



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GUILHERME NAPOLEÃO PERTINHEZ

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E GENÉTICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE
AMENDOINZEIRO (*Arachis hypogaea* L.) EM SOLOS
PARANAENSES**

Londrina
2013

GUILHERME NAPOLEÃO PERTINHEZ

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E GENÉTICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE
AMENDOINZEIRO (*Arachis hypogaea* L.) EM SOLOS
PARANAENSES**

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

Orientadora: Profa. Dra Mariangela Hungria
Co-orientadora: Profa. Dra Diva de Souza
Andrade

Londrina
2013

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P469c Pertinhez, Guilherme Napoleão.
Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias isoladas de
nódulos de amendoineiro (*Arachis Hypogaea* L.) em solos paranaenses /
Guilherme Napoleão Pertinhez. – Londrina, 2013.
52 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Mariangela Hungria.
Coorientador: Diva de Souza Andrade.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, 2013.
Inclui bibliografia.

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

CDU 631 461 5

GUILHERME NAPOLEÃO PERTINHEZ

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E GENÉTICA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE AMENDOINZEIRO
(*Arachis hypogaea* L.) EM SOLOS PARANAENSES**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Mariangela Hungria
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa Soja

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa Soja

Prof. Dr. Juscélio Donizete Cardoso
Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR

Londrina, 19 de abril de 2013

Aos

*Meus pais, Claudio e Vilma que foram
o começo de tudo, que me deram a
melhor educação, que deram o melhor
de si e que sempre me apoiaram em
minhas decisões, estando sempre
comigo.*

À

*Minha querida Larissa, esposa,
companheira, pelo carinho, amor,
incentivo e compreensão em todos os
momentos.*

Aos

*Meus irmãos, Claudio e Felipe, sempre
presentes em minha vida (mesmo a
distância).*

À

*Minha querida avó Zilda, por todas as
orações e por todo amor.*

À

Toda minha família e amigos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Pai Celestial, por iluminar meus caminhos desde o início de minha vida e por me dar forças e propiciar a oportunidade de concluir mais uma importante etapa de minha vida.

À Dra. Diva S. Andrade pela grande oportunidade de realizar este trabalho de mestrado, quando aceitou me orientar, por todo o incentivo, paciência e compreensão.

À Dra Mariangela Hungria, pela orientação neste trabalho.

Ao Dr. Jusélio D. Cardoso, por todo o apoio e auxílio na realização dos trabalhos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Programa de Pós - Graduação em Microbiologia pela oportunidade.

Ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina e todos os professores e funcionários.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná, IAPAR, pela estrutura cedida.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia dos Solos do IAPAR pelo auxílio durante a realização dos trabalhos.

Agradeço ao Prof. Dr. Leopoldo Sussumo Matsumoto, pela primeira orientação ainda durante a graduação, por todo o apoio, pela confiança e amizade.

À todos que me auxiliaram durante esse período, mesmo que indiretamente ou espiritualmente, meu MUITO OBRIGADO!

“Se trabalharmos sobre o mármore, um dia ele acabará. Se trabalharmos sobre o metal, um dia o tempo o consumirá. Se erguermos templos, um dia se tornarão pó. Mas se trabalharmos sobre almas jovens e imortais, se nós as imbuirmos com os princípios do justo temor ao Criador e amor à humanidade, daqui a cem anos pouco importará o quanto tenhamos acumulado no banco; que tipo de casa, palacete ou carro possuímos. Mas o mundo poderá ser diferente, talvez porque fomos importantes na vida dos jovens.”

Frank Sherman Land

PERTINHEZ, Guilherme Napoleão. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias isoladas de nódulos de amendoimzeiro (*Arachis hypogaea* L.) em solos Paranaenses.** 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar 44 estirpes bacterianas de amendoimzeiro (*Arachis hypogaea* L.) quanto a características morfofisiológicas e moleculares, com ênfase no sequenciamento do gene 16S rRNA e perfis de BOX-A1R, para inferir as relações filogenéticas e a posição taxonômica dessas estirpes. Na caracterização morfofisiológica, 75% das estirpes apresentaram taxa de crescimento rápido em meio de cultura com manitol como fonte de carbono (tempo de crescimento inferior a 3 dias); 25 acidificaram o meio, cinco alcalinizaram e 14 não resultaram em modificação do pH. No dendograma de similaridade genética, obtido da análise do BOX-A1R com 39 estirpes IPR-*Ah* e a estirpe SEMIA 6144 de *Bradyrhizobium* sp., autorizada para a produção de inoculantes comerciais para o amendoimzeiro no Brasil, observou-se a formação de dois grupos. O grupo I foi composto por nove estirpes, compreendendo um único agrupamento com 100% de similaridade e o grupo II foi subdividido em dois subgrupos, IIA (quatro estirpes) e IIB (27 estirpes IPR-*Ah* e a SEMIA 6144). O histórico de origem das estirpes não influenciou os agrupamentos formados pela análise do BOX – A1R, com exceção do grupo I, com 89% das estirpes isoladas de nódulos de plantas provenientes de um experimento com amendoimzeiro no município de Ponta Grossa. Com base no resultado do sequenciamento do gene 16S rRNA foi observada a formação de três principais grupos, correspondentes a três filos: Alfabroteobacteria, Betaproteobacteria e Firmicutes. O gênero com maior ocorrência foi o *Bacillus*. A caracterização dessas estirpes é de grande interesse, uma vez que pode fornecer mais informações sobre o tema filogenia de microrganismos simbióticos nativos em solos paranaenses.

Palavras-chave: Amendoimzeiro. Fixação biológica de nitrogênio. Rizóbios. BOX – A1R. Gene 16S rRNA.

PERTINHEZ, Guilherme Napoleão. **Morphophysiological and genetic characterization of bacteria isolated from peanut root nodules (*Arachis hypogaea* L.) in soils of the state of Paraná, Brazil.** 2013. 52 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate molecular and morphophysiological characteristics, with an emphasis on the sequencing of the 16S rRNA and BOX-A1R profiles of 44 symbiotic strains from peanut (*Arachis hypogaea* L.), inferring phylogenetic relationships and taxonomic position of these strains. In the morphophysiological characterization 75% of the strains showed fast growth rate (less than 3 days); 25 acidified the medium, five alkalized and 14 resulted in no change in pH. In the dendrogram of genetic similarity with 39 strains, and the commercial strain, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, submitted to the BOX-A1R, we observed the formation of two groups. Group I consisted of nine strains, with only one cluster with 100% similarity, while group II was subdivided into two subgroups, IIA (four strains) and IIB (27 strains and SEMIA 6144). The analysis of BOX - A1R showed that the origin of the strains did not influence the groupings, except in group I, with 89% of the strains isolated from nodules of plants grown in a soil with a history of cultivation of peanut in the Ponta Grossa municipality. Based on the 16S rRNA gene sequencing, there was formation of three major groups corresponding to three phyla: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria and Firmicutes. The genus with highest frequency was *Bacillus*. The characterization of these strains is of great interest, and can provide more information about the phylogeny of symbiotic microorganisms native from soils of the State of Paraná, Brazil.

Key words: Peanut. Biological nitrogen fixation. Rhizobia. BOX – A1R. 16S rRNA gene.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	AMENDOINZEIRO (ARACHIS HYPOGAEA L.).....	11
2.2	O GRUPO RIZÓBIO	13
2.3	A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	16
2.4	A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CULTURA DO AMENDOINZEIRO	18
3	OBJETIVO	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	ESTIRPES	21
4.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA.....	23
4.3	ANÁLISES MOLECULARES	25
4.3.1	Extração do DNA Genômico Total.....	25
4.3.2	Amplificação do DNA para o Gene 16S Ribossomal.....	26
4.3.3	Amplificação do DNA com Oligonucleotídeo Específico BOX	26
4.3.4	Sequenciamento do Gene 16S rRNA	27
4.3.5	Análise dos Fragmentos do BOX-PCR e das Sequências	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

O amendoineiro (*Arachis hypogaea* L.) é uma planta originária da América do Sul e ocorre em regiões tropicais e subtropicais, mas foi introduzido em muitas outras áreas do mundo; é amplamente cultivado em mais de 80 países da Ásia, África, América do Norte e do Sul (SANTOS; GODOY; FAVERO, 2005). É uma leguminosa com altos valores nutricionais, sendo muito utilizada na alimentação humana e animal, mas também pode ser adicionada ao solo como adubo verde.

A cultura do amendoineiro requer grandes quantidades de nitrogênio para seu desenvolvimento vegetativo e reprodutivo.

Um dos mais importantes processos conhecidos na natureza e realizados apenas por alguns microrganismos procariotos é o da fixação biológica de nitrogênio (FBN). A primeira publicação sobre a capacidade das bactérias realizarem a FBN e o produto deste processo ser absorvido pelas plantas foi descrita em 1886, descrevendo bactérias que hoje são conhecidas coletivamente como rizóbios.

Os rizóbios são bactérias Gram negativas, aeróbicas não esporulantes, pertencentes ao Filo Alfaproteobacteria (ZAKHIA; LAJUDIE, 2001). São considerados como o principal grupo de microrganismos diazotróficos, por sua importância agrônômica.

Estudos com o objetivo de realizar o levantamento, isolamento e seleção de rizóbios com características de interesse agrônômico, têm revelado um alto grau de diversidade nas populações de rizóbio do solo, principalmente nas regiões tropicais.

Atualmente existem, descritos na literatura, 17 gêneros e 118 espécies de rizóbios (PONGSLIP, 2012). Dentre os principais gêneros estão *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium* classificados através da análise do gene 16S rRNA (GARRITY et al., 2007).

Ao contrário do que se acreditava, tem sido constatado certo grau de especificidade das espécies de leguminosas tropicais e os rizóbios do grupo tropical (THIES; BOHLOOL; SINGLETON, 1991). No caso do amendoineiro, a especificidade ocorre até mesmo entre cultivares (SANTOS, 2001; CHEN et al., 2003a; TAJIMA; MORITA; ABE, 2006), evidenciando a importância de se considerar tanto a estirpe de rizóbio quanto a cultivar de amendoineiro a serem utilizadas nos programas que visem à otimização da FBN.

Para que a FBN traga maiores benefícios, torna-se necessária a identificação de estirpes mais competitivas, mais estáveis geneticamente e com maior eficiência de FBN. No processo de seleção de estirpes de rizóbio eficientes na FBN, a caracterização fenotípica é uma etapa essencial e envolve diversas avaliações morfológicas e fisiológicas. A caracterização genotípica, principalmente o sequenciamento de DNA, também é amplamente utilizada.

Este trabalho tem como objetivo avaliar características morfológicas, fisiológicas e genéticas de bactérias isoladas de amendoinzeiro que foram cultivados em casa de vegetação, em solos obtidos de diversas localidades do Paraná, e cultivados a campo, inferindo as relações filogenéticas entre essas bactérias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AMENDOINZEIRO (*ARACHIS HYPOGAEA* L.)

O amendoineiro (*Arachis hypogaea* L.) integra o gênero *Arachis* (família Fabaceae, subfamília Papilionaceae) que engloba mais de 70 espécies (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; SANTOS; GODOY; FAVERO, 2005).

É amplamente cultivado em mais de 80 países da Ásia, África, América do Norte e do Sul. É originário da América do Sul e ocorre em regiões tropicais e subtropicais, mas foi introduzido em muitas outras áreas do mundo (SANTOS, 2001).

É uma leguminosa com altos valores nutricionais, sendo muito utilizada na alimentação humana e animal, mas também pode ser adicionada ao solo como adubo verde. O principal produto econômico do amendoineiro é o grão (amendoim), rico em óleo, proteínas e em especial as vitaminas do complexo B.

O amendoim pode ser destinado para consumo como alimento “*in natura*” ou industrializado, sendo utilizado na fabricação de produtos alimentícios no ramo de conservas, confeitaria, enlatados e, quando o óleo é refinado com alto grau de pureza, é usado para fins farmacêuticos, como veículo de emulsão de produtos injetáveis (GODOY et al., 1985; MARTIN, 1985).

Representa uma das principais oleaginosas cultivadas no Brasil e no mundo, sendo considerada uma das mais importantes culturas entre as leguminosas, junto com o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (HENRIQUES NETO et al., 1998).

Na América do Sul, o amendoineiro apresenta um importante papel econômico, por fornecer vários produtos alimentícios e óleo vegetal. No Brasil, o produto do amendoim mais importante para a exportação é o óleo usado na alimentação e na indústria.

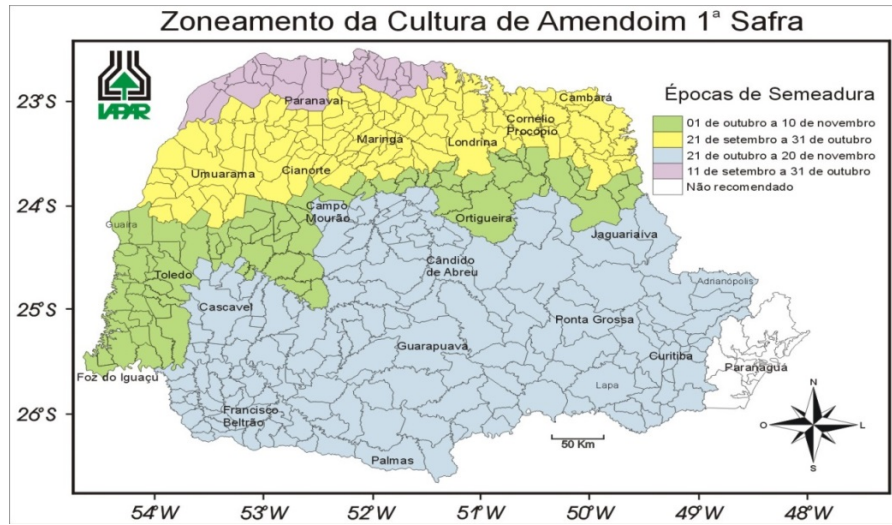
Segundo dados da CONAB, o amendoineiro é cultivado de forma mais significativa em dez estados brasileiros. O maior produtor é São Paulo com 89% da produção nacional (283,8 mil toneladas), seguido por Minas Gerais com 3,0% (9,3 mil toneladas) e o Paraná com 2,2% (6,9 mil toneladas). A produção brasileira de amendoim é composta por duas safras semeadas em épocas diferentes, conforme a

região de cultivo. A primeira safra é semeada nas regiões Sul e Sudeste e a segunda safra, além das regiões Sul e Sudeste, abrange as regiões Norte (Tocantins), Nordeste e Centro-Oeste. A área total cultivada na safra 2012/13 foi de aproximadamente 96,1 mil ha, com 79,3 mil ha (82,5%) cultivados em São Paulo e 2,5 mil ha no Paraná (2,6%). A produtividade média da produção nacional de amendoim está em torno de 3.280 kg/ha. A melhor média é do estado de Minas Gerais com 3.570 kg/ha, em sequência São Paulo, com 3.543 kg/ha e Tocantins, com 3.000 kg/ha. No Paraná a produtividade média fica em torno de 2.750 kg/ha. A produção nacional de amendoim na safra 2012/13 foi de, aproximadamente, 315,2 mil toneladas, 7% superior à da safra anterior (2011/2012). Desse montante, 6,9 mil toneladas são provenientes do Estado do Paraná (CONAB).

No Estado do Paraná, o Instituto Agrônomo do Paraná propôs no ano de 2007, o Zoneamento Agrícola de Risco Climático, um instrumento de política agrícola e gestão de riscos na agricultura. O estudo é elaborado com o objetivo de minimizar os riscos relacionados aos fenômenos climáticos e permite, a cada município, identificar a melhor época de plantio das culturas, nos diferentes tipos de solo e ciclos de cultivares. A técnica é de fácil entendimento e adoção pelos produtores rurais, agentes financeiros e demais usuários. São analisados os parâmetros de clima, solo e de ciclos de cultivares, a partir de uma metodologia previamente validada. Dessa forma são quantificados os riscos climáticos envolvidos na condução das lavouras que podem ocasionar perdas na produção.

Os mapas com o zoneamento agrícola da cultura do amendoimzeiro da 1ª e 2ª safra para o Estado do Paraná podem ser observados nas figuras 1 e 2.

Figura 1 – Zoneamento da 1ª safra da cultura do amendoim para o Estado do Paraná.



Fonte: Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, www.iapar.br, consulta em 1 de abril de 2013.

Figura 2 – Zoneamento da 2ª safra da cultura do amendoim para o Estado do Paraná.



Fonte: Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, www.iapar.br, consulta em 1 de abril de 2013.

2.2 O GRUPO RIZÓBIO

Um dos mais importantes processos conhecidos na natureza e realizado apenas por microrganismos procaríotos é o da fixação biológica de nitrogênio (FBN). A primeira publicação sobre a capacidade das bactérias realizarem a FBN e o produto deste processo ser absorvido pelas plantas foi descrita em 1886, sendo a

primeira bactéria fixadora de nitrogênio atmosférico, também conhecida como diazotrófica, descrita em 1893 (FRED; BALDWIN; MCCOY, 1932). Desde o princípio essa descoberta gerou grande impacto e vasta literatura sobre o tema, sendo até hoje os rizóbios as bactérias fixadoras de nitrogênio mais estudadas.

Vários membros da Família Leguminosae são de considerável importância ecológica, devido, em parte, à habilidade destes estabelecerem simbiose com bactérias das ordens *Rhizobiales* e *Burkholderiales*, formando estruturas hipertróficas nas raízes e, excepcionalmente, no caule, denominadas nódulos, fonte mais importante de nitrogênio fixado biologicamente em sistemas agrícolas (CHEN et al., 2003b; GRAHAM; VANCE, 2003; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Estudos com o objetivo de realizar o levantamento, isolamento e seleção de rizóbios com características de interesse agrônômico têm revelado um alto grau de diversidade nas populações de rizóbio do solo, principalmente nas regiões tropicais.

A classificação de rizóbios está se tornando cada vez mais complexa e é revista periodicamente, devido a novas descobertas que propõem novos gêneros e espécies. Até o presente momento, os rizóbios são distribuídos em 17 gêneros e 118 espécies. A diversidade de rizóbios foi revelada por diversas metodologias, fornecendo informações valiosas sobre os genótipos de bactérias que são bem adaptados a um determinado ambiente (PONGSLIP, 2012).

O agrupamento dos rizóbios foi inicialmente baseado em características fenotípicas, principalmente na habilidade de nodular algumas leguminosas, dando origem ao conceito de “grupos de inoculação cruzada”. A taxonomia dos rizóbios, baseada na especificidade hospedeira foi sendo substituída pela taxonomia numérica, que se apoia nas características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (HUNGRIA; VARGAS; ARAUJO, 1997).

Até recentemente aceitava-se, que leguminosas (e não leguminosas do gênero *Parasponia*) eram noduladas exclusivamente por membros da família Rhizobiaceae (alfaproteobacterias), que inclui os gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (SPRENT; HIRSCH, 2002). Porém, ao longo dos últimos anos, várias outras espécies de alfaproteobacterias demonstram, também, a capacidade de nodular leguminosas (MOULIN et al., 2002). Incluindo estirpes de *Methylobacterium* que nodulam *Crotalaria* e *Lotononis* (SY et al., 2001; JAFTHA; STRIJDOM; STEYN, 2002),

Blastobacter denitrificans, que nodulam *Aeschynomene indica* (VAN BERKUM; EARDLY, 2002), e *Devosia*, que nodulam *Neptunia natans* (RIVAS et al., 2002). De maneira ainda não muito clara, alguns membros de betaproteobactéria, como *Burkholderia* spp., isolada originalmente de *Aspalathus carnosa* e *Machaerium lunatum* (MOULIN et al., 2001) e *Ralstonia taiwanensis*, isolada de *Mimosa pudica*, (CHEN et al., 2001), foram encontradas em nódulos de leguminosas tropicais.

A classificação taxonômica das estirpes de rizóbio tem sido reestruturada desde 2001, com a reclassificação de algumas espécies a betaproteobacterias, especialmente espécies de *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001). *Burkholderia* são simbiontes eficazes em muitas espécies vegetais (CHEN et al., 2003b; BARRETT; PARKER, 2005; CHEN et al., 2005; BARRETT; PARKER, 2006). Embora seja importante ressaltar que alguns são importantes patógenos para humanos e animais (por exemplo, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, e *Burkholderia mallei*), os estudos mostram que as espécies simbióticas são filogeneticamente distantes destes patógenos (BONTEMPS et al., 2010).

Vários isolados têm sido relatados em nódulos de leguminosas, capazes de realizar a FBN, mas filogeneticamente localizados fora dos grupos tradicionais de rizóbios (alfaproteobacteria). Estas novas linhas que contêm simbiontes fixadoras de nitrogênio de leguminosas incluem *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, e *Phyllobacterium* em alfaproteobacteria e *Cupriavidus*, *Burkholderia*, e *Ralstonia*, em betaproteobacterias. Todas estas bactérias capazes de nodular são filogeneticamente distintas dos rizóbios (com base em sequências de 16S rDNA), mas carregam genes *Nod* semelhantes aos de rizóbios. Estes genes codificam para fatores *Nod*, moléculas sinais na comunicação bactéria - leguminosa que induz a nodulação (WILLEMS, 2006). Os rizóbios são encontrados em praticamente todos os ecossistemas – podem ser encontrados como saprófagos no solo, na água doce, vivem como rizobactérias na rizosfera de leguminosas e outras plantas e em simbiose na forma de bacteroides, em geral com leguminosas (BREWIN, 1998; SADOWSKY; GRAHAM, 1998). Um grande número de isolados, filogeneticamente não classificados como alfaproteobacteria, tem sido observado como sendo capaz de nodular e fixar nitrogênio com leguminosas. Esse grupo possui os genes de nodulação que foram, provavelmente, obtidos por meio de transferência lateral (SY et al., 2001; MOULIN et al., 2002).

2.3 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um nutriente essencial e limitante ao desenvolvimento das plantas, principalmente nos solos poucos férteis em regiões tropicais. Na forma gasosa, é o elemento mais abundante na atmosfera (em torno de 78%) e nas plantas, o quarto elemento mais abundante, sendo superado apenas pelo carbono, oxigênio e hidrogênio. Participa de diversos processos biológicos, como a síntese de aminoácidos, ácidos nucleicos (DNA e RNA), proteínas e enzimas, sendo responsável pelo metabolismo, crescimento e desenvolvimento de células e tecidos vegetais (HUNGRIA; VARGAS, 2000; HUNGRIA; CAMPO, 2005). É, portanto, um nutriente requerido em grandes quantidades pelas culturas, sendo comum ocorrer deficiência na maioria dos sistemas agrícolas (SMITHSON; GILLER, 2002).

Na atmosfera a molécula de nitrogênio (N_2) é constituída por dois átomos que se encontram unidos de forma muito estável impedindo, assim, sua absorção e assimilação por organismos eucariontes. Apenas algumas bactérias desenvolveram um complexo enzimático denominado nitrogenase, necessário para reduzir o N_2 a amônia (NH_3), que rapidamente é convertida a amônio (NH_4^+) (NEVES; RUMJANEK, 1998).

A FBN constitui a principal via de incorporação do N_2 à biosfera, perfazendo cerca de 65% do total, ou 96% da fixação por processos naturais e é considerada, após a fotossíntese, como o processo biológico mais importante, sendo fundamental para a vida na Terra (HUNGRIA et al., 2005). Apresenta um elevado potencial para a agricultura brasileira, diminuindo a utilização de fertilizantes nitrogenados, de alto custo e muito poluentes (CERETTA et al., 1994), além de contribuir com a fertilidade natural dos solos e, conseqüentemente, para a produção dos sistemas agrícolas, também oferecendo condições para o suprimento natural, equilibrado e sustentável de nitrogênio (DÖBEREINER; PAULA; MONTEIRO, 1990; HUNGRIA; VARGAS, 2000; RUMJANEK et al., 2005).

A formação dos nódulos é um processo complexo, compreendendo várias etapas e envolve mudanças morfofisiológicas, tanto na célula hospedeira, como na bactéria. As mudanças na bactéria visam o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira para prover o ATP e poder redutor necessários para o processo da FBN, enquanto que as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia

produzida pela bactéria (HUNGRIA; CAMPO, 2005). O complexo nitrogenase, formado por duas unidades proteicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (Mo-Fe-proteína), é responsável pela fixação de nitrogênio no nódulo (MYLONA; PAWLOWSKI; BISSELING, 1995; BURRIS, 1999; TAIZ; ZIEGER, 2004).

A FBN simbiótica inicia com a comunicação entre os dois organismos, mediada pela troca de sinais moleculares específicos. Antes do estabelecimento da simbiose, o rizóbio é quimiotaticamente atraído para a rizosfera por compostos (aminoácidos, AIA ou açúcares) liberados pela planta (MUNOZ AGUILAR et al., 1988; KAPE; PARNISKE; WERNER, 1991). A partir desse momento, ocorre uma interação química entre o rizóbio e a planta hospedeira, mediada pela produção de compostos fenólicos, a maioria flavonoides, nas sementes e raízes e a resposta com produção de fatores de nodulação, conhecidos como fatores Nod, pelas bactérias (HUNGRIA, 1994).

Estas associações sofreram especializações ao longo do processo evolutivo, resultando em relações muito estreitas entre a planta e a bactéria, com a formação de estruturas especializadas (nódulos), que garantem proteção contra fatores adversos do solo, além de poder se beneficiar de compostos de carbono produzidos pela planta hospedeira (SPRENT; FARIA, 1988). Sabe-se que a nodulação é uma condição necessária, mas não suficiente para que haja fixação de N_2 (CLEVELAND et al., 1999), pois diversos fatores biológicos, químicos e físicos podem influenciar a FBN (FREIRE, 1984; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Assim, a ausência de nodulação ou nodulação ineficiente em determinadas espécies sob determinadas condições edáficas e ambientais é decorrente de fatores limitantes ao estabelecimento, desenvolvimento e funcionamento da simbiose (FREIRE, 1984).

Uma simbiose eficiente, na qual a necessidade da planta por nitrogênio seja totalmente suprida pela FBN, é o alvo de muitas pesquisas que são desenvolvidas no mundo, principalmente nos trópicos (FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Por outro lado, a FBN eficiente depende de diversos fatores, como temperatura, umidade, características químicas e físicas do solo (associação entre partículas minerais como areia, argila e silte, matéria orgânica, concentração de oxigênio, nutrientes, pH) as quais influenciam tanto a planta hospedeira, quanto a bactéria. Outro importante fator no processo de FBN reside na compatibilidade entre a planta hospedeira e o rizóbio, que dependendo

das condições do ambiente, permitirá ou não que o processo se estabeleça de maneira que ambos os organismos sejam favorecidos (HERRIDGE; ROSE, 2000).

2.4 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CULTURA DO AMENDOINZEIRO

O amendoim é uma planta que, ao contrário da maioria de outras leguminosas, pode sustentar a fixação de nitrogênio em condições com baixo suprimento de fotossintatos ou longos períodos no escuro. Essa característica é atribuída à presença de corpos lipídicos localizados juntos à membrana peribacteroide (SIDDIQUE; BAL, 1991).

Em geral não se recomenda a aplicação de fertilizante nitrogenado na maioria dos sistemas de cultivo do amendoim, devido a este adquirir N em quantidades adequadas para suprir suas necessidades através do processo de FBN (THIES; BOHLOOL; SINGLETON, 1991), embora esforços tenham sido realizados no sentido de encontrar estirpes eficientes para a cultura (SANTOS et al., 2005; BORGES; XAVIER; RUMJANEK, 2007).

Nessa cultura, o processo de nodulação ocorre de maneira diferente quando comparado com a maioria das leguminosas. Os rizóbios penetram nas axilas das raízes laterais e invadem as células corticais através dos espaços intercelulares não havendo a formação de cordão de infecção (CHANDLER, 1978; CHANDLER; DATE; ROUGHLEY, 1982; BOOGERD; VAN ROSSUM, 1997).

Os rizóbios que nodulam o amendoim pertencem ao grupo *Bradyrhizobium* spp., classificado como grupo miscelânea caupi ou, ainda, como grupo de rizóbio tropical (MARTINS et al., 1997). Alta diversidade e heterogeneidade genética têm sido observadas nas estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam o amendoim (SALEENA et al., 2001; CHEN et al., 2003a; YANG et al., 2005; TAURIAN et al., 2006). Ao contrário do que se acreditava, tem-se constatado certo grau de especificidade das espécies de leguminosas tropicais e dos rizóbios do grupo tropical. A nodulação de diferentes espécies de leguminosas em solos tropicais é mais influenciada pelo hospedeiro que pelos rizóbios existentes nesses solos (BURTON, 1979; THIES; BOHLOOL; SINGLETON, 1991; RUMJANEK et al., 2005; XAVIER et al., 2006). Atualmente, uma estirpe de *Bradyrhizobium*, SEMIA 6144 é recomendada para a inoculação desta leguminosa.

Embora isolados de rizóbios de crescimento rápido e reação ácida em meio YM (Yeast Manitol, contendo manitol como fonte de carbono) tenham sido relatados como predominantes na nodulação do amendoineiro (HUANG; HE; CHEN, 1990; CHEN et al., 2003a), a simbiose ocorre predominantemente com as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, caracterizadas pelo crescimento lento e reação alcalina em meio YM. Essas bactérias são frequentemente encontradas nos estudos de caracterização de populações nativas de rizóbios associados ao amendoineiro (VINCENT, 1970; URTZ; ELKAN, 1996; CHEN et al., 2003a; YANG et al., 2005).

Nas regiões tropicais é comum encontrar simbioses não eficazes, pois há uma grande variação na especificidade e na capacidade das leguminosas em se associar com os rizóbios (SPRENT, 2003). No nódulo a bactéria pode atuar como essencialmente parasita à altamente efetiva no fornecimento da amônia para a planta (BURDON et al., 1999). Vários fatores determinam a eficiência da simbiose, como por exemplo, a morfologia e a estrutura dos nódulos os quais, por sua vez, são determinados pelo hospedeiro, e pelas características genotípicas e fenotípicas das bactérias simbióticas (SPRENT; JAMES, 2007). No caso do amendoineiro, a diferença ocorre até mesmo entre cultivares (SANTOS, 2001; CHEN et al., 2003a; TAJIMA; MORITA; ABE, 2006), evidenciando a importância de se considerar tanto a estirpe de rizóbio quanto a cultivar de amendoim a ser utilizada nos programas que visem a otimização da FBN.

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o de utilizar análises morfofisiológicas e moleculares, com ênfase no sequenciamento do gene 16S rRNA e nos perfis de BOX-A1R para caracterizar, inferir as relações filogenéticas e a posição taxonômica de 44 estirpes bacterianas isoladas de nódulos de plantas de amendoimzeiro, do campo ou cultivadas em vasos com amostra de solos do Estado do Paraná.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESTIRPES

As 44 estirpes (IPR-*Ah*) utilizadas neste trabalho foram obtidas em coletas e experimentos realizados anteriormente e foram conduzidos de duas formas distintas.

O primeiro grupo de estirpes foi obtido de plantas semeadas em amostras de solos de áreas sob cultivos de milho (*Zea mays* L.), soja [*Glycine max* (L.) Merr.], pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), pastagem e solos de mata, de 32 municípios do Estado do Paraná, na camada 0–10 cm de profundidade, de pontos georreferenciados próximos às Estações Agrometeorológicas do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e Instituto Tecnológico SIMEPAR. Uma amostra de solo de cada local foi acondicionada em vasos de 200mL e nestes plantados apenas um exemplar da cultivar IAC-Tatu de amendoimzeiro como planta isca. As sementes de amendoim foram previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio (comercial) a 3% e lavadas com água esterilizada por pelo menos sete vezes (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994).

Para realizar o isolamento das estirpes nativas de cada solo, um nódulo de cada raiz foi escolhido aleatoriamente, retirado e imerso em álcool a 70% por 30 segundos para quebrar a tensão superficial e remover bolhas de ar do tecido. Em seguida, foram transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio (comercial) a 3% por 3 minutos para a desinfestação superficial e lavados seis vezes em água destilada e esterilizada. Após a última lavagem, o nódulo foi macerado em água destilada com uma pinça estéril e transferido com auxílio de alça de platina, para placas contendo meio YMA, com o intuito de obtenção de colônias isoladas (VINCENT, 1970). Após sete dias de incubação a 28°C, as bactérias foram transferidas para uma nova placa a fim de obter colônias puras. Posteriormente as estirpes foram preservadas através da liofilização, em ampolas contendo culturas de bactérias secas a vácuo, seladas e mantidas à temperatura ambiente. As estirpes fazem parte da Coleção de Microrganismos de Interesse do Agronegócio do Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) Londrina.

O segundo grupo de estirpes foi obtido de um experimento conduzido na Estação Experimental do IAPAR, no município de Ponta Grossa-PR, onde foi semeada a cultivar IAC-Tatu de amendoineiro, a campo. As plantas foram coletadas e levadas ao Laboratório de Microbiologia dos Solos do IAPAR em Londrina-PR, onde foram coletados nódulos de maneira aleatória e realizado o isolamento e preservação das bactérias, conforme descrito para o primeiro grupo de estirpes.

O presente trabalho iniciou com a autenticação dos isolados obtidos. Estes foram autenticados em amendoim, cultivar IAC-Tatu, em vasos Leonard com areia e vermiculita contendo solução nutritiva sem N mineral, esterilizados (HUNGRIA; ARAUJO, 1994). A estirpe de *Bradyrhizobium* sp, SEMIA 6144, autorizada para produção de inoculantes comerciais para o amendoineiro no Brasil, foi incluída como controle, gentilmente cedida pela Coleção de Cultura do laboratório da FEPAGRO, RS. Todas as análises foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia do Solo e em casas de vegetação do IAPAR, em Londrina, PR.

De um total de 77 estirpes autenticadas, 44 apresentaram a capacidade de formação de nódulos e foram caracterizadas neste trabalho, conforme tabela 1.

Tabela 1 – Município da coleta do solo, histórico de cultivo da área, código IPR-Ah das estirpes isoladas de nódulos de amendoineiro utilizadas neste estudo e avaliação dos nódulos após experimento de autenticação das estirpes.

Município	Cultura na coleta do solo	IPR-Ah	Isolados de Plantas do Campo	Isolados de Plantas Iscas em C.V.
Londrina	Milho	4628		X
Bandeirantes	Milho	4630		X
Irati	Milho	4642, 4651		X
Ponta Grossa	Milho	4648		X
Nova Cantu	Milho	4649		X
Jaguariaiva	Milho	4653		X
Joaquim Távora	Milho	4631		X
Paranavaí	Milho	4636		X
Umuarama	Pastagem	4635		X
Joaquim Távora	Floresta	4637, 4638		X
Planalto	Floresta	4641		X
Diamante Norte	Floresta	4644		X
Candido Abreu	Floresta	4646		X
Ponta Grossa	Floresta	4647		X
Ponta Grossa	Amendoim	4677, 4678, 4682, 4693, 4696, 4705, 4706, 4707, 4708, 4710, 4711, 4718, 4723, 4729, 4737, 4739, 4740, 4741, 4743, 4757, 4758, 4826, 4829, 4834, 4839, 4841, 4850, 4855	X	
Rhodesia 411*	<i>Arachis</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA6144**	-	-

*Instrução Normativa Nº 13, De 24 de Março de 2011. **Codificação FEPAGRO. *** As 44 estirpes utilizadas neste estudo apresentaram formação de nódulos com coloração interna avermelhada, no experimento de autenticação em amendoineiro (*Arachis hypogaea* L.).

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA

Tempo de crescimento e morfologia das colônias - As colônias foram caracterizadas quanto ao tempo de crescimento (três ou sete dias), tamanho (maior ou menor que 2 mm), forma (circular ou não circular), elevação (convexa ou plana), bordas (lisas ou onduladas), estrutura (lisa ou granulosa), brilho (transparente ou opaca), textura (viscosa ou não viscosa), absorção de corante vermelho congo (25 g L⁻¹) (absorve ou não o corante do meio de cultivo) e produção de exopolissacarídeos (produz ou não produz). O crescimento das colônias foi avaliado em placas contendo meio de cultura solidificado, seguindo as metodologias descritas (VINCENT, 1970; ARAUJO, 1994).

Reação ácida/alcalina *in vitro* - As estirpes foram inoculadas em meio de cultura YMA contendo manitol como fonte de carbono, com adição de 10 mL L⁻¹ de azul de bromotimol (25 g L⁻¹), meio inicialmente com coloração verde e pH neutro. Após sete dias a 28°C, a alteração ou não da coloração do meio de cultura foi observada, sendo: coloração azul, alcalinização; coloração amarela, acidificação e a não alteração da cor do meio de cultura (verde), considerado como pH neutro (ARAUJO, 1994). Placas de Petri contendo meio de azul de bromotimol sem inoculação foram incubadas como controles da cor do meio.

Produção de melanina - As estirpes foram repicadas em meio de cultura contendo (g L⁻¹): triptona (5,0); extrato de levedura (3,0); cloreto de cálcio (1,3); ágar (14,0) e suplementado com L-tirosina (0,0012) e 40 µg de sulfato de cobre, com pH ajustado para 6,8. Após crescimento por sete dias a 28°C no escuro, adicionou-se SDS 10% (peso/volume) sobre as colônias para que a parede celular fosse quebrada. Após 6 h em temperatura ambiente (25 °C) a alteração de coloração das colônias foi analisada sendo consideradas produtoras de melanina aquelas que desenvolveram coloração enegrecida (CUBO et al., 1997).

Produção de sideróforos - avaliada pelo cultivo das estirpes em meio de cultura deficiente em ferro, meio King B (KING; WARD; RANNEY, 1954), e o complexo CAS (Chrome Azurol S) (SCHWYNN; NEILANDS, 1987). A produção de sideróforos foi considerada positiva para aquelas estirpes que converteram a cor azul da solução indicadora de CAS para amarelo-avermelhado, denominado cor ocre. Isso ocorre devido a imobilização do Ferro no complexo CAS + Fe⁺³ + brometo de hexadeciltrimetilamônio.

Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio - utilizado o meio de cultura GL, contendo 10 g de glucose, 2 g de extrato de levedura e 15 g de ágar. A este meio foram adicionadas uma solução contendo 0,25 g L⁻¹ de K₂HPO₄ e outra contendo 1 g L⁻¹ de CaCl₂, ajustando-se o pH para 6,5, com o intuito de se formar fosfato de cálcio precipitado (HARA; OLIVEIRA, 2004). A habilidade de solubilizar o fosfato de cálcio foi identificada pela presença ou ausência de um halo transparente ao redor da colônia.

Para cada característica morfofisiológica das 44 estirpes estudadas (IPR-Ah Coleção IAPAR) e da estirpe recomendada de *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA 6144) autorizada para inoculantes comerciais, foi atribuído valor 1 (presente) ou 0

(ausente). Com base nesses dados foi construída uma matriz binária dos dados originais com as características morfo-fisiológicas e suas variações. A análise de agrupamento de similaridade e as diferenças foram estimadas pela distância euclidiana com a opção UPGMA (*Unweighted Pair Proup Method with Aritmetic Mean*) com o programa NTSYS-pc. As estirpes foram agrupadas e representadas graficamente por um dendograma (ROHLF, 1994).

4.3 ANÁLISES MOLECULARES

4.3.1 Extração do DNA Genômico Total

O DNA total foi extraído a partir do cultivo das bactérias em meio YM líquido até a fase exponencial (aproximadamente 10^9 células mL^{-1}). As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos e lavadas por três vezes com solução salina (NaCl 0,85%). Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 400 μL de TE 50/20 (Tris a 50 mM, pH 8,0; 10 mM de NaCl e 10 mM de EDTA pH 8,0). Após a adição de 50 μL de SDS a 10% (10 g de lauril sulfato de sódio em 100 mL de água), 5 μL de proteinase K (20 mg mL^{-1} de água, mantida a -18°C), 10 μL de lisozima (5 mg mL^{-1} de água mantida a -18°C), 1 μL de RNase (10 mg mL^{-1}) preparada em tampão com 10 mM de Tris HCl pH 7.5 e 15 mM de NaCl, as amostras foram incubadas por 1 h a 37°C . Após esse período, as amostras foram homogeneizadas por pipetagem, movimentando para dentro e para fora por três vezes, para reduzir a viscosidade. Foram adicionadas soluções de NaCl 5 M para uma concentração final de 250 mM e acetato de sódio 3 M para uma concentração final de 300 mM. As amostras foram homogeneizadas e permaneceram em repouso por 1 h a 4°C . Depois, as amostras, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos, recolhendo-se 300 μL do sobrenadante e adicionando-se 2 volumes de etanol absoluto gelado a 95%. As amostras foram incubadas por 24h a -20°C , ou por 15 min à -72°C e, depois, centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos e o etanol foi descartado. Adicionou-se, então, etanol gelado a 70% para lavar o DNA precipitado, retirando o excesso de sais. As amostras foram novamente centrifugadas, e após secagem em temperatura ambiente, os precipitados foram ressuspensos em TE 10:1 (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0). As soluções de

NaCl, Tris-HCl, EDTA Na₂, SDS, AcONa e TE usadas para a extração do DNA foram previamente autoclavadas. As amostras de DNA foram aplicadas em gel de agarose a 0,9% [em tampão TBE 1X (10,8 mL de tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4,0 mL de EDTA, 0,5 M, pH 8,0)], durante 30 minutos a 90 V. Após a corrida, foi realizada a coloração com brometo de etídio (1 mg mL⁻¹ de estoque, 0,00005% de concentração final) durante 20 minutos e o gel visualizado em transluminador, confirmando a integridade do DNA extraído.

4.3.2 Amplificação do DNA para o Gene 16S Ribossomal

Uma alíquota do DNA extraído de cada estirpe foi submetida à amplificação com os *primers* fD1 (5' – A G A G T T T G A T C C T G G C T C A G – 3') e rD1 (5' – C T T A A G G A G G T G A T C C A G C C – 3') que codificam a região 16S rRNA (WEISBURG et al., 1991), uma região altamente conservada entre as eubactérias (LAGUERRE et al., 1996). Para a PCR foram utilizados 36,7 µL de água milli-Q estéril, 3 µL de dNTPs (1,5 mM de solução para cada um dos quatro nucleotídeos), 5 µL tampão 10X, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,5 µL de cada *primer* (10 pmol µL⁻¹), 1 µL de Taq polimerase (1,2 U) e 1 µL de DNA. As reações foram realizadas em termocicladores modelo MJ Research Inc. PTC- 100TM, Techne TC-412 ou Applied BioSystems Veriti™ 96-well Thermal Cycler com os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, 93 °C por 45 s, anelamento dos *primers* a 55 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min.; 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 5 min e mantidas a 4 °C.

Os produtos de PCR foram purificados com o uso do Kit, PureLink PCR Purification (Invitrogen) e, então, armazenados a -20°C.

4.3.3 Amplificação do DNA com Oligonucleotídeo Específico BOX

A partir dos extratos de DNA total dos isolados, realizou-se a amplificação de regiões repetitivas e conservadas do DNA, utilizando o *primer* BOX – A1R (5' - C T A C G G C A A G G C G A C G C T G A C G - 3') (AUSUBEL et al., 1994). Para tal reação, utilizaram-se 13,8 µL de água (mili Q esterilizada); 5 µL de DNTP's [1,25 mM de solução para cada um dos quatro nucleotídeos (C, G, T e A)]; 2,5 µL de tampão

10X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3); 1,5 μL de MgCl_2 50 mM; 1,0 μL do *primer* (50 pmol μL^{-1}); 0,5 μL de Taq DNA polimerase (5U μL^{-1}) e 20 ng de DNA (2 μL de amostra diluída), correspondendo a um volume final de 24 μL . O programa utilizado para o PCR-BOX consta de um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 7 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 53 °C por 1 min e extensão a 65 °C por 8 min; um ciclo final de extensão a 65 °C por 16 min; mantendo-se a 4 °C. Os fragmentos do produto da amplificação foram separados por peso molecular em um gel de agarose a 1,5%, 4 μL do padrão de peso molecular de 1kb (plus DNA LadderTM-Gibco- Life Technologies) foi adicionado ao gel de agarose para estimar o peso molecular das bandas obtidas. A eletroforese foi feita sob corrente elétrica de 100 Volts por 6 h. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados em transluminador com lâmpada ultravioleta.

4.3.4 Sequenciamento do Gene 16S rRNA

Para a obtenção da sequência completa do gene 16S rRNA, cinco reações foram realizadas utilizando os seguintes *primers*: fD1, Y2 (5' – C C C A C T G C T G C C T C C C T A G G A G T – 3') (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991) e os *primers* utilizados por Menna et al. (2006): 362f (5' – C T C C T A C G G G A G G C A G C A G T G G G G - 3'), 786f (5' – C G A A A G C G T G G G G A G C A A A C A G G – 3') e 1203f (5' – G A G G T G G G G A T G A C G T C A A G T C C T C - 3'). As temperaturas e condições de amplificação para o sequenciamento foram: desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 20 s, anelamento a 55 °C por 30 s, e extensão a 60 °C por 1 min; mantendo a temperatura final a 4 °C. As reações foram realizadas em microplacas (96-well-full-skirt-PCR), utilizando 1 μL do produto de PCR purificado, 1 μL de *dye* (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) e 1 μL de *primer* (3,2 μM), 5 μL água milli-Q estéril e 2 μL de tampão de sequenciamento (5X).

4.3.5 Análise dos Fragmentos do BOX-PCR e das Sequências

As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.9.0 (HALL, 1999). Para se obter uma

alta qualidade destas sequências, as mesmas foram agrupadas em *contigs*. Estas sequências foram submetidas ao banco de dados *GenBank* (NCBI) para verificar a similaridade com sequências de outros microrganismos. O alinhamento foi realizado pelo programa *CLUSTAL W* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).

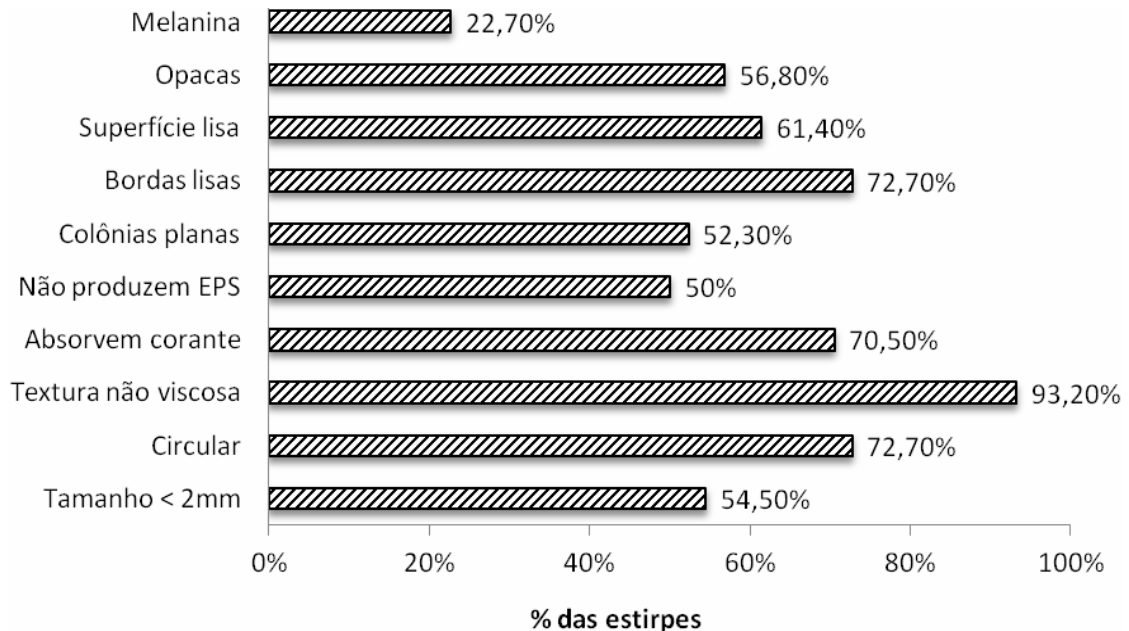
A árvore filogenética foi gerada pelo programa MEGA versão 5 (TAMURA et al., 2011) utilizando o método de análise *Neighbor Joining* (SAITOU; NEI, 1987).

Nesse estudo as bandas geradas pelos fragmentos de BOX-PCR foram analisadas pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.4.6) e, para a análise de agrupamento, foi utilizado o algoritmo UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973) e o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

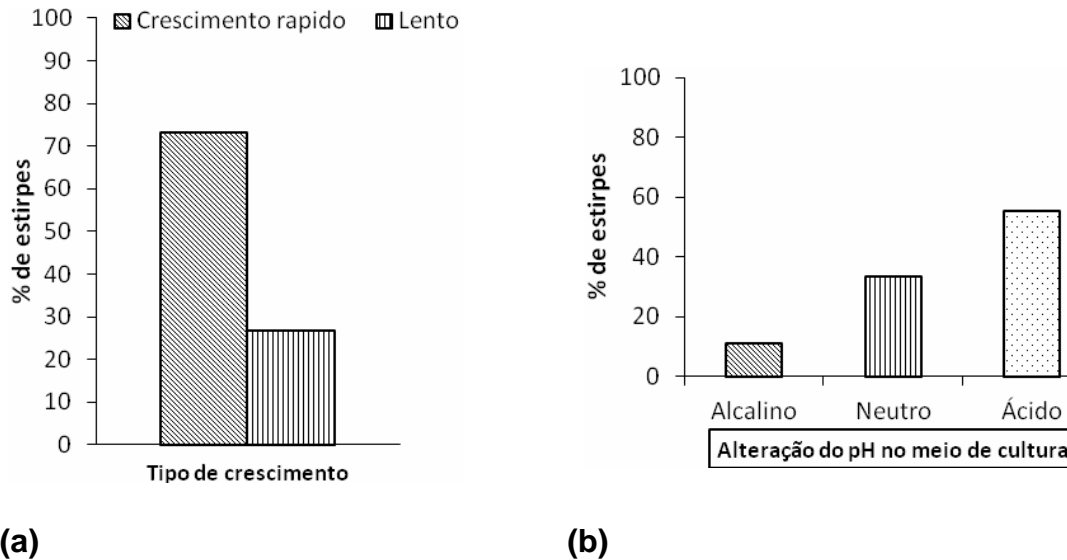
Dentre as características morfológicas predominantes das estirpes avaliadas em meio YMA, observou-se que 54,5% possuem tamanho da colônia inferior a 2 mm; 72,7% das colônias têm forma circular; 93,2% apresentam textura não viscosa; 70,5% absorvem corante (vermelho Congo); 50,0% não produziram quantidade significativa de EPS; 47,7% possuem elevação na colônia (convexo) (Figura 3); 72,7% possuem colônias com bordas lisas; 61,4% com a superfície lisa; 56,8% são opacas, 75,0% apresentaram taxa de crescimento rápido (Figura 4). A estirpe recomendada SEMIA 6144 apresentou as seguintes características: possui colônias menores do que 2 mm, circulares, não absorve corante do meio de cultura, não produz EPS, possui elevação na colônia (convexa), bordas lisas, superfície lisa e tem taxa de crescimento lento.

Figura 3 – Características morfofisiológicas das 44 estirpes estudadas.



A caracterização fisiológica das estirpes mostrou que, das 44 estirpes, 57% acidificaram o meio, 11% alcalinizaram e 32% não modificaram o pH do meio de cultura (Figura 4). A estirpe recomendada SEMIA 6144 alcalinizou o meio de cultura.

Figura 4 – Porcentagem (%) de estirpes com as características fisiológicas; (a) tipo de crescimento em meio de cultura agarizado e (b) alteração do pH do meio de cultura pelas 45 estirpes IPR *Ah* e SEMIA 6144 isoladas de amendoimzeiro.



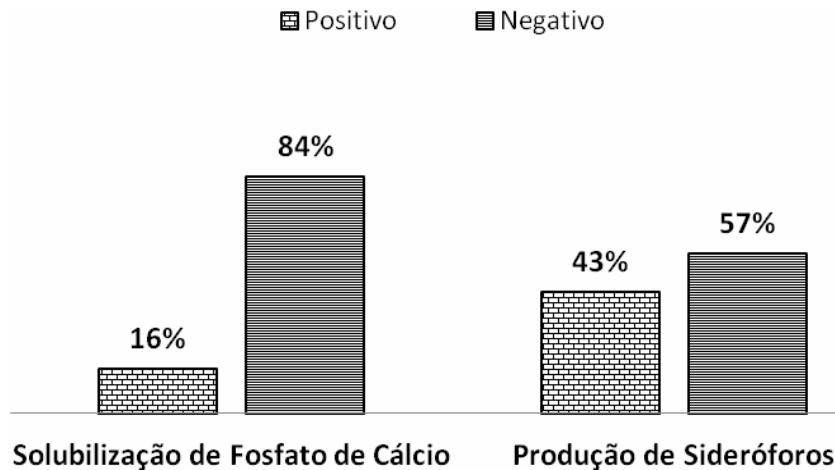
Em relação à capacidade de sintetizar melanina, com crescimento em meio TYA suplementado com L-tirosina e sulfato de cobre, das 44 estirpes somente 10 produziram melanina, representando 22,7% do total. A estirpe recomendada SEMIA 6144 também é capaz de produzir melanina.

A capacidade de produzir sideróforos foi observada em 43% das estirpes (Figura 5). Sideróforos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que possuem alta afinidade por Fe^{+3} , sendo produzidos por diversos microrganismos sob condições de restrição de Fe no ambiente, tornando-o disponível para o microrganismo (SILVEIRA, 2009).

A capacidade de solubilizar fosfato de cálcio em meio de cultura foi observada em 16% dos isolados (Figura 5). O uso de microrganismos solubilizadores de fosfatos, como rizóbio, pode ajudar a aumentar a disponibilidade de P para favorecer o crescimento de plantas leguminosas e não-leguminosas (VESSEY, 2003).

A estirpe recomendada SEMIA 6144 não apresentou capacidade tanto para produção de sideróforos quanto para a solubilização de fosfato de cálcio.

Figura 5 – Porcentagem (%) de estirpes com as características fisiológicas; (a) tipo de crescimento em meio de cultura agarizado e (b) alteração do pH do meio de cultura pelas 45 estirpes IPR *Ah* e SEMIA 6144 isoladas de amendoineiro.



A análise taxonômica numérica com base em testes fisiológicos tem sido uma ferramenta importante para caracterizar e agrupar estirpes de rizóbio (GRANGE; HUNGRIA, 2004; PINTO; HUNGRIA; MARTINS MERCANTE, 2007). Desse modo, uma análise conjunta dos atributos avaliados neste estudo foi realizada.

Para cada característica fenotípica, das estirpes IPR-*Ah* estudadas e da estirpe SEMIA 6144, foram atribuídos valores de 1 ou 0 e suas diferenças foram comparadas pela distância Euclidiana. Os resultados estão representados graficamente por um dendograma (Figura 6).

As estirpes estudadas foram distribuídas em dois grandes grupos, sendo que, o grupo I foi formado por 53% das estirpes. Dentro do grupo I, utilizando um corte no coeficiente de 62%, foi observada a formação de quatro subgrupos (IA, IB, IC e ID). No subgrupo IA foram posicionadas oito estirpes, representando 18% do total analisado, com os agrupamentos:

1 - IPR – *Ah* 4628, 4636 e 4637, provenientes de Londrina (solo sob plantio de milho), Paranavaí (solo sob pastagem) e Joaquim Távora (solo sob floresta), respectivamente, agruparam-se com a estirpe IPR –*Ah* 4723, proveniente de Ponta Grossa (solo sob plantio de amendoim),

2 - IPR-*Ah* 4635 e 4638, provenientes de Umuarama e Joaquim Távora, respectivamente, ambas obtidas de solo sob floresta;

3 - O último agrupamento deste subgrupo foi entre as estirpes IPR-Ah 4641 e 4642, obtidas de solos sob floresta em Planalto e de solo sob plantio de milho respectivamente .

No subgrupo IB foram posicionadas duas estirpes (IPR-Ah- 4740 e 4839).

No subgrupo IC, dois agrupamentos foram formados com 100% de similaridade: IPR-Ah 4677 e 4678 e IPR-Ah 4682 e 4696, todas isoladas de solos obtidos sob plantio com amendoineiro em Ponta Grossa-PR). No subgrupo ID constatou-se um agrupamento com 100% de similaridade (IPR-Ah 4737 e 4758), também com isolados obtidos de solos sob plantio de amendoim em Ponta Grossa-PR).

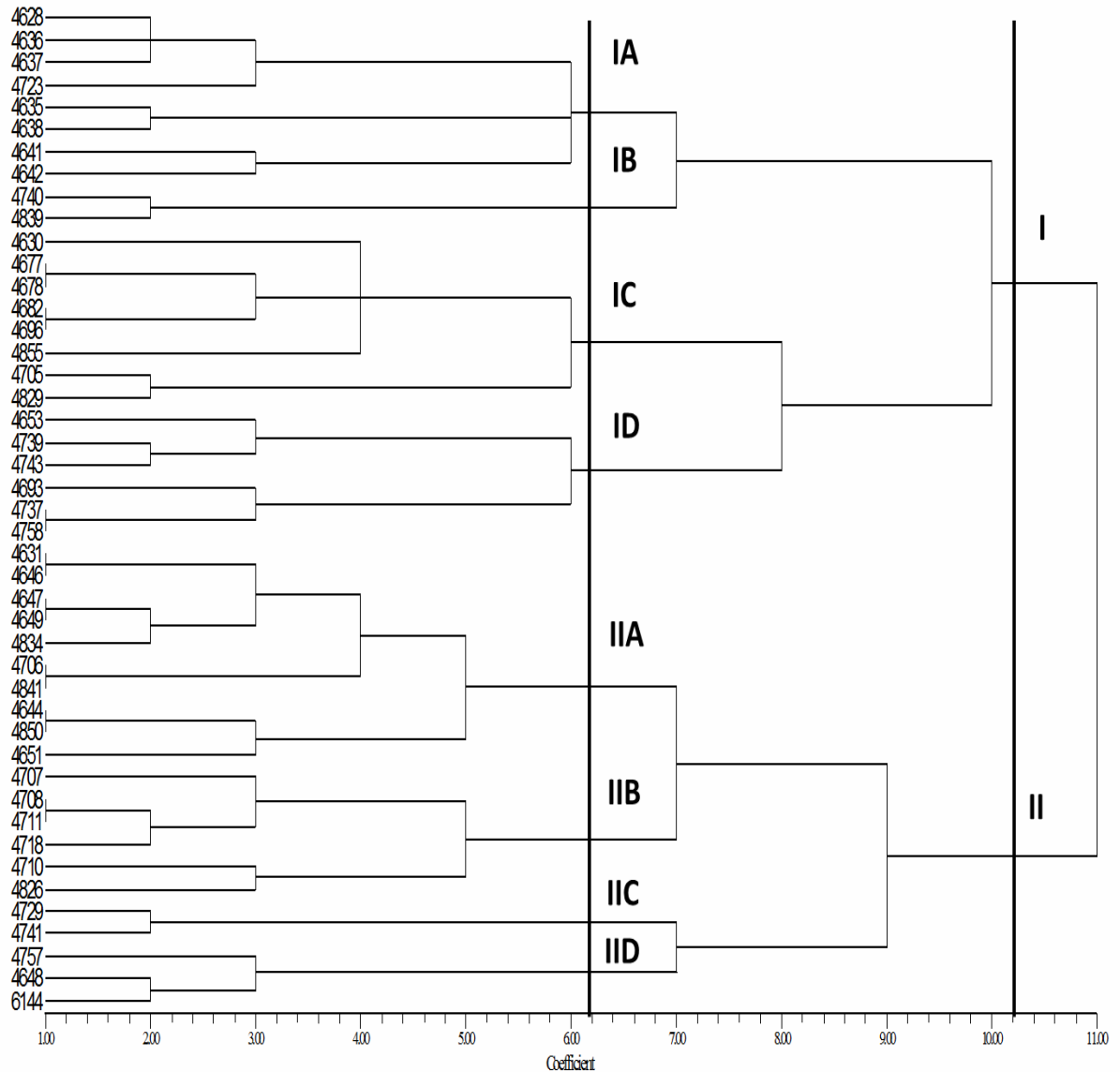
No grupo II, composto de 21 estirpes (47%), também, houve alta diversidade. Foi observada a formação de quatro subgrupos (IIA, IIB, IIC e IID), sendo o subgrupo IIA o maior, formado por 10 estirpes, seguido pelo subgrupo IIB com seis estirpes. No grupo IIA, observaram-se outros quatro agrupamentos com 100% de similaridade, correspondente a:

- 1) IPR-Ah 4631 (pastagem/Joaquim Távora-PR) e 4646 (floresta/ Ponta Grossa-PR);
- 2) IPR-Ah 4647 (floresta/Ponta Grossa-PR) e 4649 (milho/ Nova Cantú-PR);
- 3) IPR-Ah 4706 e 4841 (ambas de Amendoim/ Ponta Grossa-PR) e;
- 4) IPR-Ah 4644 (floresta/ Diamante do Norte-PR) e 4850 (amendoim em Ponta Grossa-PR).

No grupo IIB um agrupamento com 100% de similaridade foi formado, entre as estirpes IPR-Ah 4708 e 4711, ambas isoladas de solos sob plantio de amendoim em Ponta Grossa-PR.

A estirpe autorizada para a produção de inoculantes comerciais para o amendoineiro (SEMIA 6144) ficou agrupada com a estirpe IPR-Ah 4648 (isolada de solos sob plantio de milho em Ponta Grossa-PR) no grupo IID.

Figura 6 – Dendrograma das 44 estirpes IPR-Ah e da estirpe referência SEMIA 6144 com base na distância Euclidiana considerando características morfo-fisiológicas (tamanho, forma, elevação, estrutura, brilho, textura, absorção de corante), tempo de crescimento, produção de melanina, produção de exopolissacarídeos e alteração do pH do meio de cultura.



Após efetuadas três tentativas de amplificação com o oligonucleotídeo BOX-A1R, não foi possível amplificar o DNA de cinco estirpes, assim construiu-se o dendrograma com 39 estirpes.

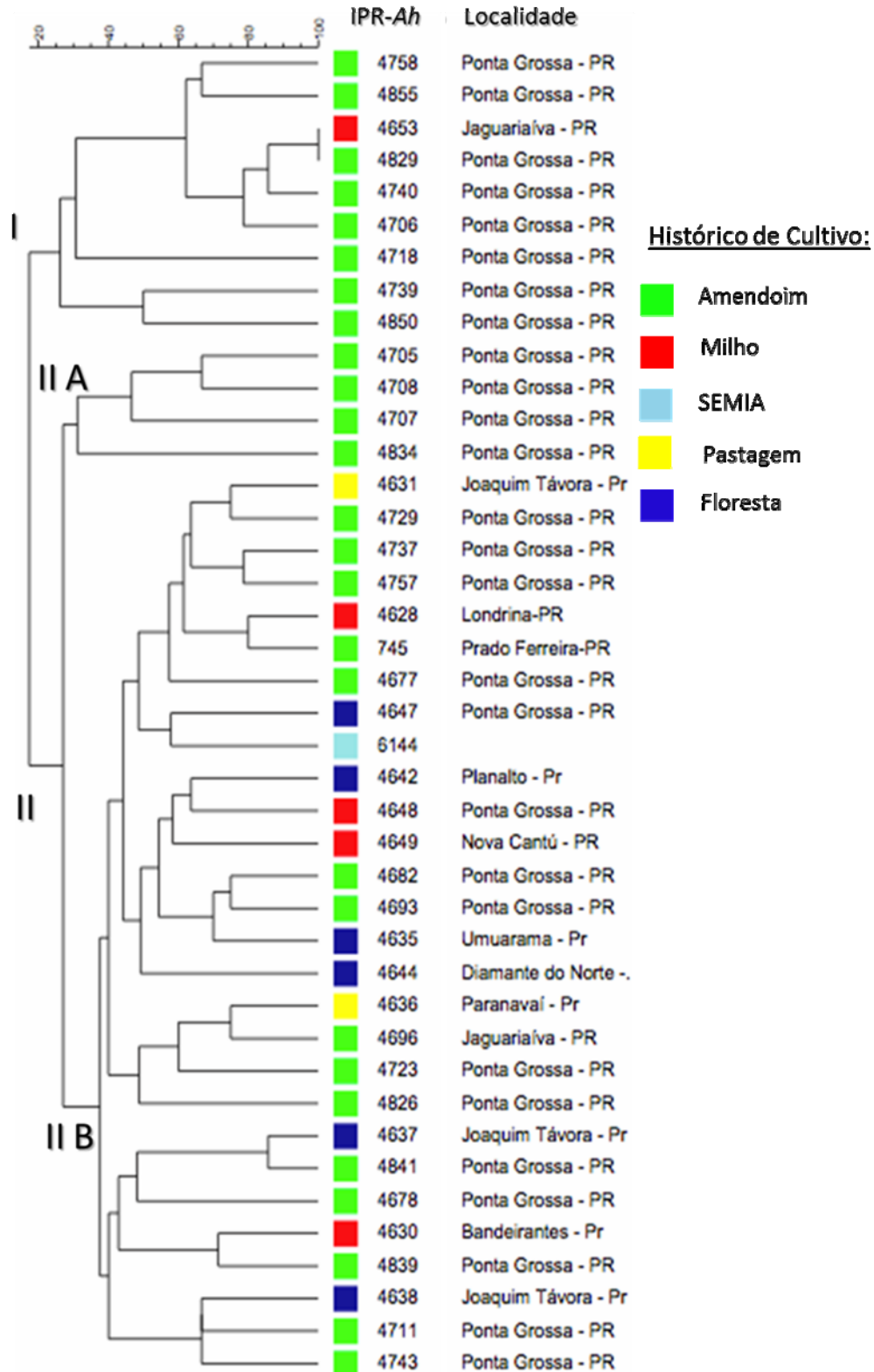
No dendrograma de similaridade genética com 39 estirpes submetidas ao BOX-A1R, além da estirpe SEMIA 6144, (Figura 7), distingue-se a formação de dois grupos. O grupo I é composto por nove estirpes, e neste grupo foi observado um único agrupamento com 100% de similaridade, entre as estirpes IPR- Ah 4653 e IPR- Ah 4829, isoladas respectivamente de solos sob plantio de milho em

Jaguariaíva e amendoinzeiro em Ponta Grossa. O grupo II foi subdividido em dois subgrupos, IIA e IIB. No sub grupo IIA estão quatro estirpes (IPR – *Ah* 4705, 4707, 4708, 4834) todas provenientes de Ponta Grossa e isoladas de solos sob cultivo de amendoim. No subgrupo IIB, foram posicionadas 27 estirpes e também a SEMIA 6144 de *Bradyrhizobium* sp.

A análise dos perfis do BOX – A1R das estirpes IPR-*Ah* mostrou que, exceto no grupo I, com 89% das estirpes isoladas de solo com histórico de cultivo de amendoim, no município de Ponta Grossa, o histórico da área de origem não influenciou os agrupamentos. É possível visualizar, através do dendograma (Figura 7), que existe diversidade de gêneros entre os isolados analisados, sendo que nenhum dos isolados apresentou similaridade elevada com a estirpe padrão.

Figura 7 – Dendrograma genético construído a partir da análise dos produtos amplificados com o oligonucleotídeo BOX-A1R das 39 estirpes IPR-*Ah*

isoladas de nódulos de amendoeiro e a SEMIA 6144. Para a construção foi utilizado o algoritmo UPGMA com coeficiente de Jaccard (2% de tolerância).



Devido à variedade do tamanho de fragmento obtido no sequenciamento do gene 16S rRNA, utilizou-se para a construção da árvore, apenas, as estirpes que

obtiveram fragmentos de tamanhos superiores a 1000pb. Assim, utilizou-se a região entre as posições 100 e 1000pb do gene para a construção da árvore (tamanho do fragmento de 900pb).

Avaliando os resultados obtidos através do sequenciamento do gene 16S rRNA e da construção da árvore filogenética, foi observada a formação de três principais grupos, correspondentes a três filos: Alfareobacteria, Betaproteobacteria e Firmicutes (Figura 8).

Dentro do grupo correspondente ao filo Firmicutes, observou-se a ocorrência de 15 das 18 estirpes sequenciadas. Dentro deste grupo observou-se um agrupamento de sete estirpes (IPR-Ah 4682, 4826, 4706, 4648, 4651, 745 e 4628), sendo quatro delas isoladas de solo proveniente de localidades sob cultivo de amendoim (IPR-Ah 4682, 4826, 4706 e 745) e três sob cultivo de milho (IPR-Ah 4648, 4651 e 4628). O segundo agrupamento dentro do filo Firmicutes ocorreu entre as estirpes IPR-Ah 4638 (isolada de solo sob floresta) e IPR-Ah 4757 e 4630 (isoladas de solo sob cultivo de amendoim e milho, respectivamente). As estirpes IPR-Ah 4646 (floresta), 4834 (amendoim) e 4641 (floresta) não se aproximaram filogeneticamente de nenhuma outra estirpe relatada no estudo. A estirpe IPR-Ah 4644, isolada de solos sob floresta, foi a única estirpe do grupo Firmicutes que foi identificada como pertencente ao gênero *Paenibacillus*, e formou um pequeno subgrupo com a estirpe IPR-Ah 4649 (milho).

O grupo Betaproteobacteria é representado pela estirpe IPR-Ah 4635, proveniente de solo sob floresta, que foi identificada como pertencente ao gênero *Acinetobacter*. E o grupo Alfareobactéria é representado pela estirpe IPR-Ah 4678, isolada de solo sob cultivo de amendoim, única estirpe classificada como pertencente ao grupo rizóbio.

Através do sequenciamento do gene 16S rRNA, foi possível identificar 42 das 44 estirpes estudadas (Tabela 2), duas estirpes não foram identificadas devido à não obtenção das sequências consenso a partir dos cinco *primers* utilizados.

Observou-se que 60% das estirpes, submetidas ao sequenciamento foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*, 9% como pertencentes ao gênero *Acinetobacter*, 7% como pertencentes ao gênero *Paenibacillus* e 23% foram identificadas nos gêneros *Bosea*, *Brevibacterium*, *Cohnella*, *Lysinibacillus*, *Mesorhizobium*, *Micrococcus*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Stenotrophomomas*.

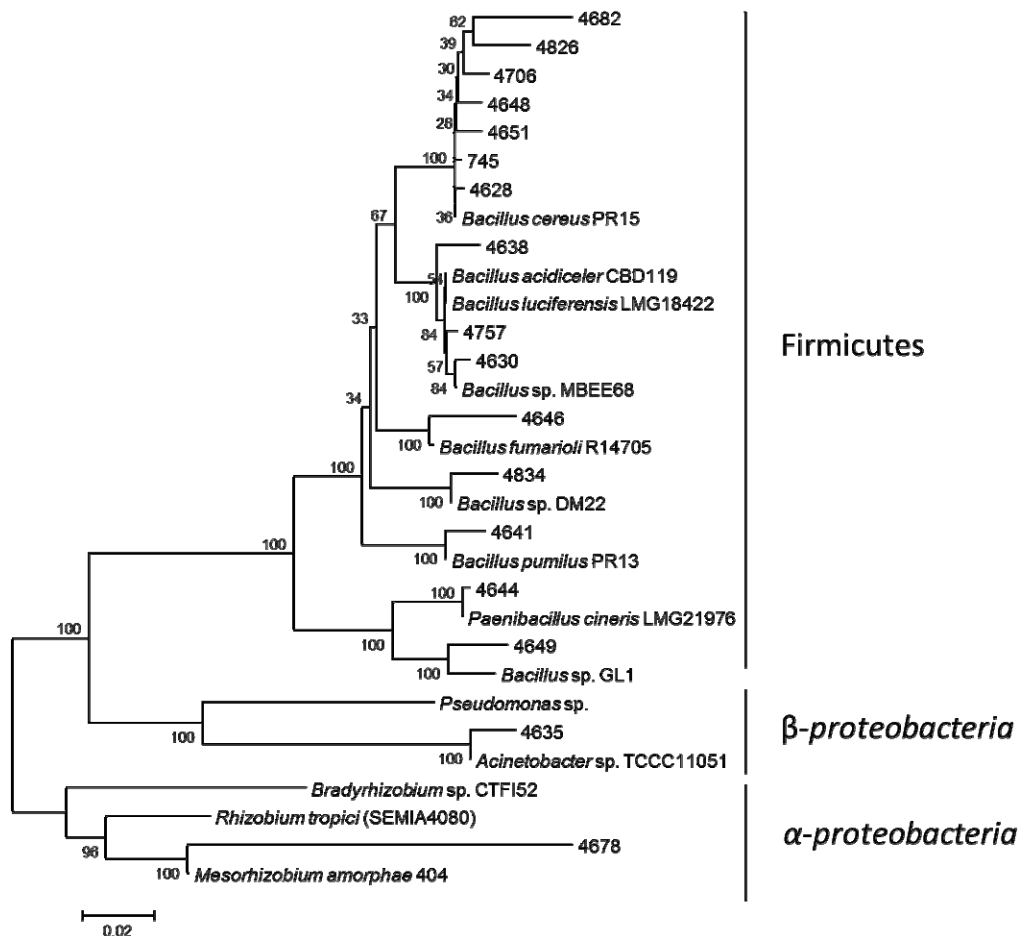
Tabela 2 – Identificação das estirpes através do sequenciamento do gene 16S rRNA, com seus respectivos números de acesso e o número de pares de bases utilizados para a identificação pelo BLAST.

IPR- Ah	Localidade	Histórico de Cultivo	Identificação	% Similaridade	Núm. Acesso	PB
745	Miraselva	Amendoim	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	99%	NR_074926.1	1161
4628	Londrina	Milho	<i>Bacillus cereus</i> PR15	99%	JQ435675.1	1496
4630	Bandeirantes	Milho	<i>Bacillus acidiceler</i> CBD 119	99%	NR_043774.1	1494
4631	Joaquim Távora	Pastagem	<i>Brevibacterium celere</i> KMM 3637	98%	NR_025727.1	743
4635	Umuarama	Floresta	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> DSM 6962	98%	NR_026207.1	1120
4636	Paranavaí	Pastagem	<i>Bacillus aerophilus</i> :28K	98%	NR_042339.1	727
4637	Joaquim Távora	Floresta	<i>Pectobacterium cyripedii</i> DSM 3873	98%	NR_041973.1	715
4638	Joaquim Távora	Floresta	<i>Bacillus luciferensis</i> LMG 18422	98%	NR_025511.1	1143
4641	Planalto	Floresta	<i>Bacillus aerophilus</i> :28K	98%	NR_042339.1	1493
4642	Irati	Milho	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	99%	NR_074540.1	605
4644	Diamante Norte	Floresta	<i>Paenibacillus cineris</i> :LMG 18439	99%	NR_042189.1	1046
4646	Candido Abreu	Floresta	<i>Bacillus niacini</i> IFO15566	97%	NR_024695.1	1153
4647	Ponta Grossa	Floresta	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> DSM 6962	98%	NR_026207.1	905
4648	Ponta Grossa	Milho	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	99%	NR_074540.1	1159
4649	Nova Cantu	Milho	<i>Cohnella phaseoli</i> GSPC1	95%	NR_044374.1	1415
4651	Irati	Milho	<i>Bacillus mycooides</i> 273	99%	NR_036880.1	1161
4653	Jaguariaiva	Milho	<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551	99%	NR_074290.1	643
4677	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	98%	NR_074926.1	723
4678	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Mesorhizobium amorphae</i> ACCC 19665	92%	NR_024879.1	1471
4682	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	96%	NR_074540.1	1121
4693	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Paenibacillus favisporus</i> GMP01	97%	NR_029071.1	671
4696	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551	99%	NR_074290.1	637
4705	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus flexus</i> IFO15715	97%	NR_024691.1	721
4706	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	99%	NR_074540.1	1047
4707	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	99%	NR_041577.1	747
4708	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Pseudomonas lini</i> DLE411J	95%	NR_029042.1	759
4710	Ponta Grossa	Amendoim	N/D	-	-	-
4711	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	99%	NR_074926.1	860
4718	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7	99%	NR_043150.1	731
4723	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077	84%	NR_043403.1	1053
4729	Ponta Grossa	Amendoim	N/D	-	-	-
4737	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus luciferensis</i> LMG 18422	95%	NR_025511.1	735
4739	Ponta Grossa	Amendoim	N/D	-	-	-
4740	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Acinetobacter ursingii</i> LUH 3792	98%	NR_025392.1	701
4741	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	99%	NR_074540.1	604

4743	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077	99%	NR_043403.1	613
4757	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus acidicer</i> CBD 119	99%	NR_043774.1	1496
4758	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus luciferensis</i> LMG 18422	99%	NR_025511.1	715
4826	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	97%	NR_074540.1	1117
4829	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Acinetobacter parvus</i> LUH4616	94%	NR_025425.1	697
4834	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> DSM 28	98%	NR_042073.1	1516
4839	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Paenibacillus rhizosphaerae</i> CECAP06	95%	NR_043166.1	510
4841	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bosea vestrisii</i> 34635	98%	NR_028799.1	798
4850	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Micrococcus endophyticus</i> YIM 56238	98%	NR_044365.1	601
4855	Ponta Grossa	Amendoim	<i>Bacillus thuringiensis</i> IAM 12077	97%	NR_043403.1	674
6144	*Rhodesia 411	Bradyrhizobium sp. **SEMIA6144	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTA-1	95%	NR_042177.1	1001

*Instrução Normativa N° 13, De 24 de Março de 2011. **Codificação FEPAGRO. N/D = Sequencias consenso não obtidas e impossibilidade de identificação através do BLAST.

Figura 8 – Árvore filogenética obtida com dados do sequenciamento do gene 16S rRNA de 17 estirpes microssimbiontes do amendoineiro, isoladas de solos do Paraná e de estirpes tipo e referência, utilizando o algoritmo Neighbor-Joining, através programa MEGA5. A robustez da árvore foi inferida pela análise *bootstrap* com 1000 repetições, também utilizando o programa MEGA5.



Os nódulos das leguminosas podem ser colonizados internamente por vários gêneros de bactérias não relacionadas aos rizóbios (STURZ et al., 1997; MHAMDI et al., 2002; BENHIZIA et al., 2004; MRABET et al., 2006; WANG et al., 2006; KAN et al., 2007; LI et al., 2008; MURESU et al., 2008; LIMA et al., 2009; STAJKOVIĆ et al., 2009), que talvez entrem nos tecidos das plantas juntamente com os rizóbios (HUNG et al., 2007).

Estudos revelaram estirpes de *Stenotrophomonas* em nódulos de *M. atropurpureum* e de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (LIMA et al., 2009), além de outras estirpes simbióticas e não simbióticas dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flexibacter* e *Janthinobacterium*. Estirpes de *Pseudomonas* são endofíticas comuns em nódulos radiculares ((BENHIZIA et al., 2004; KAN et al., 2007; LI et al., 2008; IBÁÑEZ et al., 2009; LIMA et al., 2009).

Espécies de *Bacillus* sp., *Serratia* sp. e *Acinetobacter* sp. foram primeiramente relatadas como bactérias endofíticas de nódulo de soja por Li e colaboradores (2008). Outras espécies do gênero *Bacillus* foram encontradas em nódulos de diversas leguminosas por outros autores (MURESU et al., 2008; LIMA et al., 2009). Ibañez e colaboradores (2009) isolaram estirpes pertencentes à classe gamaproteobacteria, dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, de dentro de nódulos de plantas de amendoimzeiro. Tais estirpes, quando reinoculadas na planta hospedeira não foram capazes de formar nódulos e, quando co-inoculadas com uma estirpe eficiente de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 foram detectadas por ERIC-PCR colonizando internamente os nódulos, sendo consideradas, portanto, bactérias oportunistas.

Nódulos de raízes de feijoeiro, geralmente, podem abrigar bactérias não simbiotes que têm influência decisiva na nodulação e sobrevivência das bactérias, bem como na produção de grãos pela cultura (REMANS et al., 2008; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Essa influência também pode ser passiva e, na maioria das vezes, as bactérias não simbiotes agem de maneira sinérgica com rizóbios aumentando a nodulação e a produtividade de grãos, possivelmente pela ação em outros processos biológicos, por exemplo, pela promoção do crescimento via produção de fitohormônios como o ácido indol acético (AIA), pela excreção de

moléculas que permitem a solubilização de fosfato, pela produção de sideróforos, entre outros (RAJENDRAN et al., 2008; MISHRA et al., 2009).

Sturz e colaboradores (1997) relataram que, além da presença de estirpes de rizóbios em nódulos de trevo vermelho (*Elaeagnus angustifolia* L), também foram encontrados não-rizóbios endófitos. Também Philipson e Blair (1957) encontraram diversas espécies, incluindo bactérias Gram-positivas, em nódulos de trevo vermelho.

Uma possível explicação sobre a presença de bactérias não simbiotes em nódulos de amendoimzeiro é de que essas estirpes podem colonizar o nódulo após ou durante sua formação. Outra explicação pode ser a de que essas bactérias colonizam primeiro o nódulo, induzido pelo *Bradyrhizobium* sp, deslocando assim, a estirpe de rizóbio. Alternativamente, a impossibilidade de recuperar as células de bradirizóbios desses nódulos pode ser explicada pela total diferenciação em bacterioides, um estado não cultivável, podendo tais isolados serem considerados como bactérias oportunistas e não genuinamente simbiotes com o amendoimzeiro, sendo necessária a cooperação do rizóbio para que estas bactérias ocupem os nódulos (STURZ et al., 1997; IBÁÑEZ et al., 2009).

A eficiência simbiótica de inoculantes com rizóbios para uma grande variedade de leguminosas pode ser melhorada por co-inoculação com bactérias promotoras do crescimento em plantas adequados (LAZDUNSKI; VENTRE; STURGIS, 2004). A co-inoculação de *Agrobacterium* sp. auxilia a infecção das raízes e desenvolvimento dos nódulos por *Bradyrhizobium* sp (HAMEED et al., 2004). Da mesma forma, a co-inoculação de *Pseudomonas* com rizóbio melhora a nodulação, a fixação de nitrogênio, aumenta a biomassa e produção de grãos em várias leguminosas como a alfafa (*Medicago sativa* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), soja, grão de bico (*Cicer arietinum* L.) e feijão da china (*Vigna radiata*) (MISHRA et al., 2009). A co-inoculação de rizóbios com *Bacillus*, especificamente *Bacillus thuringifensis*, *Bacillus megatrium* e *Bacillus cereus* promove significativamente a nodulação, o crescimento da planta e produção de grãos (HALVERSON; HANDELSMAN, 1991; MISHRA et al., 2009). Além disso, as bactérias *Burkholderia*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Enterobacter* e *Kurthia* também foram avaliadas quanto à sua eficácia a co-inoculação com rizóbio, observando-se melhorarias no crescimento das plantas (PANDEY; MAHESHWARI, 2007).

A co-inoculação de *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium* sp. aumentou a nodulação em 78% e elevou a produção de grãos de *Vigna radiata* em 22%, quando comparado à inoculação apenas de *Bradyrhizobium* sp (TARIQ et al., 2012).

Em um ensaio conduzido sob condições de laboratório, plantas de amendoineiro foram co-inoculadas com misturas de *Pseudomonas/ Bradyrhizobium* sp, *Klebsiella/ Bradyrhizobium* sp e *Enterobacter/Bradyrhizobium* sp. O controle com plantas inoculadas apenas com *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 mostrou a formação de nódulos vermelhos, enquanto que as plantas não inoculadas mostraram sintomas de clorose e raízes sem a presença de nódulos. Plantas inoculadas apenas com as estirpes de *Pseudomonas*, *Klebsiella* ou *Enterobacter*, não apresentaram nenhum nódulo no sistema radicular, mas o peso seco das plantas foi significativamente maior quando comparado com as plantas não inoculadas, indicando a habilidade da promoção do crescimento de plantas destes isolados (IBÁÑEZ et al., 2009).

A utilização das Bactérias Promotras do Crescimento de Plantas (BPCPs) visando melhoria da produção agrícola será, provavelmente, uma das ferramentas mais importantes para a atualidade no mundo. Isso se deve à demanda emergente para a diminuição da dependência de fertilizantes químicos e a necessidade de desenvolvimento da agricultura sustentável (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando as características morfofisiológicas, do total de 44 estirpes estudadas, a maior parte acidificou o meio de cultura (25) e apresentaram taxa de crescimento rápido (33).

Houve uma predominância do gênero *Bacillus* (60%) na identificação das estirpes através do sequenciamento do 16S rRNA.

A localidade e o histórico de cultivo do local de origem não influenciaram no agrupamento das estirpes estudadas ao se considerar características morfofisiológicas, fragmentos do BOX-PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA..

No Brasil, os dados sobre a diversidade de gêneros de bactérias associadas a nódulos de amendoinzeiro ainda são escassos, por isso, a caracterização destas estirpes foi de grande interesse, uma vez que pode fornecer mais informações sobre o tema filogenia de simbióticos nativos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.63-94.
- ARAUJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.91-120.
- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: Greene Publishing & Wiley Interscience, 1994.
- BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 57-65, 2005.
- BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1198-1206, 2006.
- BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MURESU, R.; GIACOMINI, A.; SQUARTINI, A. Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 462-468, 2004.
- BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; DOS REIS JÚNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; DE FARIA, S. M.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K.; YOUNG, J. P. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 1, p. 44-52, 2010.
- BOOGERD, F. C.; VAN ROSSUM, D. Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 5-27, 1997.
- BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Variabilidade genética entre acessos de amendoim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1151-1157, 2007.
- BREWEN, N. J. Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: The structure development of infection threads symbiosomes. In: SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. (Ed.). **The Rhizobiaceae: molecular biology of plant-associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.417-429.
- BURDON, J. J.; GIBSON, A. H.; SEARLE, S. D.; WOODS, M. J.; BROCKWELL, J. Variation in the effectiveness of symbiotic associations between native rhizobia and temperate Australian Acacia: within-species interactions. **Journal of Applied Ecology**, v. 36, n. 3, p. 398-408, 1999.

BURRIS, R. H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 381-393, 1999.

BURTON, J. C. Rhizobium species. In: PEPPLER, H. J. (Ed.). **Microbial technology**. (2nd Edition). New York: Academic Press, 1979. p.29-58.

CERETTA, C. A.; AITA, C.; BRAIDA, J. A.; PAVINATO, A.; SALET, R. L. Fornecimento de nitrogênio por leguminosas na primavera para o milho em sucessão nos sistemas de cultivo mínimo e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, n. 2, p. 215-220, 1994.

CHANDLER, M. R. Some observations on infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. **Journal of Experimental Botany**, v. 29, n. 3, p. 749-755, 1978.

CHANDLER, M. R.; DATE, R. A.; ROUGHLEY, R. J. Infection and root-nodule development in *Stylosanthes* species by *Rhizobium*. **Journal of Experimental Botany**, v. 33, n. 1, p. 47-57, 1982.

CHEN, Q.; ZHANG, X.; TEREFWORK, Z.; KAIJALAINEN, S.; LI, D.; LINDSTRÖM, K. Diversity and compatibility of peanut (*Arachis hypogaea* L.) bradyrhizobia and their host plants. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 605-617, 2003a.

CHEN, W. M.; DE FARIA, S. M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; CHOU, J.-H.; CHOU, Y.-J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7461-7471, 2005.

CHEN, W. M.; LAEVEENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W. M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOIVIN-MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by betaproteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7266-7272, 2003b.

CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R.; SCHIMEL, D. S.; FISHER, H.; HOWARTH, R. W.; HEDIN, L. O.; PERAKIS, S. S.; LATTY, E. F.; VON FISCHER, J. C.; ELSEROAD, A.; WASSON, M. F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 13, n. 2, p. 623-645, 1999.

CONAB, C. N. D. A. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, safra 2012/2013, quinto levantamento: fevereiro/2013. Disponível em: <
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_02_08_17_24_51_boletim_fevereiro_2013.pdf>. Acesso em: 07 de março de 2013.

- CUBO, T.; ROMERO, F.; VINARDELL, J. M.; RUIZ-SAINZ, J. E. Expression of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli melA* gene in other rhizobia does not require the presence of the *nifA* gene. **Functional Plant Biology**, v. 24, n. 2, p. 195-203, 1997.
- DÖBEREINER, J.; PAULA, M.; MONTEIRO, E. M. S. A pesquisa em microbiologia do solo no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, n. 4, p. 841-854, 1990.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 835-842, 2003.
- FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, W. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin Press, 1932. 343 p.
- FREIRE, J. R. Important limiting factors in soil. In: ALEXANDER, M. (Ed.). **Biological nitrogen fixation: ecology, technology and physiology**. New York: Plenum Press, 1984. p.51-74.
- GARRITY, G. M.; LILBURN, T. G.; COLE, J. R.; HARRISON, S. H.; ENZEBY, J.; TINDALL, B. J. Taxonomic outline of bacteria and archaea: TOBA release 7.7. Michigan, 2007. Disponível em: < <http://www.taxonomicoutline.org> >. Acesso em: 07 de março de 2013.
- GODOY, I. J.; SAVY FILHO, A.; TANGO, J. S.; UNGARO, M. R. G.; MARIOTTO, P. R. **Programa integrado de pesquisa – oleaginosa**. Campinas: IAC, 1985. 33 p.
- GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: Importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 872-877, 2003.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 9, p. 1389-1398, 2004.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HALVERSON, L. J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 2767-2770, 1991.
- HAMEED, S.; YASMIN, S.; MALIK, K.; ZAFAR, Y.; HAFEEZ, F. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 3, p. 179-185, 2004.
- HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2004.

- HENRIQUES NETO, D. H.; TAVORA, F. J. A. F.; SILVA, F. P.; SANTOS, M. A.; MELO, F. I. O. Componentes de produção e produtividade do amendoim submetido a diferentes populações e configurações de semeadura. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 2, p. 113-122, 1998.
- HERRIDGE, D.; ROSE, I. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2-3, p. 229-248, 2000.
- HUANG, H. Q.; HE, F. R.; CHEN, Z. H. Study on the biological characteristic of fast-growing peanut rhizobial strains 85-7 and 85-19. **Journal of Sichuan Agricultural University**, v. 8, p. 188-193, 1990.
- HUNG, P. Q.; KUMAR, S. M.; GOVINDSAMY, V.; ANNAPURNA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, n. 1, p. 155-162, 2007.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 339-364, 1994.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 542 p.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 30., 2005, Recife. **Anais...Recife**, 2005. p.1-30 1 CD-ROM.
- HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M. F.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. Inoculant Preparation, Production and Application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**: Springer Netherlands, v.4, 2005. cap. 11, p.223-253. (Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress).
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.; ARAUJO, R. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, p. 1-11, 2013.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2-3, p. 151-164, 2000.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.189-295.
- IBÁÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M. L.; FABRA, A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 49-55, 2009.
- JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist**, v. 11, p. 37-50, 1912.

JAFTHA, J. B.; STRIJDOM, B. W.; STEYN, P. L. Characterization of pigmented methylotrophic bacteria which nodulate *Lotononis bainesii*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 440-449, 2002.

KAN, F. L.; CHEN, Z. Y.; WANG, E. T.; TIAN, C. F.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 2, p. 103-115, 2007.

KAPE, R.; PARNISKE, M.; WERNER, D. Chemotaxis and nod gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 316-319, 1991.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANNEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v. 8, p. 1-186, 1994.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M. R.; CHARNAY, M. P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S. I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2029-36, 1996.

LAZDUNSKI, A. M.; VENTRE, I.; STURGIS, J. N. Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 581-592, 2004.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 238-246, 2008.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. D. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, n. 1-2, p. 127-145, 2009.

MARTIN, P. S. **Amendoim uma planta da história no futuro brasileiro**. São Paulo: Ícone, 1985. 68 p.

MARTINS, C. M.; COSTA, J. S.; LOURERO, M. F.; RUMJANEK, N. G. Diversidade de rizóbios de nódulos de caule e raiz das espécies forrageiras, *Diclobium* spp. e *Aeschynomene fluminensis* presentes no Pantanal Matogrossense. In: (Ed.). **VII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, Anais...**. Recife, 1997. p.99.

- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315-332, 2006.
- MHAMDI, R.; LAGUERRE, G.; AOUANI, M. E.; MARS, M.; AMARGER, N. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 41, n. 1, p. 77-84, 2002.
- MISHRA, P.; MISHRA, S.; SELVAKUMAR, G.; BISHT, J. K.; KUNDU, S.; GUPTA, H. Co-inoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 753-761, 2009.
- MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. 726 p.
- MOULIN, L.; CHEN, W. M.; BÉNA, G.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Rhizobia: The family is expanding. In: FENAN, T. M.; O'BRIAN, M. R.; LAYZELL, D. B.; VESSEY, J. K.; NEWTON, W. (Ed.). **Nitrogen fixation: global perspectives**. Oxford: CABI Publishing, 2002. p.61-65.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 948-950, 2001.
- MRABET, M.; MNASRI, B.; ROMDHANE, S. B.; LAGUERRE, G.; AOUANI, M. E.; MHAMDI, R. *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, n. 2, p. 304-309, 2006.
- MUNOZ AGUILAR, J. M.; ASHBY, A. M.; RICHARDS, A. J. M.; LOAKE, G. J.; WATSON, M. D.; SHAW, C. H. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. **Journal of General Microbiology**, v. 134, n. 10, p. 2741-2746, 1988.
- MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F. B.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 3, p. 383-400, 2008.
- MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell Online**, v. 7, n. 7, p. 869-885, 1995.
- NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, G. Ecologia de bactérias diazotróficas de solos tropicais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.15-60.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D. K. Two-species microbial consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. **Current Science**, v. 92, n. 8, p. 1137-1142, 2007.

PHILIPSON, M. N.; BLAIR, I. D. Bacteria in clover root tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 3, p. 125–129, 1957.

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

PONGSLIP, N. Classification and taxonomy of rhizobia. In: PONGSLIP, N. (Ed.). **Phenotypic and genotypic diversity of rhizobia**. Nakhon Pathom, Thailand: Bentham Science Publishers, 2012. cap. 1, p.3-48.

RAJENDRAN, G.; SING, F.; DESAI, A. J.; ARCHANA, G. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4544-4550, 2008.

REMANS, R.; RAMAEKERS, L.; SCHELKENS, S.; HERNANDEZ, G.; GARCIA, A.; REYES, J.; MENDEZ, N.; TOSCANO, V.; MULLING, M.; GALVEZ, L.; VANDERLEYDEN, J. Effect of *Rhizobium*–*Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1-2, p. 25-37, 2008.

RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAÍNO, N.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. B.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5217-5222, 2002.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc : numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 1.8**. New York: Exeter Software, 1994.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.279-335.

SADOWSKY, M. J.; GRAHAM, P. H. Soil biology of the Rhizobiaceae. In: SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. (Ed.). **The Rhizobiaceae: Molecular biology of plant-associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.155-172.

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

SALEENA, L. M.; LOGANATHAN, P.; RANGARAN, S.; NAIR, S. Genetic diversity of *Bradyrhizobium* strains isolate from *Arachis hypogaea*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 118-122, 2001.

SANTOS, C. E. R. S. **Diversidade de rizóbio nativo da Região Nordeste do Brasil capaz de nodular amendoim (*Arachis hypogaea*), *Stylosanthes* e *Aeschynomene***. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SOUTO, S. M.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Science Agronomy**, v. 27, p. 301-307, 2005.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J.; FAVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R. C. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. p.123-190.

SCHWYNN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical analysis for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47-56, 1987.

SIDDIQUE, A.-B. M.; BAL, A. K. Nitrogen fixation in peanut nodules during dark periods and detopped conditions with special reference to lipid bodies. **Plant Physiology**, v. 95, n. 3, p. 896-899, 1991.

SILVEIRA, A. A. **Análise genética e funcional de genes relacionados com a captação de sideróforos em *Bradyrhizobium elkanii*** (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2009.

SMITHSON, P.; GILLER, K. Appropriate farm management practices for alleviating N and P deficiencies in low-nutrient soils of the tropics. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, p. 169-180, 2002.

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.

SPRENT, J. Plant biology: Mutual sanctions. **Nature**, v. 422, n. 6933, p. 672-674, 2003.

SPRENT, J. I.; FARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157-165, 1988.

SPRENT, J. I.; HIRSCH, P. Nodulation in legumes. **Annals of Botany**, v. 89, n. 6, p. 797-798, 2002.

SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? **Plant Physiology**, v. 144, n. 2, p. 575-581, 2007.

STAJKOVIĆ, O.; MEYER, S. D.; MILIČIĆ, B.; WILLEMS, A.; DELIĆ, D. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Botanica Serbica**, v. 33, n. 1, p. 107-114, 2009.

- STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, n. 1, p. 13-19, 1997.
- SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 214-220, 2001.
- TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- TAJIMA, R.; MORITA, S.; ABE, J. Distribution pattern of root nodules in relation to root architecture in two leading cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in Japan. **Plant Production Science**, v. 9, n. 3, p. 249-255, 2006.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
- TARIQ, M.; HAMEED, S.; YASMEEN, T.; ALI, A. Non-rhizobial bacteria for improved nodulation and grain yield of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 84, p. 15012-15019, 2012.
- TAURIAN, T.; IBAÑEZ, F.; FABRA, A.; AGUILAR, O. M. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in Central Argentinean Soils. **Plant and Soil**, v. 282, p. 41-52, 2006.
- THIES, J. E.; BOHLOOL, B. B.; SINGLETON, P. W. Subgroups of the cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1540-1545, 1991.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- URTZ, B. E.; ELKAN, G. H. Genetic diversity among *Bradyrhizobium* isolates that effective by nodulate peanut (*Arachis hypogaea*). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1120-1132, 1996.
- VAN BERKUM, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1132-1136, 2002.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p.
- WANG, L. L.; WANG, E. T.; LIU, J.; LI, Y.; CHEN, W. X. Endophytic occupation of root nodules and roots of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Microbiology Ecology**, v. 52, n. 3, p. 436-443, 2006.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.
- WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1-2, p. 3-14, 2006.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. A.; GOUVÊA, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, v. 19, n. 1, p. 25-33, 2006.
- YANG, J. K.; XIE, F. L.; ZOU, J.; ZHOU, Q.; ZHOU, J. C. Polyphasic characteristics of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in China. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, n. 141-153, 2005.
- 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.
- ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, v. 21, n. 6, p. 569-576, 2001.