedentes da mesma cidade se posicionaram sempre juntas (exceto os isolados 40 e 41), tanto na análise dos genes *housekeeping*, quanto na árvore do 16S rRNA. É importante, também, ressaltar que todas as estirpes de referência com as quais os isolados se agruparam pertencem ao já citado “grupo *tropici*” (*R.*

leucaenae, *R. tropici*, *R. lusitanum*, *R. miluonense*, *R. multihospitium* e *R. rhizogenes*) (RIBEIRO *et al.*, 2012).

A Tabela 12 contém informações acerca da porcentagem dos sítios conservados, sítios variáveis, frequência nucleotídica e a parcimônia informativa de cada gene *housekeeping*. Neste grupo de estirpes, os genes *housekeeping* exibiram maior porcentagem de parcimônia informativa que o 16S rRNA na elucidação da posição filogenética dos isolados, semelhante ao ocorrido com as estirpes analisadas no Estudo 1. Os valores correspondem a 36,4% para *gyrB* (210 pb), 33,3 % para *dnaK* (85 pb), 25 % para *recA* (99 pb), 23,7 % para *glnII* (114 pb) e 17,5 % para *rpoA* (106 pb). Coincidentemente, o gene *gyrB* foi, também, o que apresentou a maior parcimônia informativa neste segundo estudo.

Entretanto, as estirpes deste trabalho apresentaram porcentagens de identidade nucleotídica baixas e variáveis, tanto entre si quanto entre as estirpes de referência. As porcentagens intraespécie variaram de 89,3 a 96,2% para o gene *glnII*, 90,3 a 99,5% para o gene *dnaK*, 85,4 a 100% para o gene *gyrB*, 88,1 a 100 para o gene *recA* e 87,4 – 99,6 para o gene *rpoA* (Tabela 13). Entre o grupo de estirpes em análise e espécies de referência, a maior parte dos valores ficou ao redor de 87%, uma porcentagem considerada baixa segundo Thompson *et al.* (2005), que propôs um mínimo de 94% de identidade nucleotídica entre genes *housekeeping* para estirpes pertencentes à mesma espécie. As porcentagens obtidas na análise concatenada também foram baixas segundo o limiar verificado por Konstantinidis, Ramette e Tiedje (2006), onde espécies diferentes apresentaram menos de 96% de identidade na análise concatenada.

Devido à alta diversidade encontrada entre as estirpes deste segundo estudo, as identidades nucleotídicas foram novamente calculadas, de forma a contrastar os isolados com a espécie de referência mais próxima obtida na árvore concatenada (Tabela 14). As porcentagens obtidas nessa última análise foram maiores que 96% para a maioria dos genes calculados entre 22, 25 e *R. tropici*; entre 41 e *R. miluonense*; entre 80, 81 e *R. leucaenae* e próxima desse valor entre PRF 81 e *R. miluonense*. A estirpe 40 não foi incluída na análise por ter ocupado uma posição isolada na árvore concatenada.

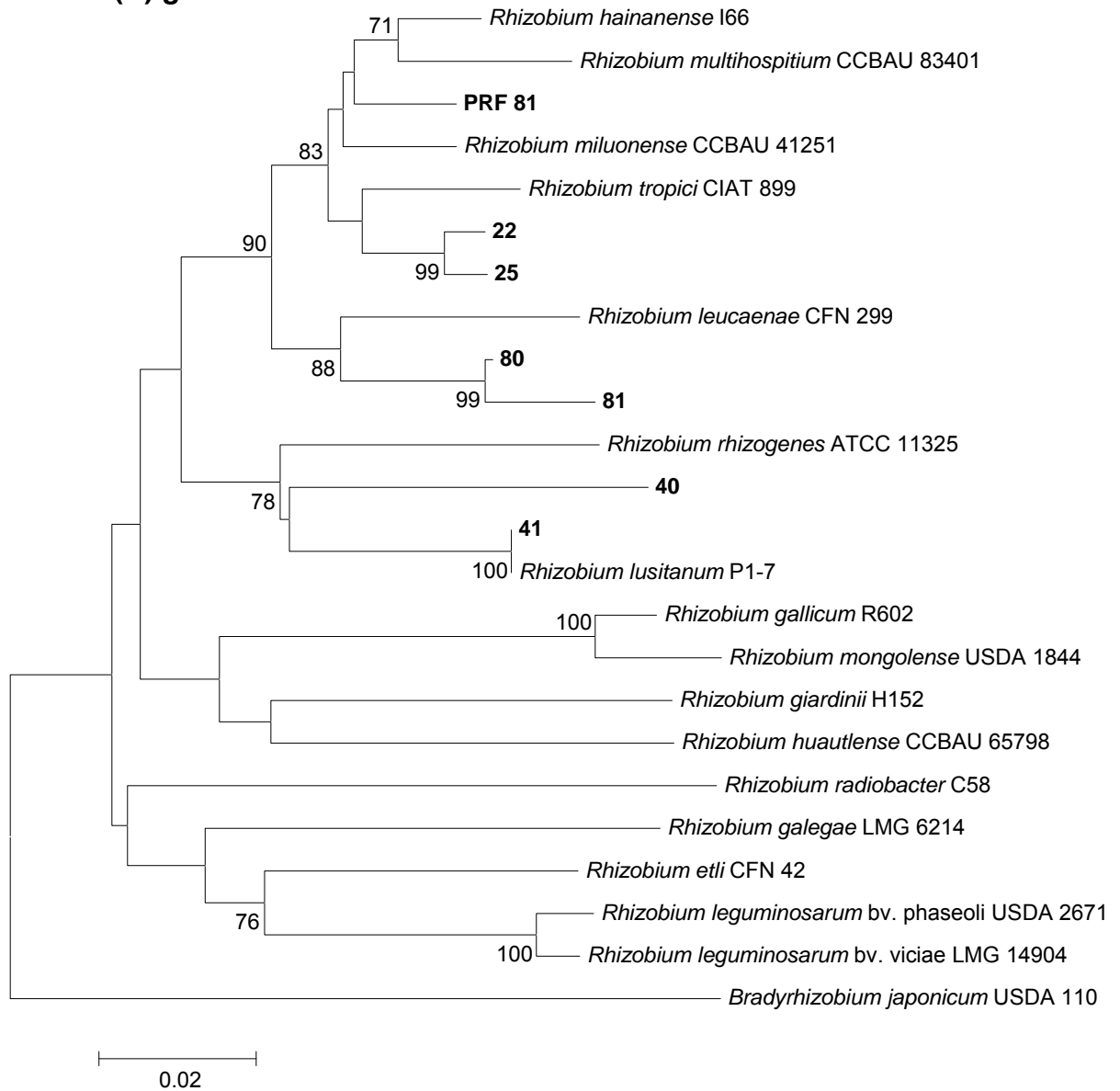
Tabela 12 - Informações sobre as sequências obtidas no Estudo 2. Sete estirpes foram analisadas, juntamente com 13 - 20 estirpes de referência.

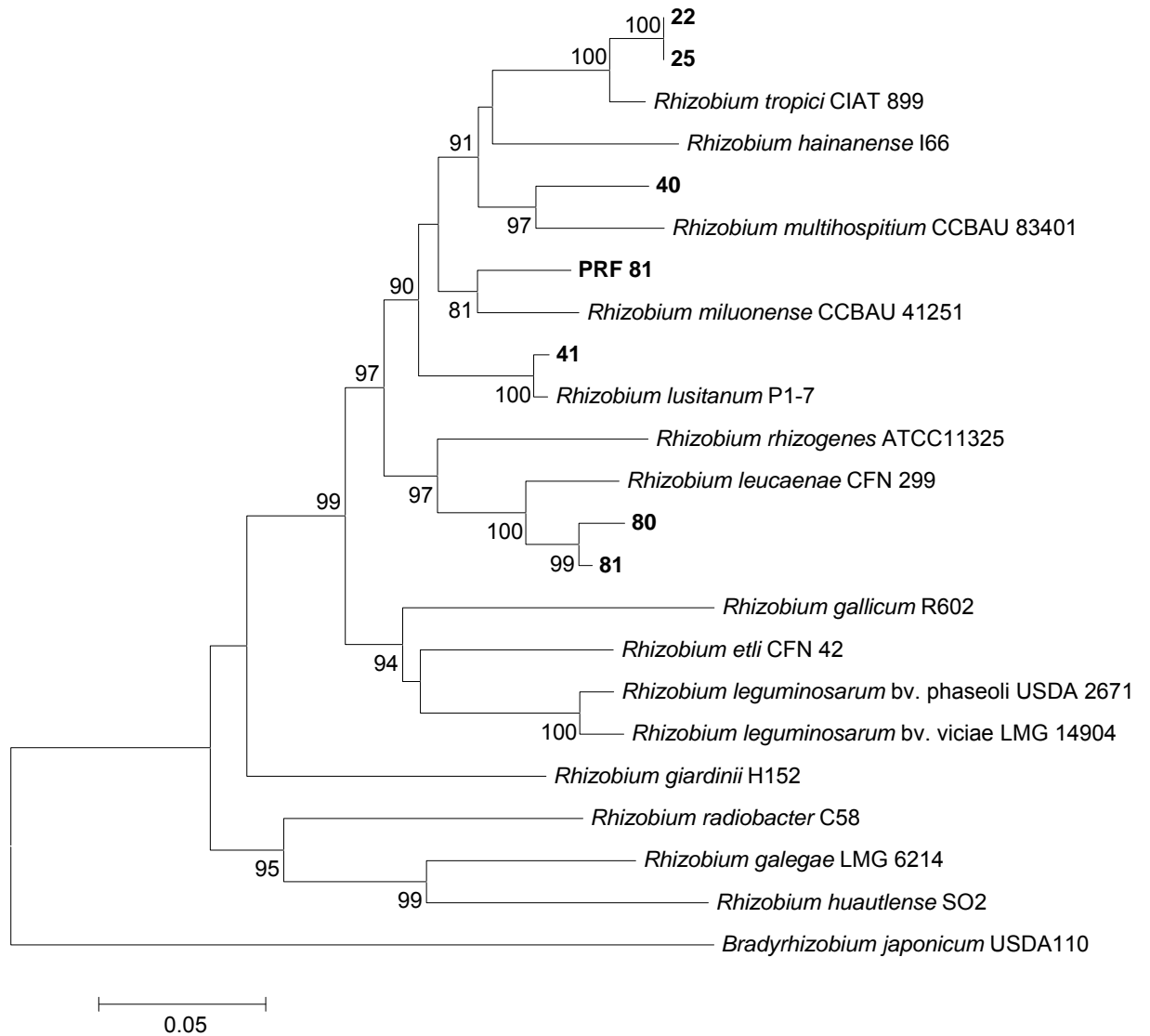
Locus	Estirpes analisadas	Nucleotídeos (%)				Frequência (%)			
		Conservados	Variáveis	Parcimônia informativa	*Total	A	T	C	G
16S rRNA	27	1145 (88,6)	137 (10,6)	110 (8,52)	1274/1291	24,4	20,7	23,2	31,7
<i>glnI</i>	23	329 (68,5)	151 (31,5)	114 (23,7)	480/480	21,0	17,4	32,5	29,2
<i>dnaK</i>	23	149 (58,4)	106 (41,5)	85 (33,3)	255/255	27,4	12,5	29,4	30,6
<i>gyrB</i>	22	310 (53,7)	267 (46,3)	210 (36,4)	577/577	22,7	17,7	30,5	29,2
<i>recA</i>	24	258 (65)	139 (35)	99 (25)	397/397	19,0	18,1	31,5	31,5
<i>rpoA</i>	21	456 (75,4)	143 (23,6)	106 (17,5)	599/605	19,0	25,3	26,9	28,8
Concatenados	20	1509 (65,2)	799 (34,5)	599 (25,9)	2308/2314	21,1	19,1	30,0	29,6

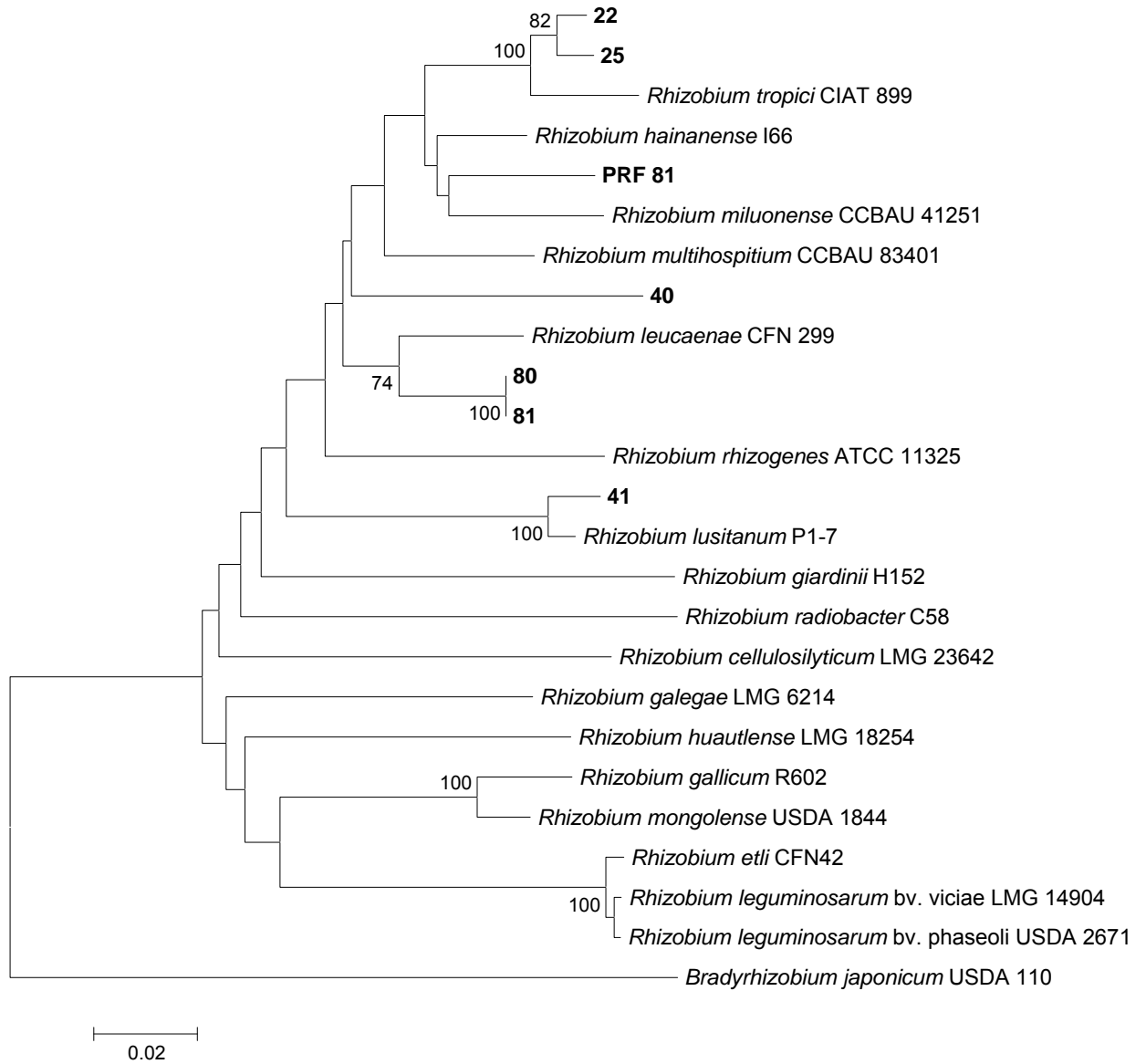
*Valores correspondentes ao tamanho total da sequência sem *gap* e com *gap*.

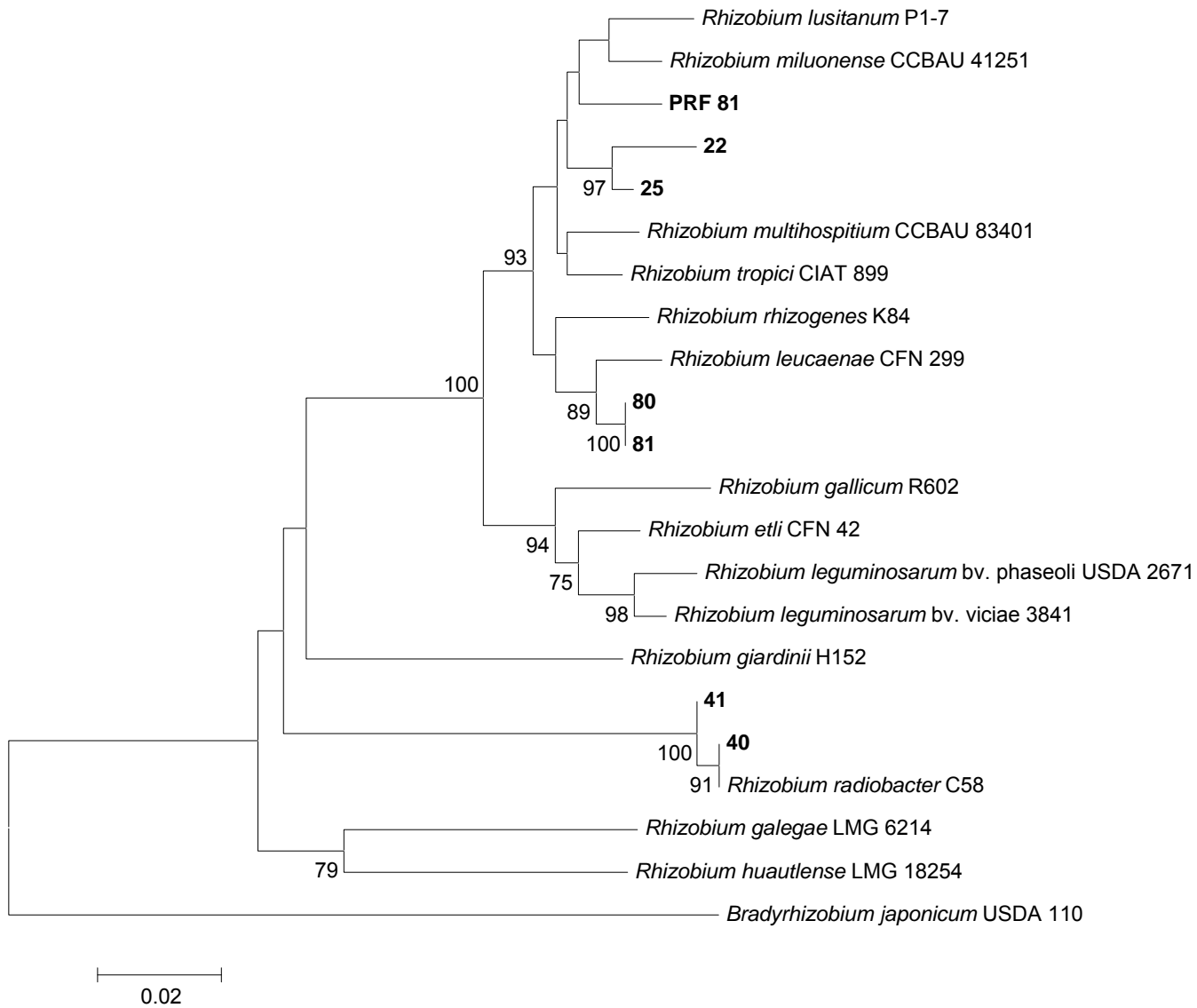
Figura 9 - Árvore filogenética das estirpes do Estudo 2, baseada no sequenciamento dos genes *housekeeping* (A) *glnII*, (B) *gyrB*, (C) *recA*, (D) *rpoA* e (E) *dnaK*, analisados separadamente.

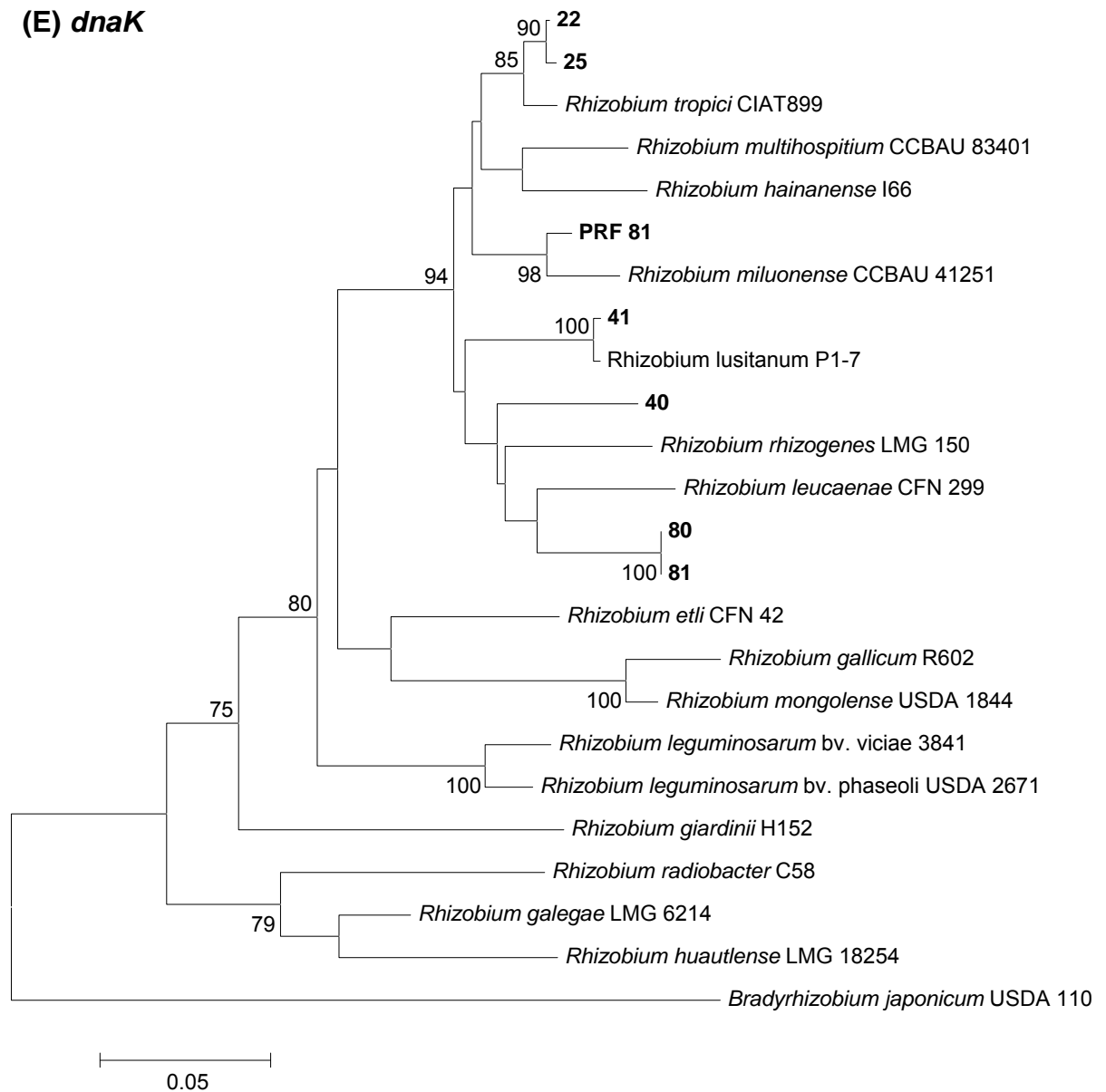
(A) *glnII*



(B) *gyrB*

(C) recA

(D) rpoA

(E) *dnaK*

Bradyrhizobium japonicum foi utilizado como grupo externo. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 5,1 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-Joining, com *bootstrap* de 1000 repetições. Valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.

Tabela 13 - Variação de identidade nucleotídica dentro das estirpes analisadas no Estudo 2 e dessas com as estirpes de referência de *Rhizobium* nos genes 16S rRNA, *glnII*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA* e concatenados.

ESTIRPES	GENES (%)						
	16 S	<i>glnII</i>	<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	Concatenados
Similaridade:							
- dentro das estirpes deste estudo *	98,8 – 99,5	89,3 – 98,9	90,1 – 100	85,6 - 100	88,1 - 100	87,4 – 99,6	89,2 - 99
- entre estirpes deste estudo e estirpes de referência:							
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2	92,9 – 93,5				88,4 – 100		
<i>Rhizobium daejeonense</i> L61	94 – 94,5					88,6 –	
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42	96,9 – 97,6	87,2 – 89,1	85,4 – 87,8	84,7 – 86,6	86,1 – 88,4	97,6	86,5 – 89,3
<i>Rhizobium galegae</i> LMG 6214	94 – 94,6	87 – 88,5	81,1 – 83,9	77,6 – 79,8	86,3 – 88,4	87,2 – 95,1	84,7 – 85,4
<i>Rhizobium gallicum</i> R602	96,1 – 96,8	86 – 90,6	81,5 – 84,3	82,6 – 84,4	86,6 – 88,6	87,9 – 94,6	85,7 – 88,8
<i>Rhizobium giardinii</i> H152	94,8 – 95,3	87,7 – 90	80,7 – 82,7	81,4 – 83,5	86,6 – 87,6	88,3 – 90,8	85,2 – 86,7
<i>Rhizobium hainanense</i> I66	98,8 – 99,5	90,8 – 97	89 – 93,3	85,7 – 90,4	90,4 – 95,4		
<i>Rhizobium huautlense</i> CCBAU 65798	94,4 – 94,9	86,2 – 90,6	75,6 – 79,2	75,3 - 79	86,1 – 87,4	87,3 – 89	82,2 – 84,6
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. phaseoli USDA 2671	97,4 – 98,1	87,2 – 89,1	84,7 – 87,8	84 – 86,6	86,6 – 88,4	86,8 – 94,4	86,1 – 89,1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae LMG 14904	97,4 – 98,2	87,7 – 89,3	82,7 – 87	83,8 – 86,6	86,3 – 88,6	87,3 – 95,6	86 – 89,2
<i>Rhizobium leucaenae</i> CFN 299	98,6 – 99,4	89,7 – 94,7	89,4 – 92,9	85,7 – 95,1	89,1 – 95,7	89,1 – 98,3	89 – 95,4
<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7	99,1 – 99,8	91 – 100	90,9 – 99,6	88,9 - 99,1	89,1 – 98,4	88,4 – 97,3	89,9 – 96,5
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251	99,2 – 99,8	91 – 96,6	88,2 – 97,2	86,8 – 93,9	89,4 – 94,2	88,4 – 97,6	90 – 95,9
<i>Rhizobium mongolense</i> USDA 1844	95,5 – 96,2	87,7 – 89,5	82,3 – 85,4		86,9 – 89,6		
<i>Rhizobium multihospitium</i> CCBAU	98,9 – 99,6	88,5 – 94,3	88,6 – 94,5	85,4 – 90,8	89,4 – 93,7	88,3 – 96,9	89,2 – 93,5
<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132	97 – 97,7					87,4 -	
<i>Rhizobium radiobacter</i> C58	92,8 – 93,4	85,4 – 88,9	78,4 – 80,3	78,8 – 80,9	84,3 – 88,6	100	84,3 – 87,7
<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC 11325	99,1 – 99,8	90,6 – 93,5	90,5 – 91,3	84,5 – 88,9	88,4 – 92,4	87,6 – 97,1	88,3 – 92,4
<i>Rhizobium sullae</i> IS123	95,9 – 96,4					88,6 –	
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	98,8 – 99,6	90,6 – 96,4	91,3 – 98,4	89,6 – 97,4	87,9 – 96,4	97,6	90 – 97,1

* Estirpe PRF 81 e isolados 22, 25, 40, 41, 80 e 81.

Tabela 14 - Porcentagem da variação de identidade nucleotídica dentro das estirpes analisadas neste estudo de acordo com a região de isolamento e dessas com as estirpes de referência de *Rhizobium* mais próximas nos genes *glnII*, *dnaK*, *gyrB*, *recA*, *rpoA* e concatenados.

ISOLADO 22, ISOLADO 25 X <i>R. TROPICI</i>					
<i>dnaK</i>	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	concatenados
98 – 99,6	96,2 – 98,9	97,4 - 100	96,2 – 98,7	96,6 – 98,3	96,9 – 99
ISOLADO 41 X <i>R. LUSITANUM</i>					
<i>dnaK</i>	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	concatenados
99,6	100	99,1	98,4	88,8	96,5
ISOLADO 80, ISOLADO 81 X <i>R. LEUCAENAE</i>					
<i>dnaK</i>	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	concatenados
92,9 – 100	93,7 – 98,5	94,4 – 98,2	95,7 - 100	98,1 – 99,5	95,4 – 99,1
PRF 81 X <i>R. MILUONENSE</i>					
<i>dnaK</i>	<i>glnII</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	concatenados
97,2	96,6	93,9	94,2	97,9	95,9

5.2.5 Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

Semelhante ao ocorrido no primeiro estudo os resultados obtidos através da análise concatenada dos cinco genes *housekeeping* foram similares àqueles obtidos para os genes individuais. Cabe comentar, no entanto, que os perfis de MLSA revelaram agrupamentos diferentes daqueles obtidos com o BOX-PCR e com as análises morfofisiológicas.

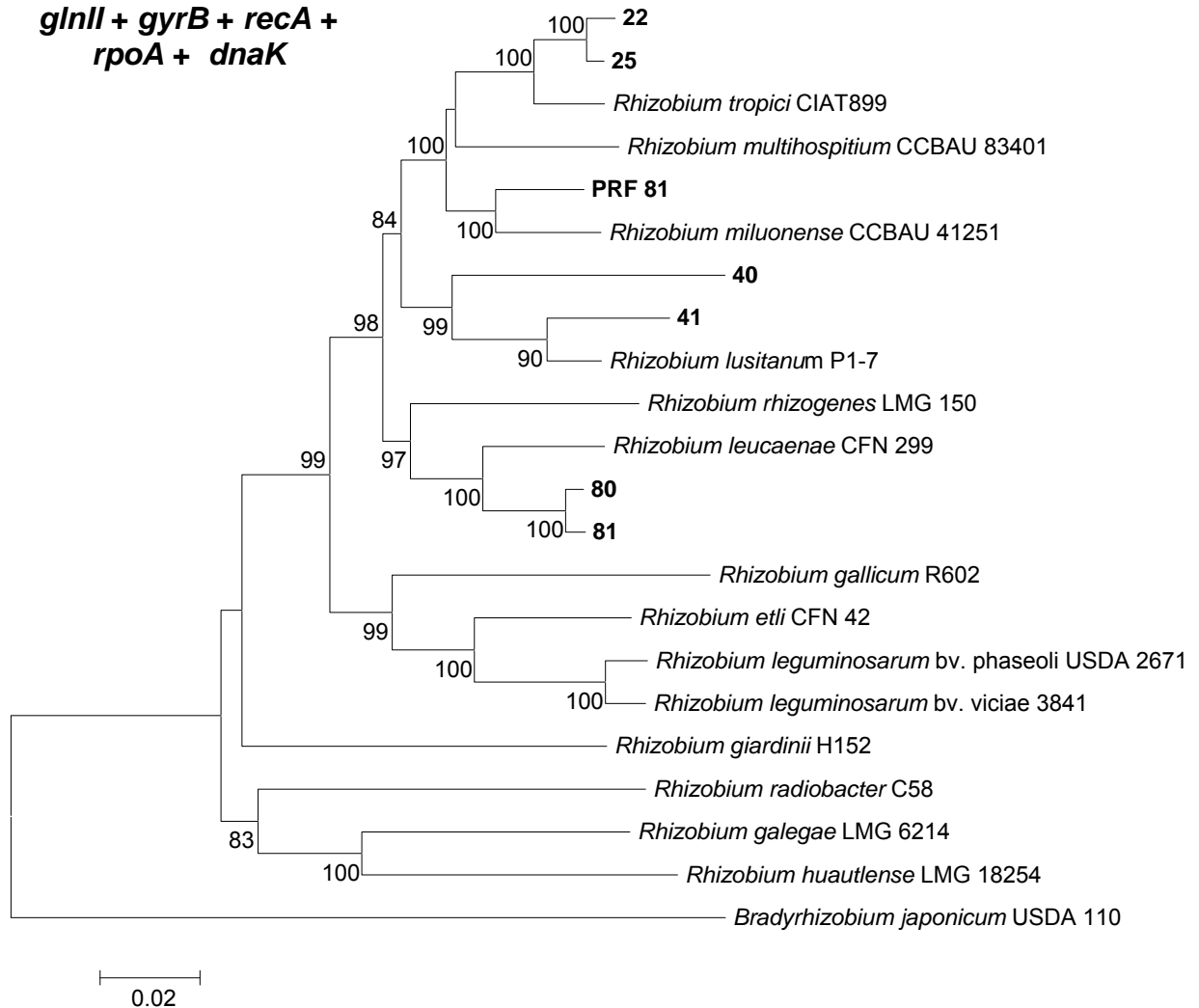
Os isolados 22 e 25 foram agrupados juntamente com *R. tropici*, tal como havia ocorrido na análise dos genes *housekeeping* individuais, com um suporte de *bootstrap* a 100% (Figura 10). Da mesma forma, os isolados 80 e 81 posicionaram-se novamente no mesmo grupo de *R. leucaenae*, e apresentaram um valor de *bootstrap* igual à 100%. O isolado 41 agrupou-se com *R. lusitanum* (*bootstrap* – 97%), conforme havia ocorrido anteriormente, e o isolado 40, cuja posição foi a mais incerta em todas as análises, posicionou-se isoladamente na árvore concatenada. A estirpe PRF 81 também seguiu o padrão encontrado para os genes individuais, agrupando-se juntamente com *R. miluonense* (*bootstrap* – 100%).

As estirpes PRF 81 e 40 exibiram perfis filogenéticos singulares, correspondendo às estirpes com mais potencial para representar novas espécies, porém, são necessários testes adicionais para que se possa confirmar esta hipótese.

Tanto as análises morfofisiológicas quanto as árvores filogenéticas geradas pela metodologia de MLSA demonstraram que alguns dos isolados apresentaram maior similaridade a outras espécies de *Rhizobium* do que à *R. tropici*, contrastando com os resultados de RFLP obtidos por Stocco *et al.* (2008) e comprovando que análises polifásicas são altamente promissoras na classificação de estirpes.

Pelo fato das estirpes deste estudo terem apresentado diferenças substanciais entre si, pesquisas futuras para este grupo envolverão análises visando averiguar a identidade dos isolados 22 e 25 com *R. tropici*, dos isolados 80 e 81 com *R. leucaenae* e do isolado 41 com *R. lusitanum*. Para os isolados 40 e PRF 81, os quais apresentaram perfis genéticos únicos, análises mais refinadas deverão executadas, como hibridação DNA-DNA e perfis de ácidos graxos.

Figura 10 - Árvore filogenética das estirpes do Estudo 2, baseada no sequenciamento dos genes *housekeeping glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoA* e *dnaK*, analisados conjuntamente (concatenados)



Bradyrhizobium japonicum foi utilizado como grupo externo. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 5,1 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-Joining, com *bootstrap* de 1000 repetições. Valor da barra indica a porcentagem de substituição nucleotídica.

5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos de filogenia e taxonomia têm se mostrado cada vez mais relevantes na definição e classificação de estirpes de *Rhizobium*. A diversidade fenotípica e genética relatada para as estirpes avaliadas neste trabalho forneceu suporte para a sugestão de que muitas espécies classificadas atualmente como *R. tropici* poderiam estar mais relacionadas a outras espécies do gênero.

O perfil obtido por BOX-PCR evidenciou essa diversidade. Apesar da baixa similaridade entre as estirpes, aquelas provenientes das mesmas cidades sempre foram agrupadas juntas nesta análise, e exibiram uma similaridade ainda menor quando comparadas com estirpes de referência. O fato da estirpe 40 ter apresentado um perfil único indica que a mesma não se relaciona com nenhuma bactéria do grupo em estudo, nem mesmo com a 41, proveniente da mesma cidade onde aquela foi isolada, além de não se relacionar com nenhuma estirpe-tipo utilizada como referência nesta análise genética.

A metodologia de MLSA mostrou-se, mais uma vez, ser uma ferramenta rápida e eficaz e, neste estudo, permitiu identificar a diversidade genética entre estirpes antes classificadas como pertencentes a uma mesma espécie. Tanto na análise de genes *housekeeping* individuais, quanto na análise dos genes concatenados, as estirpes agruparam-se com as mesmas estirpes-tipo utilizadas como referência, e foram congruentes com a árvore filogenética gerada para o 16S rRNA, esclarecendo as relações filogenéticas. Muito provavelmente, a classificação de cada estirpe está relacionada com a estirpe de referência com a qual foram agrupadas, sendo as estirpes 22 e 25 as únicas que continuam alocadas próximas de *R. tropici*, no entanto são necessárias mais informações para garantir o correto posicionamento dessas estirpes dentro deste táxon. O mesmo se aplica às outras estirpes avaliadas neste trabalho. Interessantemente, a estirpe 40 apresentou novamente um perfil singular, corroborando com o resultado obtido por BOX-PCR, e indicando-a como potencial nova espécie.

Os resultados deste estudo contribuíram para discriminar estirpes provenientes de diferentes cidades de Santa Catarina que antes estavam classificadas dentro de uma única espécie, e colaborou para melhor classificá-las em estudos futuros. Assim como comentado no Estudo 1, a metodologia de MLSA foi bastante eficiente neste estudo, e a utilização dos genes *housekeeping* mostrou ser igualmente efetivo nesta abordagem.

6 REFERÊNCIAS

- ACHTMAN, M.; WAGNER, M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 431-440, 2008.
- ALFAIA, S. S. Caracterização e distribuição das formas do nitrogênio orgânico em três solos da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 2, p. 135-140, 2006.
- AMANN, R. I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D. A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 762-770, 1990.
- AMARGER, N., MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 996-1006, 1997.
- ASERSE, A. A. 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.
- BARRERA, L. et al. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 1086–1091, 1997.
- BATISTA, J. S. S. et al. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 260-284, 2007.
- BAUER A. W., KIRBY, E. M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BERGEY, D. H. et al.. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 1st edn. Baltimore, USA: Williams & Wilkins; 1923.
- BERINGER, J. E. R Factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v. 84, p. 188-198, 1974.
- BRILL, W. J. Nitrogen fixation: basic to applied. **American Scientist**, v. 67, p. 458-466, 1979.
- BROM, S.; MARTÍNEZ, S.; D'AVILA, G.; PALACIOS, R. Narrow and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1280-1283, 1988.
- BUCHANAN, R. E. Approved lists of bacterial names. In: SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. (Eds.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, p. 225-240. 1980.
- CANNONE, J. J. et al. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. **BMC Bioinformatics**, v. 3, p. 1-31, 2002.

- CARDOSO, J. D.; HUNGRIA, M. ANDRADE, D. S. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 2035–2049, 2012.
- CASSMAN, K. G. Agriculture's contribution to the reactive nitrogen load. In: **IFA - 71st Annual Conference**. Philadelphia: IFA, 2003. Disponível em: < <http://www.fertilizer.org/HomePage/LIBRARY/Publication-database.html/Agriculture-s-Contribution-to-the-Reactive-Nitrogen-Load.html> >. Acesso em jun 2011.
- CASSMAN, K. G. Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality and precision agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 5952-5959, 1999.
- CHARLES, L. et al. Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by use of multiple genetic loci. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 5700–5708, 2005.
- CHEN, W. X; YAN, G. H; LI, J. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 392-397, 1988.
- CHEN, W. X.; TAN, Z. Y.; GAO, J. L.; YING LI, Y.; WANG, E. T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 870-873, 1997.
- CHUEIRE, L. M. O; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência Do Solo**, v. 27, n. 5, p. 833-840, 2003.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects the lactic acid bacteria as a test case. **Microbiology**, v. 149, p. 3507-3517, 2003.
- COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J. J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3427-3436, 2001.
- COHN, H. J. Validity of the genus *Alcaligenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 44, p. 353–360, 1942.
- DE LAJUDIE, P. et al. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 369-382, 1998.
- DELAMUTA, J. R. K.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P. BANGEL, E. V. HUNGRIA, M. Multilocus Sequence Analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 698-710, 2012.

DELONG, E. F.; WICKHAM, G. S.; PACE, N. R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. **Science**, v. 243, p. 1360-1363, 1989.

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

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

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

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L., WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FARRAND, S. K.; VAN BERKUM, P. B.; OGER, P. *Agrobacterium* is a definable member of the family *Rhizobiaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 53, p. 1681–1687, 2003.

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

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

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

FRESCO, L. O. Plant nutrients: What we know, guess and do not know. In: **IFA-FAO Agriculture Conference, Global Food Security and the Role of Sustainable Fertilization**. Rome: FAO, 2003. Disponível em <<http://www.fertilizer.org/HomePage/LIBRARY/Publication-database.html/Plant-Nutrients-What-We-Know-Guess-and-Do-not-Know.html>>. Acesso em abr 2011

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G. M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9th ed., v.1, The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria 2nd ed. New York: The Williams & Wilkins, Springer-Verlag, 2001. pp. 119-154.

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

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

GILLER, K. E. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2001. 448p.

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

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

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

GU, C. T. et al. *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.

HAN, T. X. et al. *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 58, p. 1693-1699, 2008.

HARRIS, J. K; KELLEY, S. T; SPIEGELMAN, G. B.; PACE, N. R. The genetic core of the universal ancestor. **Genome Research**, v. 13, p. 407-412, 2003.

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

HERNÁNDEZ-LUCAS, I. et al. Phylogenetic relationships of rhizobia based on citrate synthase gene sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 703–706, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

HUNGRIA, M. et al. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, v. 288, p. 343-356, 2006.

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

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

INTERNATIONAL COMMITTEE OF SISTEMATIC OF PROKARIOTS, ICSP. Available at: <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/node/12>. Accessed 6 Jan 2013.

INNES, M. A.; MYAMBO, K. B.; GELFAND, D. H.; BROW, M. A. D. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 9355-9359, 1988.

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

JARVIS, B. D. W. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 895-898, 1997.

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

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

- JORDAN, D.C.; ALLEN, N.O. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In: BUCHNAN, R.E.; GIBBONS, N.E. (Eds.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. v. 1. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co., 1974. p. 235-244.
- 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.
- KELLEY, K. R; STEVENSON. J. F. Forms and nature of organic N in soil. **Fertilizer Research**, v. 42, p. 1–11, 1995.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.
- KLENK, H. P.; GOKER, M. En route to a genome-based classification of *Archea* and *Bacteria*? **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 175–182, 2010.
- KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v. 5, p. 408-418, 1995.
- KONSTANTINIDIS, K. T., RAMETTE, A., TIEDJE, J. M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7286–7293, 2006.
- LLORET, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. M. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 47, p. 43-60, 2005.
- LU, J.; KANG, I.; HE, X.; XU, D. Multilocus sequence analysis of the rhizobia from five woody legumes in southern China. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 30, p. 5343-5353, 2011.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Review**, v. 15, p. 155–173, 1994.
- MAGNANI, G. S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar**. 2005. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. pp.126-192.
- MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 200-214, 2008.

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

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

MARTÍNEZ, E.; PARDO, M. A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M. A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, v. 131, p. 1779-1786, 1985.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Rhizobium* phylogenies and bacterial diversity. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 15, p. 113-140, 1996.

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

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

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

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

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

MICHIELS, J., DOMBRECHT, B., VERMEIREN, N., XI, C., LUYTEN, E., VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 193-205, 1998.

MME (Ministério de Minas e Energia). Secretaria de geologia, mineração e transformação mineral-SGM. **Relatório Técnico 75**: Perfil dos Fertilizantes N-P-K, 2009. (J. Mendo Consultoria Empresarial Ltda., Produtos, 49).

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

MORGANTE, P. G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**. Acesso em 02/06/2011. Disponível em <http://pt.scribd.com/doc/3319817/Fixacao-Biologica-e-Assimilacao-de-Nitrogenio>, 2003.

- 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.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950, 2001.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=147700&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>, acesso em 20 de Outubro de 2011.
- NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (Eds.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 3-8.
- NORSE, D. Fertilizers and world food demand implications for environmental stresses. In: **IFA-FAO Agriculture Conference, Global Food Security and the Role of Sustainable Fertilization**. Rome: FAO, 2003. Disponível em: <http://www.fertilizer.org/ifa/publicat/PDF/2003_rome_norse.pdf>. Acesso em: abril 2011.
- OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB Journal**, v. 7, p. 113–123, 1993.
- OLSEN, G. J.; WOESE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 1-6, 1994.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-740, 1997.
- PEIX, A. et al. *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 2067–2072, 2003.
- PINSTRUP-ANDERSEN, P. Global food security: Facts, myths and policy needs. In: **IFA-FAO Agriculture Conference, Global Food Security and the Role of Sustainable Fertilization**. Rome: FAO, 2003. <<http://www.fertilizer.org/ifa/content/view/full/8894>>. Acesso em junho de 2011.
- PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1851-1864, 2007.
- POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. 252p.
- POSTGATE, J. R.; HILL, S. Nitrogen fixation. In: LYNCH, J. M.; POOLE, N. J. (Eds.) **Microbial ecology, a conceptual approach**. Oxford: Blackwell, 1979. p. 191-213.

PULAWSKA, J.; WILLENS, A.; DE MEYER, S. E.; SÜLE, S. *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 215-220, 2012.

QUINTO, C.; FLORES, M.; LEEMANS, J.; CEVALLOS, M. A.; PARDO, M. A.; AZPIROZ, R.; GIRARD, M. L.; CALVA, E.; PALACIOS, R. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 1170-1174, 1985.

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

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

REN, D. W.; CHEN, W. F.; SUI, X. H.; WANG, E. T. CHEN, W. X. *Rhizobium vignae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 580–586, 2011.

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.; ROGEL, M. A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ORMEÑO-ORRILLO, E. BARCELLOS, F. G.; MARTÍNEZ, J. THOMPSON, F. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1180-1185, 2012.

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

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319–339, 1999.

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

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

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

- SANTOS, L. A.; REIS, V. M. **A Formação do nódulo em leguminosas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, jun. 2008. 36p. (Embrapa Soja. Documentos, 251).
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 374–377, 1993.
- SNEATH, P. H. A. **International code of nomenclature of Bacteria (1900 revision)**, Washington: American Society for Microbiology, 1992.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification.** San Francisco: W.H. Freeman & Co, 1973. 573 p.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume-*Rhizobium* technology.** NIFTAL, MIRCEN, University of Hawaii Press, Maui, 1985.
- STACKEBRANDT, E. et al. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1043-1047, 2002.
- STEPKOWSKI, T.; CZAPLINSKA, M.; MIEDZINSKA, K.; MOULIN, L. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha *Proteobacteria*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 483-494, 2003.
- STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRZYŻAŃSKA, A. MCINNES, A.; LAW, I.J.; HOWIESON, J. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of western Australia and south Africa. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7041-7052, 2005.
- STOCCO, P.; SANTOS, J. C. P.; VARGAS, V. P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 1107-1120, 2008.
- STRAININFO. Available at: <http://www.straininfo.net>. Accessed 25 Out 2012.
- THOMAS, V. C.; KEVAN, P. Basic principles of agroecology and sustainable agriculture. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 5, p. 1-19, 1993.
- THOMPSON, F. L. et al. Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of Multilocus Sequence Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5107-5115, 2005.
- TORRES, A. R. et al. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L) rhizobia from the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 852-856, 2009.

- TURNER, S. L.; YOUNG, J. P. W. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 309-319, 2000.
- VALVERDE, A.; IGUAL, J. M.; PEIX, A.; CERVANTES, E.; VELAZQUEZ, E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2631-2637, 2006.
- VAN BERKUM, P. Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 729-734, 1999.
- VAN BERKUM, P., TEREFWORK, Z., PAULIN, L., SUOMALAINEN, S.; LINDSTROM, K.; EARDLY, B. D. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2988–2998, 2003.
- 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*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 13-22, 1998.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.
- VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Eds). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 1997. p. 297-360.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).
- VINUESA, P. et al. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania microsymbionts* from Venezuelan wetlands. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 702–716, 2005.
- WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes. In: TRIPLETT, E.W. (Ed.) **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process**. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press, 2000. p. 177–186.

- WANG, F. Q., WANG, E. T., ZHANG, Y. F. & CHEN, W. X. Characterization of rhizobia isolated from *Albizia spp.* in comparison with microsymbionts of *Acacia spp.* and *Leucaena leucocephala* grown in China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 502–517, 2006.
- WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIE, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.
- WERNEGREEN, J. J.; RILEY, M. A. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 98-113, 1999.
- WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, p. 3-14, 2006.
- WILLEMS, A.; COLLINS, D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 43, p. 305-313, 1993.
- WINSHIP, P.R. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 3, p. 1266, 1989.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.
- YOUNG, J. M. et al. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 89–103, 2001.
- YOUNG, J. M. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 2107–2110, 2003.
- YOUNG, J. M. *Sinorhizobium* versus *Ensifer*. may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission? **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1711–1713, 2010.
- YOUNG, J. P. W., DOWNER, H. L., EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 2271 - 2277, 1991.

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

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

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

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHOS, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003.

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