



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DAISY RICKLI BINDE

**ANÁLISE FILOGENÉTICA, COM BASE NO GENE  
RIBOSSOMAL 16S, DE 54 ESTIRPES ELITE DE RIZÓBIOS  
UTILIZADAS EM INOCULANTES COMERCIAIS  
BRASILEIROS**

---

Londrina  
2008

DAISY RICKLI BINDE

**ANÁLISE FILOGENÉTICA, COM BASE NO GENE  
RIBOSSOMAL 16S, DE 54 ESTIRPES ELITE DE RIZÓBIOS  
UTILIZADAS EM INOCULANTES COMERCIAIS  
BRASILEIROS**

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

Orientadora: Prof. Dra. Mariangela Hungria

Londrina  
2008

DAISY RICKLI BINDE

**ANÁLISE FILOGENÉTICA, COM BASE NO GENE RIBOSSOMAL 16S,  
DE 54 ESTIRPES ELITE DE RIZÓBIOS UTILIZADAS EM  
INOCULANTES COMERCIAIS BRASILEIROS**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Mariangela Hungria  
(Orientadora)  
EMBRAPA-Soja

---

Dr. Fernando Gomes Barcellos  
(Pesquisador)  
EMBRAPA-Soja

---

Dra. Diva de Souza Andrade  
(Pesquisadora)  
IAPAR

Londrina, 20 de junho de 2008.

## DEDICATÓRIA

*À minha família,*

*João Luis, meu marido, cúmplice e fiel amigo,*

*Isabela, nossa filha, alegria da casa,*

*Papai e mamãe, razão da minha existência,*

*E meus irmãos, queridos da minha vida.*

*Todos, presente de DEUS.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Dr. Mariangela Hungria, primeiramente, pela orientação e dedicação, e também pelo tempo que passei no laboratório e convivi com a pessoa incrível que ela é, como chefe e amiga;*

*À querida amiga Ligia M. O. Chueire, tão experiente, criteriosa e sempre disposta a ajudar;*

*Ao Dr. Fernando Gomes Barcellos, pelos ensinamentos;*

*À Pâmela Menna, pela amizade e apoio durante as atividades;*

*À todos do laboratório, Adriana, Alan, Eliane, Fabinho, Fábio, Glaciela, Jesiane, Leandro, Leny, Lílian, Lucas, Maria, Nágila. Renan Urso, Renan, Rosinei, Susan, pela amizade e incentivo;*

*Aos amigos da UTFPR – Apucarana, que no final foram suporte em momentos difíceis.*

*E às instituições que contribuíram de alguma forma, EMBRAPA Soja, CNPQ e UEL.*

*“Mais do que tecnologia precisamos de humanidade.  
Mais do que inteligência precisamos de afeição e doçura.  
Sem essas virtudes a vida será de violência e tudo estará perdido.”*

Adaptado de Charles Chaplin

BINDE, Daisy Rickli. **Análise Filogenética, com Base no Gene Ribossomal 16S, de 54 Estirpes Elite de Rizóbios Utilizadas em Inoculantes Comerciais Brasileiras**. 2008. 52f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

Entre as bactérias fixadoras de nitrogênio (N<sub>2</sub>), os rizóbios, em simbiose com leguminosas, estão entre as mais importantes para a agricultura, contudo, a seleção, identificação e manutenção de estirpes elite simbiotes de cada hospedeira em coleções de culturas são etapas críticas para a maximização do processo de fixação biológica do N<sub>2</sub>. Um problema atual nas coleções de culturas reside nas profundas alterações que ocorreram na taxonomia dos procariotos, incluindo as bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, como resultado do uso de métodos moleculares, com ênfase na análise dos genes ribossomais, no caso de bactérias, o 16S rRNA. Neste estudo, foram determinadas as seqüências de nucleotídeos do gene 16S rRNA de 54 estirpes elite da “Coleção de Culturas de Rizóbios (SEMIA)” da FEPAGRO, que são recomendadas oficialmente, no Brasil, para a produção de inoculantes para 47 leguminosas. O objetivo principal do trabalho foi o de obter uma melhor compreensão das relações filogenéticas entre essas 54 estirpes de rizóbios. Seis principais grupos filogenéticos foram definidos entre as bactérias estudadas: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (=Ensifer), *Mesorhizobium*, *Methylobacterium* e *Burkholderia*. Das 54 estirpes, a análise do gene 16S rRNA resultou na reclassificação de 18 delas, em relação à classificação prévia, com base nas propriedades morfo-fisiológicas *in vitro* e de especificidade hospedeira. Houve fortes indicações, ainda, de 12 novas espécies de rizóbios. A grande diversidade observada neste estudo salienta que os solos localizados nos trópicos são um reservatório importante de genes de fixação de N<sub>2</sub>, que ainda precisa ser melhor estudado e explorado.

**Palavras-chave:** *Bradyrhizobium*. *Rhizobium*. Fixação biológica do nitrogênio. *Methylobacterium*. *Burkholderia*. RNAr 16S gene. *Sinorhizobium*. *Mesorhizobium*.

BINDE, Daisy Rickli. **Phylogenetic Analysis, Based on the 16S Ribosomal Gene, of 54 Elite Rhizobial Strains Used in Brazilian Commercial Inoculants.** 2008. 52f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2008.

## ABSTRACT

Among the nitrogen (N<sub>2</sub>)-fixing bacteria, the rhizobial strains in symbiosis with legumes are among the most important for the agriculture, however, the selection, identification and maintenance of elite strains for each host legume represent critical steps towards the maximization of the biological N<sub>2</sub> fixation process. The taxonomy of prokaryotes including N<sub>2</sub>-fixing bacteria is undergoing substantial revisions due to the use of molecular methods, with an emphasis to the use of conserved ribosomal genes, in the case of bacteria, the 16S rRNA. In this study we have evaluated the 16S rRNA sequences of 54 elite strains of the “Brazilian *Rhizobium* Culture Collection” of the FEPAGRO, officially recommended for the inoculant production for 47 legumes. The main objective was to obtain a better comprehension of the phylogenetic relationships among those 54 rhizobial strains. Six major phylogenetic groups were defined: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium* e *Burkholderia*. The analysis of the 16S rRNA genes resulted in the reclassification of 18 out of the 54 strains, previously classified based on morpho-physiological properties *in vitro* and the host specificity. The results have also strongly suggested the existence of 12 new rhizobial species. The great diversity observed in this study emphasizes that tropics are an important reservoir of N<sub>2</sub>-fixation genes that should be better studied and explored.

**Keywords:** Biological nitrogen fixation. *Bradyrhizobium*. *Rhizobium*. *Sinorhizobium*. *Mesorhizobium*. *Methylobacterium*. *Burkholderia*. 16S rRNA gene.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Processo de infecção da raiz da planta hospedeira pelos rizóbios .....	14
<b>Figura 2</b> – Transferência de elétrons pela nitrogenase .....	15
<b>Figura 3</b> – Esquema do gene RNAr 16S e a posição dos iniciadores ( <i>primers</i> ).....	29
<b>Figura 4</b> – Árvore filogenética.....	33

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO (FBN) .....	13
1.2 TAXONOMIA .....	16
1.2.1 CRONÔMETROS FILOGENÉTICOS.....	17
1.2.2 PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS PARA CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA .....	18
1.3 TAXONOMIA DOS RIZÓBIOS .....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	23
2.1 OBJETIVO GERAL .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
3.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS .....	24
3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA .....	24
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA .....	25
3.4 AMPLICAÇÃO DO GENE RNAR 16S.....	25
3.5 SEQÜENCIAMENTO DO GENE RIBOSSOMAL 16S.....	29
3.6 CONSTRUÇÃO DA FILOGENIA.....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	32
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45

## INTRODUÇÃO

É prática fundamental, na biotecnologia, a utilização de microrganismos. Torna-se, assim, indispensável o conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de novos organismos. A biodiversidade envolve todas as formas de vida, ecossistemas e processos ecológicos; abrange suas hierarquias em níveis genéticos, taxonômicos e de ecossistemas. No conhecimento da biodiversidade presente nos diferentes ecossistemas está a base do progresso biotecnológico esperado em diferentes áreas da ciência aplicada, que se inicia com a procura e a descoberta de um fenômeno biológico que possa ser explorado (BULL; GOODFELLOW; SLATER, 1992).

Por ser importante para a pesquisa e para o desenvolvimento dos processos produtivos, o material biológico é um insumo a ser preservado e conhecido. Portanto, as coleções de culturas microbianas apresentam um papel relevante na conservação *ex situ* (preservação), distribuição e identificação de recursos genéticos microbianos, bem como na organização e disponibilização de informações associadas aos seus acervos (SETTE; VAZOLLER, s.a). É de extrema importância, então, a classificação correta e completa de um microrganismo, determinando suas características, funções e possíveis potenciais biotecnológicos.

Para a produção agrícola, base da economia nacional ou regional, o uso da biotecnologia é essencial, porque oferece serviços e insumos que proporcionam um aumento significativo na produtividade das culturas. Um exemplo, é a cultura da soja (*Glycine max* L. Merr.), que desempenha um papel importante na agricultura brasileira. Sabe-se que a inoculação de plantas da família *Leguminosae* com bactérias denominadas, de modo geral, como rizóbios, resulta em que, quando em simbiose, ocorra o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN), substituindo totalmente os fertilizantes nitrogenados; esse processo também ocorre com a soja. No Brasil, essa tecnologia representa uma economia estimada, atualmente, em mais de 6 bilhões de dólares por safra, que, de outro modo, seriam gastos com fertilizantes nitrogenados necessários ao desenvolvimento da cultura da soja (HUNGRIA; CAMPO; MENDES., 2007).

Para alcançar altas produtividades na cultura da soja e de outras leguminosas de alto teor protéico, é necessária uma grande quantidade de nitrogênio (N), por ser um elemento indispensável à síntese de proteínas. Uma vez que as fontes de N no solo são esgotáveis, em caso de uso, é necessária a reposição do nutriente. Apesar do nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) compor 80% da atmosfera, esse não pode ser fixado pelas plantas, sendo necessário que se combine com outros elementos, antes de ser utilizado. Uma alternativa seria o uso de fertilizantes nitrogenados, porém, esses apresentam alto custo e contribuem para a poluição dos rios, lagos e lençóis freáticos. Em contrapartida, o processo de FBN, pode resultar em baixo custo e não possui caráter poluente. (VARGAS; HUNGRIA, 1997; SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001).

Pode-se concluir que a cultura da soja só é economicamente viável, no Brasil, graças à FBN. Com o uso de inoculantes (produto à base de microrganismos), contendo estirpes selecionadas, é possível obter altos rendimentos com baixo custo; além disso, o processo de FBN contribui para a manutenção da qualidade ambiental, por diminuir a poluição ambiental com nitrato. Contudo, a capacidade de FBN pode ser limitada, tanto pelas cultivares, ocasionada pela suscetibilidade a estresses ambientais e ao ataque de pragas e doenças, entre outros, como por características intrínsecas das estirpes do rizóbio, ou ainda, por limitações ambientais (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Visando o manejo mais eficiente da simbiose com diversas leguminosas, é essencial o estudo da biodiversidade dentro das espécies, especialmente em regiões tropicais onde poucos estudos foram conduzidos até o presente momento. Para buscar entender as complexas relações ecológicas e evolucionárias, entre os rizóbios, além da procura de genótipos tolerantes aos diferentes estresses ambientais presentes nessas áreas e limitantes à simbiose.

Inúmeros esforços têm sido alocados no sentido de selecionar estirpes de elevada eficiência, mas também, que sejam competitivas frente às estirpes existentes no solo, que tenham alta capacidade de se associar com as plantas e que apresentem eficiência em uma ampla gama de cultivares. O crescimento em meios industriais também é avaliado, pois essas estirpes serão utilizadas para produção de inoculantes. As estirpes selecionadas passam, então, a serem recomendadas pelo Ministério da Agricultura para produção de inoculantes e são armazenadas em um banco oficial de estirpes, que no Brasil, se encontra na

FEPAGRO/MIRCEN, da Secretaria de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A recomendação de estirpes, baseada nos dados experimentais, é feita pela Rede de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* (RELARE), que se reúne com a presença dos principais pesquisadores do país e com as empresas produtoras de inoculantes (ARAÚJO, 1997). Atualmente essa rede passou a ser denominada “Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola” (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

Desta forma, espera-se a adoção, cada vez em maior escala, na agricultura, de leguminosas em simbiose. Portanto, o conhecimento da biodiversidade de organismos diazotróficos e a classificação dos mesmos, tornam-se importantes para que novas espécies sejam identificadas e que as antigas sejam revistas, por meio de novas e modernas abordagens experimentais de biologia molecular. Isso é de grande importância porque, embora tenha sido alocado, no Brasil, um considerável esforço na seleção de estirpes eficazes no processo de FBN de quase uma centena de leguminosas, a sua caracterização genética e a determinação de sua posição taxonômica ainda não estão suficientemente elucidadas.

Nesse sentido, projetos de coleções de culturas têm importante função para o estudo da diversidade e para sua manutenção no Brasil. Um setor que se encontra avançado é do agronegócio e, na área da microbiologia, a FBN. Conseqüentemente, coleções de culturas de bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas representam um acervo valioso que inclui estirpes relevantes para a elucidação dos mecanismos de FBN e suas aplicações tecnológicas.

Neste contexto, com base no seqüenciamento do gene 16S rRNA, este estudo tem como objetivo, melhor compreender as relações filogenéticas de 54 bactérias diazotróficas simbióticas, autorizadas para produção de inoculantes no Brasil para 47 leguminosas, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2008).

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO (FBN)

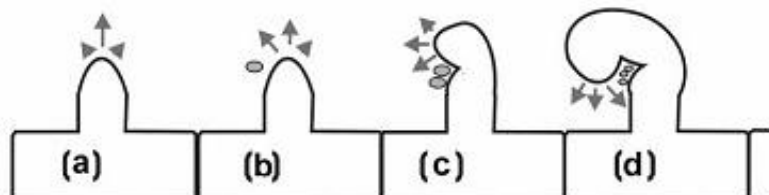
A FBN constitui a principal via de incorporação do nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) à biosfera, perfazendo cerca de 65% do total, ou 96% da fixação por processos naturais e é considerada, após a fotossíntese, como o processo biológico mais importante, sendo fundamental para a vida na Terra (HUNGRIA et al., 2005).

O nitrogênio (N) é fundamental para o crescimento das plantas, pois é o constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucléicos, hormônios, clorofila, entre outras moléculas. A maior parte das plantas obtém o N do solo na forma de íon nitrato ( $NO_3^-$ ), havendo algumas que o absorvem na forma de íon amônio ( $NH_4^+$ ). Contudo, 78% da constituição gasosa da atmosfera é formada por nitrogênio molecular, ou dinitrogênio ( $N_2$ ), onde os átomos encontram-se unidos de uma maneira muito estável. Para que o nitrogênio ( $N_2$ ) possa ser utilizado pela planta, deve ser reduzido a amônia ( $NH_3$ ) e convertido em íons amônio ( $NH_4^+$ ), ou outra forma que seja assimilável. Para tanto, em processos industriais, é necessário o fornecimento de temperatura e pressão muito elevadas, ou, em processo biológico, a presença de um sistema enzimático apropriado, a dinitrogenase (HUNGRIA; VARGAS; ARAÚJO, 1997).

Esse complexo enzimático catalisa o processo de redução do nitrogênio ( $N_2$ ) à amônia ( $NH_3$ ) e é encontrado unicamente, em alguns procariotos, organismos unicelulares denominados fixadores de nitrogênio ( $N_2$ ), ou diazotróficos. No processo de FBN, os microrganismos existentes no solo fixam o nitrogênio ( $N_2$ ) e o reduzem à forma de amônia ( $NH_3$ ), a seguir, reagem com íons de hidrogênio e passam a amônio ( $NH_4^+$ ) (HUNGRIA et al., 2005).

O nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), além de ser utilizado pelos microrganismos, pode ser fornecido para plantas, por associação simbiótica. Algumas plantas, como as leguminosas [feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.)], vivem em simbiose com algumas bactérias, coletivamente denominadas rizóbios, que são fixadores simbióticos primários do nitrogênio ( $N_2$ ).

Essas bactérias infectam as raízes das leguminosas (e algumas poucas não-leguminosas, como a *Parasponia*), conduzindo à formação de estruturas específicas, os nódulos (Figura 1), onde a fixação de  $N_2$  ocorre (INDGE, 2000; LAEREMANS; VANDERLEYDEN, 1998).



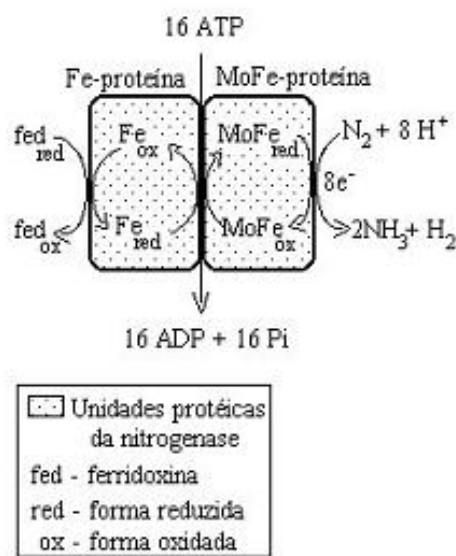
**Figura 1** – Processo de infecção da raiz da planta hospedeira pelos rizóbios: (a) crescimento normal e uniforme da raiz; (b) crescimento desproporcional da raiz; (c e d) aumento da parede celular e crescimento progressivo das colônias bacterianas conduzindo a deformação da raiz

**Fonte:** BREWIN (2004, p.298)

Devido à ação dos flavonóides presentes na planta hospedeira, que funcionam como sinais moleculares, as bactérias são atraídas em direção às raízes, ao redor dos tricomas (pêlos) radiculares, onde degradam uma porção da parede celular, originando o cordão de infecção. No interior do cordão, as bactérias continuam se multiplicando, formando, assim, o nódulo primário. O cordão de infecção se ramifica para invadir as células vegetais, dessa maneira, o citoplasma da célula invadida conterá vários grupos de bactérias. As bactérias, que se encontram dentro das células radiculares hospedeiras param de se multiplicar, aumentam de tamanho e sofrem várias alterações bioquímicas para se transformarem em bactérias especializadas na fixação de  $N_2$ , denominadas bacteróides (HOPKINS; HÜNER, 2004; MYLONA; PAWLOWSKI; BISSELING, 1995).

No processo de FBN a bactéria fornece o N necessário para a planta (hospedeira) e a planta fornece fontes de carbono e energia necessárias para as atividades metabólicas da bactéria, em uma relação simbiótica (INDGE, 2000). A reação de FBN caracteriza-se pela redução do  $N_2$  à  $NH_3$ , onde é necessário o transporte de elétrons, mediado pela enzima nitrogenase, que é formada por duas unidades protéicas, a ferro-proteína (Fe-proteína) e a molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas capazes de transportar elétrons, nucleados pela ferridoxina

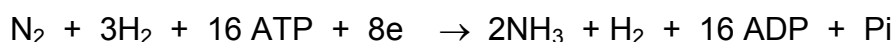
(Figura 2). A ferridoxina, na sua forma reduzida, transfere um elétron para a unidade Fe-proteína da nitrogenase. A Fe-proteína, então reduzida, doa o elétron recebido para a MoFe-proteína, que acumula os elétrons. Após oito transferências, essa unidade terá acumulado oito elétrons e, então, fará a redução do  $N_2$  à  $NH_3$  (HOPKINS; HÜNER, 2004).



**Figura 2:** Transferência de elétrons pela nitrogenase

Fonte: HOPKINS; HÜNER (2004)

Esse processo requer muita energia, 16 moléculas de ATP e enzimas necessárias para quebrar as pontes de nitrogênio, de maneira que a combinação com o hidrogênio seja facilitada. A reação pode ser descrita como:



Conforme já comentado, no processo de FBN, a  $NH_3$ , em contato com o substrato aquoso do citoplasma dos bacteróides, é convertida em  $NH_4^+$ , que por sua vez, ao saturar o substrato, inibe a FBN. Assim, o  $NH_4^+$  é retirado dos bacteróides, atingindo o citoplasma da célula vegetal hospedeira. Para as células vegetais, o  $NH_4^+$  também é prejudicial e precisa ser transformado em moléculas que não possuam efeito tóxico. Duas enzimas, a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT), são responsáveis pela conversão do  $NH_4^+$  em aminoácidos, que



são a glutamina e o glutamato (HOPKINS; HÜNER, 2004; MYLONA; PAWLOWSKI; BISSELING, 1995).

## 1.2 TAXONOMIA

A grande diversidade de organismos levou o homem a procurar meios de organizar, ordenar e denominar os seres vivos. Os primeiros sistemas de classificação geravam grupos que, normalmente, partilhavam características morfológicas, independentemente das suas relações filogenéticas. Ao longo do tempo, com o aprofundamento das ciências biológicas, novos sistemas de classificação têm sido propostos.

A taxonomia (do grego *taxon*: categoria, grupo e, *nomos*: conhecimento) é uma ciência que tem como objetivo classificar, identificar e nomear os organismos (VANDAMME et al., 1996). No princípio, os resultados na formação de grupos taxonômicos eram heterogêneos e, muitas vezes, artificiais, mas devido ao desenvolvimento tecnológico, a taxonomia de bactérias, em geral, sofreu muitas mudanças.

O estudo da filogenia é uma ferramenta da taxonomia utilizada para determinar a relação existente entre os organismos, indicando seu possível grupo, suas relações com outros grupos e seu lugar nas famílias e reinos, bem como auxiliando no reconhecimento dos ancestrais (LUDWIG et al., 1994). A filogenia pode ser definida como uma história evolucionária de organismos e genes, cujo entendimento é um pré-requisito para estudos ecológicos e de genética de populações. A identificação correta de um microrganismo de acordo com suas correlações filogenéticas ajuda a prever propriedades genotípicas e fenotípicas esperadas para cada espécie (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999). Em bactérias a filogenia é baseada, principalmente, em dados de seqüenciamento de genes estruturais conservados, onde genes mais conservados ajudam a comparar organismos relacionados distantemente, enquanto que genes menos conservados são utilizados na identificação de mudanças pequenas e recentes (LUDWIG et al., 1994).

### 1.2.1 Cronômetros filogenéticos

Em 1987, Woese propôs o agrupamento dos seres vivos em uma árvore filogenética com o uso do gene ribossomal 16S e 18S (RNAr 16S e 18S), o que mudou o rumo da taxonomia (LUDWIG; KLENK, 2001). Os genes ribossomais, com ênfase para os RNAr – 5S, 16S, 23S, são extremamente conservados, essenciais à sobrevivência dos organismos, por estarem relacionados com a síntese protéica. É importante comentar que, assim como em outros genes que ocorrem em múltiplas cópias no genoma, os genes ribossomais estão sujeitos a um processo de homogeneização, o que significa que todas as cópias tendem a ser, similares umas às outras (HAUKKA; LIDSTRÖM; YOUNG 1996). Enfim, esses genes são altamente conservados e as espécies que possuem mais de 70% de similaridade nos valores de hibridização DNA-DNA, apresentam geralmente mais de 97% de identidade nas seqüências do gene RNAr 16S (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

O RNAr 16S é considerado, como um cronômetro molecular nos estudos de filogenia e evolução, para bactérias, e o RNAr 18S, para eucariotos, pois preenchem todos os requisitos que definem um marcador filogenético (RODICIO; MENDOZA, 2004):

- 1) Os RNAr's estão presentes e têm a mesma função em todos os organismos;
- 2) Eles se originaram de um ancestral comum, portanto são homólogos;
- 3) Suas seqüências de nucleotídeos são altamente conservadas em algumas regiões e possuem também outras regiões variáveis;
- 4) São relativamente grandes, com informações suficientes para permitir comparações estatísticas significativas;
- 5) A estrutura primária dessas moléculas possui sítios de evolução independentes, conseqüentemente, contêm regiões variáveis suficientes para permitirem a discriminação entre diferentes moléculas.

Para o estudo de filogenia, portanto, é preciso a seqüência completa de nucleotídeos do gene RNAr 16S. Uma vez determinada, é estabelecida a comparação e a similaridade entre as seqüências obtidas, permitindo a construção de árvores filogenéticas, que indicam a relação evolutiva dos organismos comparados (RODICIO; MENDOZA, 2004).

Níveis mais altos tais como: filo, classe, ordem, família e gênero, conforme Brenner, Staley e Krieg (2001), têm sido definidos pela análise das seqüências do gene RNAr 16S. Entretanto, para determinação de espécies, vêm sendo utilizadas análises de similaridades DNA-DNA, seqüência do RNAr 16S e características fisiológicas, porém, ainda não há uma determinação precisa quanto à especiação em bactérias (BRENNER; STALEY; KRIEG, 2001).

### 1.2.2 Princípios Metodológicos para Construção da Árvore Filogenética

Para construção da árvore filogenética baseada no seqüenciamento do gene RNAr 16S, método molecular de identificação bacteriana, é necessário cumprir três etapas: amplificação do gene, determinação da seqüência de nucleotídeos e análise das seqüências.

A amplificação do gene RNAr 16S, com tamanho aproximado de 1500 pb, implica em uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - reação em cadeia da polimerase), com iniciadores apropriados de 20 nucleotídeos (RODICIO; MENDOZA, 2004). Com o gene amplificado, é realizada uma reação de seqüenciamento, similar à de amplificação. Porém, utiliza um único iniciador e terminadores (dNTP) adequados marcados com fluorescência, que interrompem a síntese de maneira aleatória. Essa metodologia é baseada no método de terminação da cadeia, ou método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Portanto, para obtenção da seqüência completa do gene RNAr 16S, em geral são necessárias várias reações, dependendo da quantidade de bases que o seqüenciador consegue determinar. Em geral, os seqüenciadores automáticos, utilizados atualmente, seqüenciam aproximadamente 500 a 900 pb. Como o gene RNAr 16S tem, aproximadamente, 1500 pb, torna-se necessário utilizar de quatro à oito iniciadores, que possibilitem a sobreposição das seqüências obtidas para a obtenção do gene completo (RODICIO; MENDOZA, 2004).

Em sistema operacional Linux, as seqüências, geradas no seqüenciador automático, podem ser processadas pelos programas Phred, Phrap e Consed (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). O primeiro faz a leitura dos eletroferogramas, isto é, digitaliza as leituras de

DNA e atribui qualidade às bases com a utilização de algoritmos. Há probabilidade de erro de leitura que infere a qualidade Phred, correspondente a um número inteiro entre 0 e 99. Uma base com qualidade 40 indica que o erro é de 1 base em  $10^4$ , mas somente considera-se uma base como aceitável se tiver qualidade, de no mínimo, 20 (1 base incorreta em 100) (CARRARO; KITAJIMA, 2002).

O alinhamento e a edição das seqüências são gerados pelo programa Phrap, que lê os fragmentos já digitalizados, procurando encontrar os elos entre as seqüências para ligá-las, formando seqüências maiores, chamadas de consenso (*contig*). Gerado o *contig* de alta qualidade, o programa Consed faz a visualização das seqüências (EWING; GREEN 1998; GORDON et al., 1998) e então, pode ser feita a comparação das mesmas com o banco de dados.

Atualmente existem bancos de dados distintos, alguns com acervo público e com acesso livre, como: GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), e outros privados, como MicroSeq (Applied Biosystems) e SmartGene IDNS (Integrated Database Network System).

Finalmente, na última etapa, é feita a construção da árvore filogenética, através do alinhamento das seqüências obtidas, existindo vários programas para isso. Como exemplo, podem-se citar os programas, CLUSTAL W e MEGA 3, que usam métodos algoritmos baseados em modelos evolutivos. Os algoritmos mais utilizados são o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means*) e o Neighbor-joining, que realizam uma série de cálculos com a matriz de distância gerada a partir do alinhamento para estimar a árvore filogenética. (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004; SAITO; NEI, 1987). Dessa forma, é possível visualizar a árvore filogenética de forma esquemática, que reflete o parentesco genético entre os organismos comparados (RODICIO; MENDOZA, 2004).

### 1.3 TAXONOMIA DOS RIZÓBIOS

As principais responsáveis pelo processo de FBN são bactérias simbióticas, chamadas coletivamente de rizóbios, termo genérico que inclui várias famílias, gêneros e espécies de bactérias. Os rizóbios já identificados foram classificados como pertencentes a: Domínio: *Bacteria*; Filo: *Proteobacteria*; Classe: *Alfaproteobacteria* ( $\alpha$ ) e *Betaproteobacterias* ( $\beta$ ). Nas  $\alpha$ -proteobactérias, já foram encontradas bactérias simbióticas, em sete gêneros descritos: *Devosia*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*. Nas  $\beta$ -proteobactérias, há dois gêneros descritos até o presente momento, *Wautersia*, *Burkholderia*. Os gêneros com maior número de espécies descritas são os quatro últimos das *Alfaproteobacteria*, pelo grande interesse na agricultura (BREWIN, 2004; LLORET; MARTINEZ-ROMERO, 2005).

Inicialmente, porém, o agrupamento dos rizóbios era baseado somente em características fenotípicas. Essa classificação era dada pela especificidade do rizóbio, resultante do conceito de “grupos de inoculação cruzada”, onde cada bactéria possui habilidade de nodular e fixar  $N_2$  com a respectiva leguminosa hospedeira. Desse modo, *Rhizobium phaseoli* nodula feijoeiro; *R. japonicum*, a soja; *R. meliloti*, a alfafa (*Medicago sativa*); *R. lupini*, *Lupinus* spp. e *R. trifolii*, o trevo (*Trifolium repens*) (JORDAN; ALLEN, 1974).

O conceito de planta hospedeira, porém, foi modificado, devido à existência de muitas exceções. Foram observadas muitas reações cruzadas entre as plantas hospedeiras e as bactérias simbióticas, pois um único gênero de leguminosa, por exemplo, *Acácia* ou *Leucaena*, poderia abrigar diferentes simbiontes (TEREFEWOR et al., 2000). A *Acacia*, por exemplo, pode ser nodulada por *Bradyrhizobium* sp. (DUPUY; DREYFUS, 1992), *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (DE LAJUDIE et al., 1994) e *R. huakuii* (MARTÍNEZ-ROMERO, 1994). Outro exemplo ocorre com o feijoeiro que, além de outras prováveis espécies ainda não descritas é nodulado por uma grande diversidade de rizóbios, incluindo *R. tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum*, *R. giardinii* e *R. gallicum* (MOSTASSO et al., 2002; GRANGE; HUNGRIA, 2004). Por isso, esse conceito foi muito criticado e somente meio século depois, pela análise de características morfológicas, fisiológicas,

bioquímicas e genéticas, a classificação segundo a “inoculação cruzada” foi substituída pela taxonomia numérica (HUNGRIA; VARGAS; ARAUJO, 1997).

Esses estudos foram impulsionados com o advento de metodologias avançadas, tais como a sistemática molecular e a quimiotaxonomia, para a caracterização de microrganismos. Bactérias de crescimento rápido e lento foram, então, separadas em dois gêneros, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (JORDAN; ALLEN, 1984) e, posteriormente, mais quatro novos gêneros foram incluídos: *Sinorhizobium* (rizóbio de soja de crescimento rápido) (CHEN; YAN; LI, 1998; DE LAJUDIE et al., 1994), *Azorhizobium* (DREYFUS; GARCIA; GILLIS, 1988), *Mesorhizobium* (JARVIS; PANKHURST; PATEL, 1982; LINDSTRÖM et al., 1995; NOUR et al., 1994) e *Allorhizobium* (DE LAJUDIE et al., 1998). A grande diversidade, de acordo com Piñero et al. (1988), tanto quanto a ampla distribuição geográfica podem ser interpretadas como evidências de que *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e outros rizóbios sejam estirpes antigas e com uma longa história evolutiva.

Essas novas técnicas também trouxeram uma revolução no estudo da diversidade desses microrganismos, revelando uma estreita relação filogenética entre bactérias que, aparentemente, não estariam relacionadas. Esses estudos estão permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos que atuam na evolução das bactérias simbióticas. De acordo com essa ampla diversidade de estirpes, vários grupos de pesquisa têm se empenhado na tentativa de classificar tais microrganismos e na descrição de novas espécies (MARTÍNEZ-ROMERO, 1994).

Na atualidade, para a definição de novas espécies, é recomendado o uso da “taxonomia polifásica”, a qual procura integrar diferentes tipos de informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas dos microrganismos, buscando uma classificação de consenso. Com o constante avanço das técnicas de biologia molecular, será possível, em breve, identificar novas espécies. É fundamental, portanto, estar atualizado com as novas correntes taxonômicas e atentar para o fato de que, certamente, a cada ano, novos gêneros e espécies são descritos e/ou reclassificados, seguindo uma tendência lógica, desde que se estima que somente 12% das espécies de bactérias são conhecidas (VANDAMME et al., 1996).

O Brasil é o principal país dentre os chamados de megadiversos, por possuir um grande território com uma grande diversidade climática. Segundo Lewinsohn e Prado (2002), o Brasil tem registradas, aproximadamente, 200.000 espécies de microrganismos, representando 14% da biota mundial e estima-se que

ainda haja cerca de 2 milhões de espécies que ainda não são conhecidas. Apesar de ser um número aproximado, sinaliza que a biodiversidade brasileira é cerca de dez vezes maior que a atualmente conhecida. Mesmo as estimativas mais moderadas sugerem que o número real de espécies seja seis vezes maior de que o registrado hoje no País. Assim, para um melhor aproveitamento da biodiversidade brasileira, é fundamental a implementação de programas de pesquisa, que visem a identificação de novas espécies e de classificação de microrganismos. E essa necessidade está ligada à importância que a biodiversidade representa e pode representar para o País.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Inferir as relações filogenéticas entre 54 estirpes da “Coleção de Culturas SEMIA”, recomendadas como inoculantes comerciais para 47 leguminosas, com base no gene ribossomal 16S e definir a classificação taxonômica das mesmas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Realizar a caracterização morfo-fisiológica das estirpes, através da determinação da cor, mucosidade, diâmetro, transparência, bordas e elevação das colônias, bem como da reação ácida ou alcalina e determinação da velocidade de crescimento em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono.
- 2) Realizar o seqüenciamento do gene RNAr 16S das estirpes;
- 3) Construir a árvore filogenética das estirpes, com base no gene RNAr 16S;
- 4) Inferir as relações filogenéticas entre as estirpes;
- 5) Com base nas relações filogenéticas determinar a classificação taxonômica adequada.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Foram utilizadas, nesse estudo, 54 bactérias diazotróficas simbióticas (Tabela 1), recomendadas para produção de inoculantes comerciais no Brasil, recomendadas para 47 leguminosas, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2008). As estirpes foram fornecidas pela FEPAGRO (Fundação de Pesquisa Agropecuária, Porto Alegre - RS). Na Tabela 1, constam as informações sobre as estirpes, que foram armazenadas em tubos com meio de cultura contendo extrato-de-levedura e manitol (YMA - *yeast manitol agar*) (VINCENT, 1970) e estocadas a -80 °C em meio YM (*yeast manitol*) líquido e glicerol (30%).

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

As estirpes foram crescidas em placas contendo o meio YMA, suplementado com vermelho Congo (0.00125%), para determinação de características morfológicas, como, cor, mucosidade, diâmetro, transparência, bordas e elevação da colônia. A acidez e alcalinidade produzidas pelas estirpes, foram analisadas em YMA contendo azul de bromotimol (0,00125%), que é indicador de pH. A velocidade de crescimento das estirpes, também foi avaliada, segundo o tempo para manifestação das colônias isoladas. Assim, foi determinado: crescimento rápido, para as estirpes que cresceram até três dias; crescimento intermediário, para quatro a cinco dias; crescimento lento, para seis a nove dias; e crescimento muito lento, para períodos superiores a dez dias. O cultivo foi realizado no escuro, a 28°C, conforme descrito por Vincent (1970).

### 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA total foi extraído a partir do cultivo das espécies selecionadas em meio YM líquido até a fase exponencial ( $10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ). As células foram separadas por centrifugação, lavadas e ressuspensas em 400  $\mu\text{L}$  de tampão TE 50/20 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). O DNA foi extraído conforme descrito anteriormente (FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003), pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de SDS 10%, 5  $\mu\text{L}$  de proteinase-K ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de lisozima ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), e 1  $\mu\text{L}$  de RNase ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A seguir, procedeu-se à purificação com etanol a 96% e, em seguida, com etanol a 70%. O *pellet* foi ressuspendido em TE 10/1, até uma concentração final de  $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de DNA e as amostras foram armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.4 AMPLIFICAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL 16S

O gene RNAr 16S das bactérias foi amplificado pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), com os *primers* fD1 e rD1 (WEISBURG, et al., 1991). A amplificação foi realizada conforme descrito por Menna et al. (2006), em um volume final de 50  $\mu\text{L}$ , contendo dNTPs (300  $\mu\text{M}$ ), PCR-buffer (Tris-base 20 mM pH 8.4 e KCl 50 mM),  $\text{MgCl}_2$  (1,5 mM), *primers* (15 pmol em cada), Taq DNA polymerase (1,2 U), DNA (20 ng) e DMSO (5%).

O produto de PCR foi purificado com o uso do *Kit*, PureLink PCR Purification (Invitrogen), e a concentração das amostras foi padronizada para  $40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  DNA e foram, então, armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

**Tabela 1** – Informações sobre as estirpes de rizóbios utilizadas neste estudo e suas respectivas leguminosas hospedeiras.

LEGUMINOSAS <sup>a</sup>	SUBFAMÍLIA <sup>c</sup>	REGISTRO GEOGRÁFICO (NATIVA) <sup>c</sup>	TRIBO <sup>b,c</sup>	NOME COMUM <sup>a</sup>	ESPÉCIE DE MICROORGANISMO RECOMENDADO (TAXONOMIA) <sup>a</sup>	Nº DA COLEÇÃO OFICIAL (SEMIA) <sup>a</sup>
<i>Acacia angustissima</i>	<i>Mimosoideae</i>	Américas	Acacieae	acácia	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6430
<i>Acacia farnesiana</i>	<i>Mimosoideae</i>	Ásia, Caribe, Austrália e Américas	Acacieae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6436 6430
<i>Acacia podalyriaefolia</i>	<i>Mimosoideae</i>	Ásia e Austrália	Acacieae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6389
<i>Acacia saligna</i>	<i>Mimosoideae</i>	Austrália	Acacieae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6096 6428
<i>Acacia silicina</i>	<i>Mimosoideae</i>	-	Acacieae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6392 6400
<i>Adesmia latifolia</i>	<i>Papilionaceae</i>	América do sul	Adesmieae	adesmia	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6437 6438
<i>Albizia lebeck</i>	<i>Mimosoideae</i>	Ásia, Oceano Índico e América do Sul	Ingeae	língua-de-sogra	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6432
<i>Arachis pintoii</i>	<i>Papilionaceae</i>	América do Sul (Brasil)	Aeschynomeneae	amendoim forrageiro	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6439
<i>Balizia pedicellaris</i>	<i>Mimosoideae</i>	América Central	Ingeae	juerana-branca	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6396 6408
<i>Bowdichia virgiloides</i>	<i>Papilionoideae</i>	América do Sul	Sophoreae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6414 6096
<i>Calliandra callothyrsus</i>	<i>Mimosoideae</i>	-	Ingeae.	caliandra	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6395 6423
<i>Calliandra surinamensis</i>	<i>Mimosoideae</i>	Austrália, Caribe e América do Sul	Ingeae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6395 6423
<i>Centrosema</i> sp.	<i>Papilionaceae</i>	-	Phaseoleae	centrosema	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	690
<i>Chamaecrista ensiformis</i>	<i>Caesalpinioideae</i>	América do Sul (Brasil)	Cassieae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6392
<i>Clitoria fairchildiana</i>	<i>Papilionaceae</i>	América do Sul (Brasil)	Phaseoleae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6411
<i>Dalbergia nigra</i>	<i>Papilionaceae</i>	América do Sul (Brasil)	Dalbergieae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6413
<i>Dimorphandra jorgei</i>	<i>Caesalpinioideae</i>	América do Sul (Brasil)	Caesalpinieae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6400
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	<i>Mimosoideae</i>	América do Sul e Central	Ingeae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6403
<i>Enterolobium timbouva</i>	<i>Mimosoideae</i>	América do Sul	Ingeae	timbaúva	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6397

<i>Falcataria moluccana</i>	Mimosoideae	África, Ásia, Austrália e Oceano Pacífico	Ingeae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6432
<i>Gliricidia sepium</i>	Papilionaceae	Ásia, Caribe, América Central e do Sul	Robinieae	gliricidia	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6435
<i>Inga marginata</i>	Mimosoideae	América Central e do Sul	Ingeae	ingá	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6433
<i>Lathyrus odoratus</i>	Papilionaceae	Ásia, Europa, Oriente Médio	Vicieae	sincho, ervilha de cheiro	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Vicieae</i>	388 3018
<i>Lens esculenta</i>	Papilionaceae	África, Ásia, Oriente Médio,	Vicieae	lentilha	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Vicieae</i>	344 3026 3025
<i>Leucaena diversifolia</i>	Mimosoideae	América Central	Mimoseae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6162
<i>Leucaena leucocephala</i>	Mimosoideae	América Central	Mimoseae	leucena	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6153
<i>Lonchocarpus costatus</i>	Papilionaceae	Américas	Millettieae	leucena	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6399 6404
<i>Lotus corniculatus</i>	Papilionaceae	África, Ásia, Europa e Oriente Médio	Loteae	cornichão	<i>Mesorhizobium loti</i>	806
<i>Lotus subbiflorus</i>	Papilionaceae	África e Europa	Loteae	el rincón	<i>Mesorhizobium loti</i>	848 849
<i>Medicago sativa</i>	Papilionaceae	Ásia e Oriente Média	Trifolieae	alfafa	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	116
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	Mimosoideae	América do Sul (Brasil)	Mimoseae	mimosa, sabiá, sansão do campo	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6410
<i>Mimosa flocculosa</i>	Mimosoideae	-	Mimoseae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6417 6422
<i>Parapiptadenia rigida</i>	Mimosoideae	América do Sul	Mimoseae	angico	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6416
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Papilionaceae	América Central	Phaseoleae	feijão	<i>Rhizobium tropici</i>	4088
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	Mimosoideae	América do Sul (Brasil)	Mimoseae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6385
<i>Pisum sativum</i>	Papilionaceae	África, Europa e Oriente Médio	Fabeae	ervilha	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Vicieae</i>	3012
<i>Pithecellobium tortum</i>	Mimosoideae	América do Sul (Brasil)	Ingeae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6407 6406
<i>Poecilanthe parviflora</i>	Papilionaceae	América do Sul	Brongniartieae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6403
<i>Prosopis juliflora</i>	Mimosoideae	Caribe, América Central, do Norte e do Sul	Mimoseae	algaroba	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6162
<i>Pseudosamanea guachapele</i>	Mimosoideae	Caribe, América Central e do Sul	Ingeae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6409 6403
<i>Samanea saman</i>	Mimosoideae	Ásia, Caribe, América	Ingeae	-	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	6405

		Central e do Norte				6403
<i>Stylosanthes sp.</i>	<i>Papilionaceae</i>	-	Aeschynomeneae	estilozantes	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	6154
<i>Trifolium pratense</i>	<i>Papilionaceae</i>	África, Ásia, Europa e Oriente Médio	Trifolieae	trevo vermelho	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. Trifolii</i>	265 2082
<i>Trifolium repens</i>	<i>Papilionaceae</i>	África, Ásia, Europa e Oriente Médio	Trifolieae	trevo branco	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	235 2082 2083
<i>Trifolium semipilosum</i>	<i>Papilionaceae</i>	África e Oriente Médio	Trifolieae	trevo da kênia	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	2002
<i>Trifolium subterraneum</i>	<i>Papilionaceae</i>	África, Ásia, Europa e Oriente Médio	Trifolieae	trevo subterrâneo	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	265
<i>Trifolium vesiculosum</i>	<i>Papilionaceae</i>	Europa e Oriente Médio	Trifolieae	trevo vesiculoso, trevo yuchi	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	2050

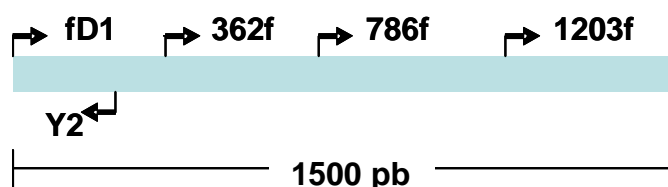
<sup>a</sup> MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento)

<sup>b</sup> ILDIS (International Legume Database & Information Service)

<sup>c</sup> USDA (United States Department Of Agriculture)

### 3.5 SEQÜENCIAMENTO DO GENE RIBOSSOMAL 16S

As reações de seqüenciamento foram realizadas com o uso de cinco *primers*: fD1, Y2 (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991) e os *primers* desenhados pelo Prof. Leonardo M. Cruz (Dept. de Bioquímica, UFPR, Curitiba, PR, Brazil) e utilizados por Menna et al., (2006): 362f (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-3'), 786f (5'-CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3') e 1203f (5'-GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC-3'). As reações foram realizadas em microplacas (96-well-full-skirt-PCR), utilizando 2 µL do produto de PCR purificado, 3 µL de *dye* (DYEnamic ET terminator reagent premix for the MegaBACE, Amersham Biosciences) e 3 pmol de *primer*. Para cada amostra analisada realizou-se cinco reações distintas para cada *primer* (Figura 3), gerando fragmentos de aproximadamente 500 pb (tamanho da leitura obtida no equipamento MegaBACE). As condições de reação foram realizadas de acordo com Menna et al., (2006).



**Figura 3** – Esquema do gene rRNA 16S e a posição dos iniciadores (*primers*).

Posteriormente, para obtenção do DNA purificado, foi feita a precipitação das reações, com 2 µL de acetato de amônio estéril (7,5 M) e 65 µL de etanol a 99,5% (temperatura ambiente), as amostras, então, foram homogeneizadas, centrifugadas a 4.000 rpm por 45 min e o sobrenadante foi descartado. Após a secagem, o *pellet* foi purificado com 150 µL de etanol a 70%, homogeneizado, centrifugado a 4.000 rpm por 10 min e descartado. O excesso de etanol foi retirado por centrifugação a 300 rpm, por 30 s, com a placa invertida e, então, seca a 37 °C por 15 min. O *pellet* foi ressuspensão em 7 µL de água ultra pura (deionizada e autoclavada) e submetido à análise de seqüenciamento no MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences). Os parâmetros de eletroforese usados,

de um modo geral, foram: voltagem de injeção da amostra, 2 kV; tempo de injeção, 60 s; voltagem de corrida, 5 kV; tempo de corrida, 300 min.

As seqüências de alta qualidade obtidas pela reação dos cinco *primers* foram agrupadas em uma única seqüência formando um *contig*, através dos programas Phred (EWING, GREEN, 1998; EWING, et al., 1998), Phrap (www.phrap.org) e Consed (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). As seqüências obtidas (3'-5') foram submetidas ao banco de dados GenBank (NCBI) para verificar a similaridade com o seqüenciamento de outros microrganismos.

### 3.6 CONSTRUÇÃO DA FILOGENIA

A árvore filogenética foi gerada pelo programa MEGA versão 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004) utilizando o alinhamento múltiplo das seqüências obtidas, neste estudo, bem como de seqüências das estirpes tipo e de outras estirpes depositadas no banco de dados GenBank. Onde, a escolha das estirpes tipos foi baseada no resultado obtido pela submissão das seqüências ao banco de dados GenBank (NCBI). O alinhamento foi realizado pelo programa CLUSTAL X, versão 1.83 (THOMPSON et al., 1997).

As estirpes tipos escolhidas como suporte, para análise filogenética, foram (número do depósito no GenBank entre parênteses): *Azorhizobium caulinodans* USDA 4892<sup>T</sup> (X67221); *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76<sup>T</sup> (U35000); *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6<sup>T</sup> (U69638); *Bradyrhizobium liaoningense* LYG10<sup>T</sup> (AF208513); *Bradyrhizobium* sp. Aust13C (AY603956); *Burkholderia cepacia* ATCC 53867<sup>T</sup> (AY741356); *Mesorhizobium amorphae* RCAN13 (DQ022832); *Mesorhizobium ciceri* USDA 3383<sup>T</sup> (U07934); *Mesorhizobium loti* USDA 3471<sup>T</sup> (X67229); *Mesorhizobium* sp. NH14 (AB196496.1); *Mesorhizobium tianshanense* USDA 3592<sup>T</sup> (AF041447); *Methylobacterium nodulans* ORS 2060<sup>T</sup> (AF220763); *Methylobacterium* sp. SKJH1 (AY741724.1); *Rhizobium etli* CFN 42<sup>T</sup> (U28916); *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup> (U29386); *Rhizobium mongolense* USDA1844<sup>T</sup> (U89817); *Rhizobium* (=Agrobacterium) *rhizogenes* 163C (AY206687.1); *Rhizobium* (=Agrobacterium) *rhizogenes* ATCC 11325<sup>T</sup> (AY945955.1); *Rhizobium tropici* CIAT 899<sup>T</sup> (U89832); *Sinorhizobium* (=Ensifer) *fredii* USDA 205<sup>T</sup> (X67231);

*Sinorhizobium* (= *Ensifer*) *meliloti* USDA 1002<sup>T</sup> (X67222). A espécie *Methanococcus maripaludis* C6 (U38487) foi usada como “outgroup” (grupo de referência). Todas as seqüências foram obtidas a partir do banco de dados de seqüências, GenBank (NCBI, 2008).



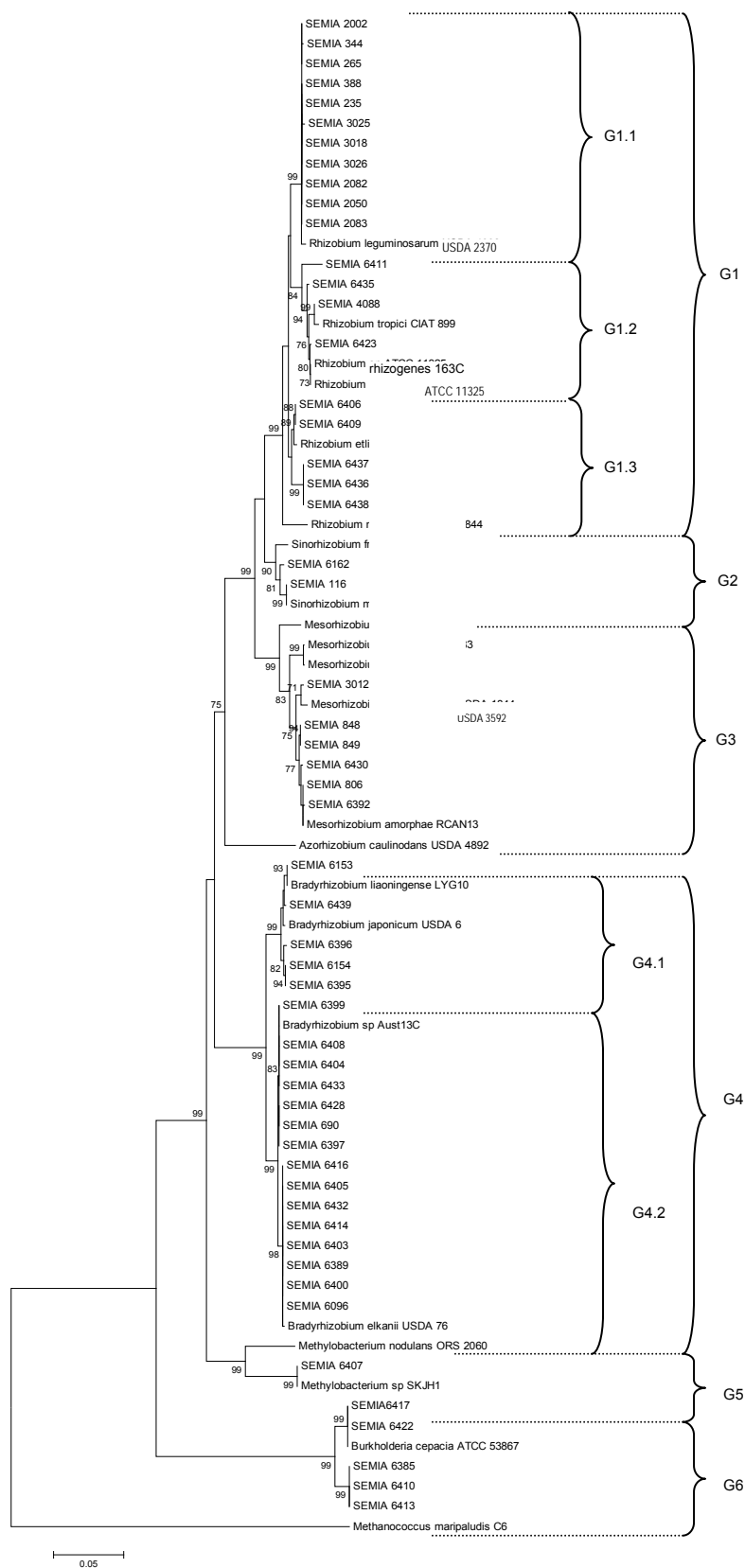
## 4 RESULTADOS

As seqüências parciais do gene RNAr 16S foram processadas pelos programas Phred, Phrap e Consed, em sistema operacional Linux, para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20), alinhamento e edição das seqüências. Esse processamento gerou um consenso de alta qualidade para o gene completo de cada estirpe SEMIA (EWING; GREEN, 1998; GORDON et al., 1998).

Com o alinhamento das seqüências, foi possível construir a árvore filogenética, apresentada na Figura 4, que possibilitou a proposta de classificação em nível de gênero e, para a grande maioria das bactérias, com fortes indicações da espécie (Tabela 2). A classificação em nível de espécie foi apenas proposta considerando identidade elevada de bases. Para valores inferiores a 1,03% de diferença entre os nucleotídeos, foi definida a espécie e, para valores superiores, foi utilizada a designação “sp” após o gênero (MENNA et al., 2006).

As 54 estirpes foram agrupadas em seis grandes grupos filogenéticos ou “clusters”, podendo, ainda, haver indicação de alguns subgrupos ou “subclusters” (Figura 4). O primeiro grupo filogenético (G1), reuniu 20 estirpes SEMIA com espécies de *Rhizobium*, com suporte *bootstrap* bastante elevado, de 99%. Nesse primeiro grupo (G1) houve a formação de três subgrupos. O primeiro subgrupo (G1.1), agrupou 11 estirpes SEMIAs com a estirpe tipo *R. leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup>, com suporte *bootstrap* de 99% (Figura 4a). As 11 estirpes apresentaram alta similaridade, com diferença de nucleotídeos inferior a 1,03% (Tabela 2). Essas são recomendadas para culturas de *Trifolium*, *Lens* e *Lathyrus*, mais adaptadas a regiões subtropicais e temperadas e todas da mesma subfamília, *Papilionaceae* (Tabela 1).

No subgrupo G1.2, foram agrupadas quatro estirpes SEMIA com a estirpe *R. tropici* CIAT 899<sup>T</sup>, bem como, com as estirpes *R. rhizogenes* 163C e ATCC 11325<sup>T</sup>, previamente classificada como *Agrobacterium* (Figura 4b).

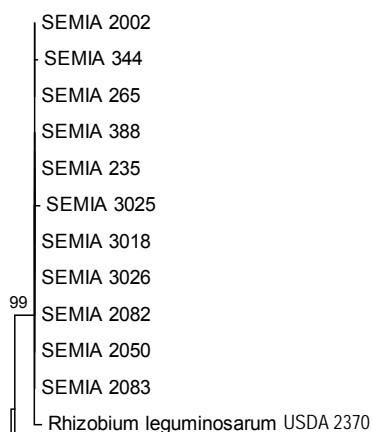


**Figura 4** – Árvore filogenética, construída com as seqüências do gene ribossomal 16S das estirpes tipo (item 3.6, p.29) e de 54 estirpes de rizóbios, oficialmente recomendadas para o uso em inoculantes comerciais brasileiros para 47 leguminosas. A árvore filogenética foi gerada usando MEGA versão 3.1, parâmetros, distância modelo - K2P e algoritmo Neighbor-Joining.

**Tabela 2** – Análise morfológica, identidade e porcentagem de nucleotídeos distintos (ND) e proposta de classificação taxonômica para as estirpes de rizóbios deste estudo

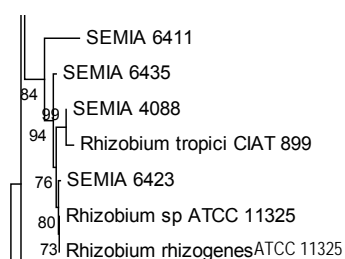
SEMIAS	Crescimento	Reação em meio YMA	Identidade (Acesso "GeneBank")	DN(%) <sup>a</sup>	Taxonômia proposta
S-235	Intermediário	Ácido	1254/1259 (U29386)	0,40	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
S-265	Rápido	Ácido	1418/1423 (U29386)	0,35	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
S-344	Intermediário	Ácido	1369/1381 (U29386)	0,87	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
S-388	Rápido	Ácido	1417/1423 (U29386)	0,42	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
S-2002	Rápido	Ácido	1418/1423 (U29386)	0,35	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
S-3025	Intermediário	Ácido	1416/1423 (U29386)	0,49	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
S-2050	Rápido	Ácido	1343/1348 (U29386)	0,37	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
S-2082	Rápido	Ácido	1366/1372 (U29386)	0,44	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
S-2083	Rápido	Ácido	1418/1423 (U29386)	0,35	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
S-3018	Rápido	Ácido	1366/1372 (U29386)	0,44	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
S-3026	Rápido	Ácido	1418/1423 (U29386)	0,35	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
S-6411	Rápido	Ácido	1368/1410 (U89832)	2,98	<i>Rhizobium sp.</i>
S-6435	Rápido	Ácido	1453/1476 (U89832)	1,56	<i>Rhizobium sp.</i>
S-4088	Rápido	Ácido	1463/1476 (U89832)	0,88	<i>Rhizobium tropici</i>
S-6423	Rápido	Ácido	1389/1391 (AY945955.1)	0,14	<i>Rhizobium rhizogenes</i>
S-6406	Intermediário	Neutro	1450/1454 (U28916)	0,28	<i>Rhizobium etli</i>
S-6409	Intermediário	Alcalino	1409/1413 (U28916)	0,28	<i>Rhizobium etli</i>
S-6436	Rápido	Ácido	1386/1421 (U28916)	2,46	<i>Rhizobium sp.</i>
S-6437	Intermediário	Ácido	1386/1421 (U28916)	2,46	<i>Rhizobium sp.</i>
S-6438	Intermediário	Ácido	1386/1421 (U28916)	2,46	<i>Rhizobium sp.</i>
S-116	Rápido	Ácido	1383/1384 (X67222)	0,07	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
S-6162	Rápido	Neutro	1422/1437 (X67222)	1,04	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
S-3012	Lento	Ácido	1468/1476 (DQ022832)	0,54	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>
S-848	Intermediário	Ácido	1472/1477 (DQ022832)	0,34	<i>Mesorhizobium amorphae</i>
S-849	Lento	Ácido	1118/1125 (DQ022832)	0,62	<i>Mesorhizobium amorphae</i>
S-6430	Intermediário	Neutro	1468/1476 (DQ022832)	0,54	<i>Mesorhizobium amorphae</i>
S-806	Lento	Ácido	1475/1475 (DQ022832)	0,00	<i>Mesorhizobium amorphae</i>
S-6392	Intermediário	Ácido	1474/1479 (DQ022832)	0,34	<i>Mesorhizobium amorphae</i>
S-6153	Intermediário	Alcalino	1421/1424 (U69638)	0,21 <sup>b</sup>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
S-6439	Intermediário	Alcalino	1411/1425 (U69638)	0,98 <sup>b</sup>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
S-6154	Intermediário	Alcalino	1409/1422 (U69638)	0,91	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
S-6396	Rápido	Alcalino	1400/1411 (U69638)	0,78	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
S-6395	Intermediário	Alcalino	1459/1475 (U69638)	1,08	<i>Bradyrhizobium sp</i>
S-6096	Intermediário	Alcalino	1432/1436 (U35000)	0,28	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6389	Intermediário	Neutro	1474/1479 (U35000)	0,34	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6400	Intermediário	Alcalino	1474/1479 (U35000)	0,34	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6403	Intermediário	Alcalino	1443/1448 (U35000)	0,35	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6405	Intermediário	Neutro	1475/1479 (U35000)	0,27	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6414	Intermediário	Alcalino	1475/1479 (U35000)	0,27	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6416	Intermediário	Alcalino	1417/1420 (U35000)	0,21	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6428	Intermediário	Alcalino	1407/1416 (U35000)	0,64	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6432	Intermediário	Alcalino	1421/1427 (U35000)	0,42	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-690	Intermediário	Neutro	1471/1479 (U35000)	0,54	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6397	Intermediário	Alcalino	1471/1479 (U35000)	0,54	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6399	Intermediário	Alcalino	1471/1479 (U35000)	0,54	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6404	Intermediário	Alcalino	1460/1468 (U35000)	0,54	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6408	Intermediário	Alcalino	1415/1422 (U35000)	0,49	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6433	Intermediário	Alcalino	1471/1479 (U35000)	0,54	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
S-6407	Rápido	Alcalino	1310/1390 (AF220763)	5,76	<i>Methylobacterium sp.</i>
S-6385	Intermediário	Alcalino	1327/1356 (AY741356)	2,14	<i>Burkholderia sp</i>
S-6410	Intermediário	Alcalino	1378/1413 (AY741356)	2,48	<i>Burkholderia sp</i>
S-6413	Rápido	Alcalino	1378/1413 (AY741356)	2,48	<i>Burkholderia sp</i>
S-6417	Rápido	Ácido	1413/1413 (AY741356)	0,00	<i>Burkholderia cepacia</i>
S-6422	Rápido	Neutro	1377/1378 (AY741356)	0,07	<i>Burkholderia cepacia</i>

<sup>a</sup> DN (diferença entre nucleotídeos): porcentagem obtida pela comparação entre a seqüência analisada e a seqüência da estirpe tipo mais próxima na árvore filogenética. <sup>b</sup> Porcentagem obtida pela comparação entre a seqüência analisada e a seqüência padrão de *B. japonicum*.



**Figura 4a** – Grupo filogenético G1.1.

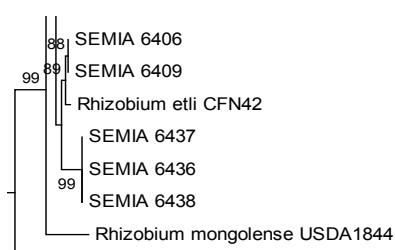
A estirpe SEMIA 6411 ficou mais distante neste grupo, tendo uma diferença entre nucleotídeos de 2,98% (Tabela 2) em relação a *R. tropici*, assim como a SEMIA 6435, com 1,56%; desta forma, foi proposta a classificação dessas estirpes como *Rhizobium* sp. As SEMIAs 6411 e 6435 foram isoladas de *Clitoria fairchildiana* e *Gliricida sepium*, respectivamente (Tabela 1). A SEMIA 4088, recomendada para *Phaseolus vulgaris*, apresentou alta similaridade (DN = 0,88%) com *R. tropici* (Tabela 2). Já a SEMIA 6423, recomendada para *Calliandra callothyrsus* e *C. surinamensis* (Tabela 1), foi agrupada com *R. rhizogenes* ATCC 11325<sup>T</sup>, com suporte *bootstrap* de 80% (Figura 4b) e diferença de nucleotídeos de 0,14% (Tabela 2).



**Figura 4b:** Grupo filogenético G1.2.

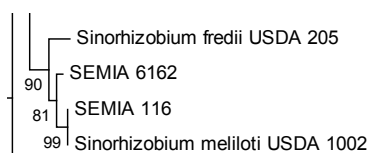
O terceiro subgrupo (G1.3) foi formado por cinco estirpes agrupadas com a estirpe tipo de *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>, contudo, com suporte *bootstrap* bastante baixo, de 35%. As SEMIAs 6406 e 6409 apresentaram alta similaridade com a estirpe tipo (Tabela 2), com suporte *bootstrap* de 88% (Figura 4c), dando suporte à classificação para *R. etli*. Essas estirpes são recomendadas para *Pithecellobium*

*tortum* e *Pseudosamanea guachapele*, respectivamente, da subfamília *Mimosoideae* (Tabela 1). As demais estirpes deste grupo, as SEMIAs 6436, 6437 e 6438, apresentaram alta similaridade entre si, com suporte *bootstrap* de 99% (Figura 4c), porém, com diferença maior que 1,03% nas bases (Tabela 2), em comparação com a estirpe tipo. Foi sugerida, então, a classificação como *Rhizobium* sp. para essas estirpes, sendo a estirpe SEMIA 6436 recomendada para *Acácia farnesiana* (subfamília, *Mimosoideae*), e as estirpes SEMIA 6437 e 6438 e para *Adesmia latifolia*, para as seguintes, da subfamília *Papilionaceae* (Tabela 1).



**Figura 4c** – Grupo filogenético G1.3.

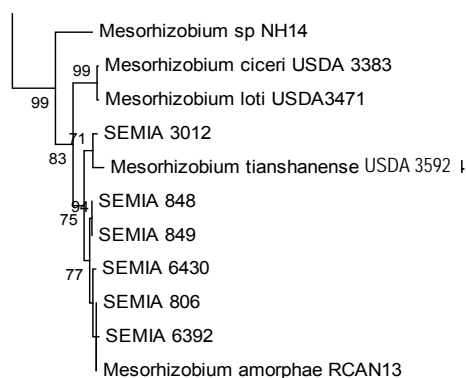
O segundo grupo (G2) formado inclui as estirpes tipo, *Sinorhizobium meliloti* USDA 1002<sup>T</sup> e *S. fredii* USDA 205<sup>T</sup>, juntamente com as SEMIAs 116 e 6162, com suporte *bootstrap* 90% (Figura 4d). As duas estirpes SEMIAs, apresentaram alta similaridade com a estirpe *Sinorhizobium meliloti*, suportando essa classificação filogenética (Tabela 2). Essas duas estirpes são recomendadas para distintas espécies, a primeira para *Medicago sativa*, subfamília *Papilionaceae* e a segunda para *Prosopis juliflorae* *Leucaena diversifolia*, da subfamília *Mimosoideae* (Tabela 1).



**Figura 4d** – Grupo filogenético G2.

O terceiro grupo (G3) agrupou seis estirpes com espécies do gênero *Mesorhizobium* e com suporte *bootstrap* de 99% (Figura 4e). Nesse grupo, a estirpe *M. tianshanense* USDA 3592<sup>T</sup> foi agrupada com a SEMIA 3012, isolada de *Pisum*

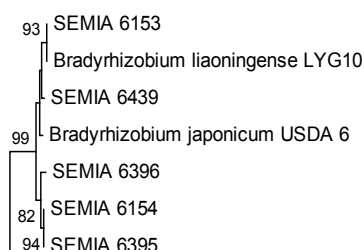
*sativum* (Tabela 1), com suporte *bootstrap* de 71% (Figura 4e). A SEMIA 3012 apresentou alta identidade com a estirpe tipo, suportando a classificação filogenética como *M. tianshanense* (Tabela 2). As outras cinco estirpes desse grupo se agruparam com a estirpe tipo, *M. tianshanense*, com suporte *bootstrap* de 83% (Figura 4e), porém, filogeneticamente ficaram mais próximas da *Mesorhizobium amorphae* RCAN13, e apresentaram alta identidade, suportando a classificação filogenética como *M. amorphae*. As SEMIAS desse grupo são recomendadas para *Acacia* e, também, para *Lotus* e *Chamaecrista* (Tabela 1), com exceção da SEMIA 3012.



**Figura 4e** – Grupo filogenético G3.

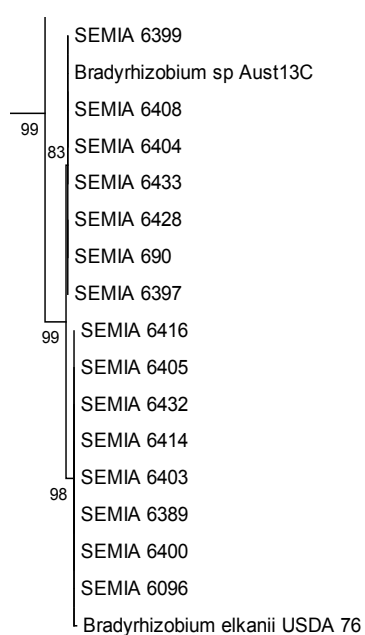
O quarto grupo (G4) incluiu espécies do gênero *Bradyrhizobium*, com suporte *bootstrap* bastante elevado, de 99% (Figura 4) e formação de alguns subgrupos. O primeiro (G4.1), reuniu cinco estirpes com as padrões *B. liaoningense* LYG10<sup>T</sup> e *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> e com suporte *bootstrap* de 99% (Figura 4f). As SEMIAS 6153 e 6439, isoladas respectivamente dos gêneros *Leucaena leucocephala* e *Arachis pintoii* (Tabela 1), das subfamílias, *Mimosoideae* e *Papilionaceae*, apresentaram diferença entre nucleotídeos inferior a 1,03%, suportando a classificação filogenética para *B. japonicum*. Apesar das SEMIAS 6153 e 6439 terem apresentado alta similaridade com *B. liaoningense*, o crescimento dessa espécie é extra-lento (XU *et. al.*, 1995) porém, essas SEMIAS apresentaram crescimento intermediário (Tabela 2). A SEMIA 6154, isolada de *Stylosanthes* sp. da subfamília *Papilionaceae* e a SEMIA 6396, isolada de *Balizia pedicellaris*, da subfamília *Mimosoideae* (Tabela 1), apresentaram alta similaridade com a estirpe padrão de *B. japonicum* (USDA 6<sup>T</sup>). No entanto, a SEMIA 6395, microsimbionte das

espécies *Calliandra callothyrsus* e *C. surinamensis*, da subfamília *Mimosoideae* (Tabela 1), apresentou diferença entre nucleotídeos igual a 1,08% com a estirpe tipo (Tabela 2). Desta forma, as SEMIAs 6154 e 6396 suportam a classificação como *B. japonicum* e a SEMIA 6395, como *Bradyrhizobium* sp.



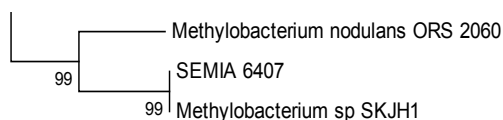
**Figura 4f** – Grupo filogenético G4.1.

O segundo subgrupo do quarto grupo (G4.2), com suporte *bootstrap* bastante elevado, de 99% (Figura 4g), uniu quinze estirpes com a estirpe tipo de *B. elkani*, USDA 76<sup>T</sup> e com a estirpe *Bradyrhizobium* sp. Aust13C, isolada de *Acacia mangium*. Todas apresentaram alta similaridade com a estirpe tipo, suportando a classificação como *B. elkani* (Tabela 2). Essas SEMIAs são recomendadas para uma grande variedade de leguminosas, onde três (20%) pertencem à subfamília *Papilionaceae* e 11 (73%) à subfamília *Mimosoideae* e, dentro desta subfamília, quatro são do gênero *Acácia* (Tabela 1).



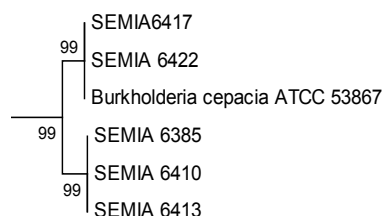
**Figura 4g** – Grupo filogenético G4.2.

O quinto grupo (G5) formado agrupou a estirpe SEMIA 6407, isolada de *Pithecellobium tortum*, da subfamília *Mimosoideae* (Tabela1), com a estirpe tipo de *Methylobacterium nodulans* ORS 2060<sup>T</sup> e com a estirpe SKJH-1 de *Methylobacterium* sp., com suporte *bootstrap* de 99% (Figura 4h). A SEMIA 6407 apresentou diferença entre nucleotídeos, em relação à estirpe tipo, igual a 5,76%, o que indica que pode ser classificada como *Methylobacterium* sp. (Tabela 2).



**Figura 4h** – Grupo filogenético G5.

O sexto e último agrupamento (G6) incluiu cinco estirpes e a tipo *Burkholderia cepacia* ATCC 53867<sup>T</sup> com suporte *bootstrap* de 99% (Figura 4i). As SEMIAs 6417 e 6422 se agruparam com a estirpe tipo com suporte *bootstrap* elevado, de 99%, e apresentaram alta similaridade, sustentando a classificação filogenética para *B. cepacia* (Tabela 2). Já as SEMIAs 6385, 6410 e a 6413 ficaram próximas entre si, com suporte *bootstrap* de 99% (Figura 4), porém, se distanciaram da estirpe tipo, apresentando diferença entre nucleotídeos superior a 1,03% (Tabela 2), sustentando a classificação para *Burkholderia* sp. Ambas as SEMIAs, classificadas como *B. cepacia*, SEMIAs 6417 e 6422 nodulam *Mimosa flocculosa*, da subfamília *Mimosoideae*. A SEMIA 6385, nodula *Piptadenia gonoacantha* e a SEMIA 6410, nodula *Mimosa caesalpinifolia*, da subfamília *Mimosoideae*, enquanto que a SEMIA 6413, nodula *Dalbergia nigra* da subfamília *Papilionaceae*.



**Figura 4** – Grupo filogenético G6



## 5 DISCUSSÃO

O aumento da produtividade e a sustentabilidade das leguminosas estão diretamente relacionados ao processo de fixação biológica do N<sub>2</sub>. Isso ocorre pela importância do nitrogênio (N) para o crescimento das plantas, mas que pode ser limitado pelo custo elevado dos fertilizantes nitrogenados que, além disso, podem resultar em poluição do meio ambiente. Contudo, limitações intrínsecas à planta hospedeira e aos rizóbios ou, ainda, limitações ambientais, podem afetar diretamente a capacidade de FBN (VARGAS; HUNGRIA, 1997). Onde há baixos níveis de matéria orgânica no solo, como nos trópicos, a situação é ainda mais crítica, pelo empobrecimento do solo e pelo alto custo dos fertilizantes, aumentando a importância da FBN. Desse modo, projetos de coleções de culturas são necessários não só para a preservação do material genético, mas também por oferecerem uma oportunidade importante para o desenvolvimento de estudos que permitam a elucidação dos mecanismos de FBN e suas aplicações tecnológicas, bem como para a identificação de linhagens elite para cada leguminosa de interesse. Com o propósito de manter as estirpes, que já estão sendo recomendadas e distribuídas como inoculante nas indústrias, foi criada, em 1985, pelo centro microbiano “Resources Network” (MIRCEN) a “Coleção de Culturas de Rizóbios Brasileiros” (SEMIA), que se encontra na FEPAGRO/MIRCEN (MENNA et al., 2006). No entanto, a caracterização genética e a taxonomia das estirpes que compõem a coleção SEMIA ainda não estão suficientemente elucidadas.

Hoje, as estirpes denominadas como SEMIA são classificadas como: *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *Bradyrhizobium* sp., *R. fredii*, ou *R. loti* (FEPAGRO, 1999) com base, exclusivamente, na sua capacidade de neutralizar o meio YMA e na relação com a planta hospedeira. Neste trabalho, foi feita a análise filogenética de 54 estirpes SEMIA com base no seqüenciamento do 16S rRNA, por ser o gene escolhido para classificação e filogenia de bactérias, em nível de gênero (BRENNER; STALEY; KRIEG, 2001; WEISBURG et al., 1991), capaz de inferir a história evolucionária das estirpes analisadas.

Com o seqüenciamento desse gene, foi possível agrupar as bactérias e observar, em várias delas, diferenças na classificação em relação à da

FEPAGRO, que se baseava em características fenotípicas e na especificidade hospedeira. Das 54 estirpes estudadas, 20 foram agrupadas com as estirpes tipo do gênero *Rhizobium* e 20 com o gênero *Bradyrhizobium*, representando 74% das estirpes do trabalho. As demais foram classificadas nos gêneros: *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium* e *Burkholderia*. Comparando a classificação proposta neste trabalho, com a proposta pela FEPAGRO, observaram-se diferenças importantes: 33% das estirpes diferiram quanto à classificação proposta pela FEPAGRO, 24% foram iguais e 43% foram iguais somente em nível de gênero. Também é importante salientar que foram obtidos fortes indicativos de descrição de 10 novas espécies, dentro dos seguintes gêneros (número de espécies): *Rhizobium* (5), *Bradyrhizobium* (1), *Methylobacterium* (1) e *Burkholderia* (3).

No que se refere à planta hospedeira, observou-se que uma mesma estirpe pode nodular várias espécies, como já havia sido observado por Menna et al. (2006), sem nenhum indício de correlação evolutiva com as plantas hospedeiras. Como exemplo, as SEMIAs do primeiro subgrupo do primeiro grupo (G1.1) nodulam diferentes culturas, como, *Trifolium*, *Lens* e *Lathyrus*, da subfamília *Papilionaceae*, e a classificação sugerida, para as 11 estirpes SEMIAs, foi *R. leguminosarum*. A classificação como *R. leguminosarum* foi sugerida pela alta identidade com a estirpe tipo, *R. leguminosarum* USDA 2370<sup>T</sup>, e coincidiu com a taxonomia proposta por FEPAGRO.

No segundo subgrupo (G1.2) foi posicionada a espécie *R. tropici*, que inclui estirpes recomendadas comercialmente para a cultura do feijoeiro (HUNGRIA et al., 2000; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003). Como já reportado (PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007), neste estudo a SEMIA 4088 foi agrupada com *R. tropici*, que fica agrupada com *R. rhizogenes*, antiga *Agrobacterium*. Ainda neste subgrupo (G1.2), há indícios de novas espécies, a SEMIA 6411 e a SEMIA 6435, relacionadas, respectivamente, às culturas (subfamília e tribo): *Clitoria fairchildiana* (*Papilionaceae*, Phaseoleae) e *Gliricidia sepium* (*Papilionaceae*, Robinieae). Inicialmente, essas estirpes foram classificadas, com base em características fenotípicas, como *Bradyrhizobium* sp. (Tabela 1), mas neste estudo, com base no RNAr 16S, foram classificadas no gênero *Rhizobium*.

Ainda neste primeiro grupo, no terceiro subgrupo (G1.3) foi posicionada a espécie *R. etli*, espécie que é relatada como a principal espécie simbiótica do feijoeiro nos centros de origem desta leguminosa: Mesoamérica

(MARTÍNEZ-ROMERO, 2003; SEGOVIA; YOUNG; MARTÍNEZ-ROMERO, 1993) e Região Andina, tanto no norte (BERNAL; GRAHAM, 2001), como no noroeste da Argentina (AGUILAR et al., 1998), considerado um centro secundário de origem dessa leguminosa (SINGH; GEPTS; DEBOUCK, 1991). No entanto, estudos recentes indicam uma ampla distribuição de estirpes de *R. etli* associadas com o feijoeiro no Brasil (GRANGE; HUNGRIA, 2004) e, neste estudo, a espécie também foi associada às leguminosas *Pithecellobium tortum* (subfamília – Mimosoideae, tribo – Ingeae) e *Pseudosamanea guachapele*, da mesma subfamília e tribo, nativas do Brasil (Tabela 1). Nesse agrupamento, há indícios de novas espécies de *Rhizobium*, as SEMIAs 6437, 6436 e 6438, onde a 6436 nodula uma leguminosa pertencente à subfamília *Mimosoideae*, e as demais leguminosas da subfamília *Papilionaceae*. As estirpes desse grupo, por características fenotípicas, haviam sido classificadas, anteriormente, no gênero *Bradyrhizobium*.

Confirmamos neste trabalho, no segundo grupo (G2), a classificação da estirpe SEMIA 116 que, segundo características fenotípicas e de inoculação cruzada havia sido, anteriormente, denominada como *S. meliloti*. Essa estirpe tem sido reconhecida pela interação com cultivares da alfafa (*Medicago sativa*) com alta eficiência de FBN (KOLLING; SCHOLLES; SELBACH, 1983). A cultura da alfafa é importante para a produção animal, por sua alta qualidade nutritiva, alto potencial de produção e possibilidade de sucesso na FBN (OLIVEIRA et al., 1999). A SEMIA 6162, por características fenotípicas, havia sido classificada no gênero *Bradyrhizobium*, e neste trabalho propõe-se a classificação para *S. meliloti*.

O terceiro grupo (G3) agrupou as espécies do gênero *Mesorhizobium*, onde foi sugerida a classificação como *M. tianshanense* para as SEMIAs 3012, e para as SEMIAs 848, 849, 6430, 806 e 6392, sugerida a classificação como *M. amorphae*. A espécie de rizóbio, *M. tianshanense*, foi isolada, pela primeira vez, de leguminosas utilizadas na medicina chinesa ou para adubação verde, na República Popular da China e as estirpes crescem bem em solos salinos alcalinos e são muito resistentes à seca (CHEN, et al. 1995). E a estirpe de *M. amorphae* é muito eficaz na FBN para a leguminosa *Amorpha fruticosa*, originada da América do Norte e introduzida à China para cobertura do solo e controle de erosão (Wang et al. 1999).

A classificação proposta, nesse grupo, se distancia da classificação por características fenotípicas e de especificidade com a planta hospedeira. Onde, a

SEMIA 3012 era classificada como *Rhizobium leguminosarum*, as SEMIAs 806, 848 e 849, como *Mesorhizobium loti* e a SEMIA 6392 e 6430 como *Bradyrhizobium* sp. Confirmando o distanciamento entre as classificações, a tradicional e a usada nesse trabalho, segundo o seqüenciamento do gene RNAr 16S (Tabela1),.

O grupo (G4) seguinte, um dos dois maiores, agrupou estirpes de *Bradyrhizobium*, que foram associadas a uma grande variedade de espécies, demonstrando uma alta promiscuidade das estirpes desse gênero. Das 20 estirpes, 15 foram classificadas como *B. elkanii*, quatro como *B. japonicum* e uma como *Bradyrhizobium* sp. Segundo características fenotípicas, as estirpes desse grupo haviam sido classificadas nesse mesmo gênero. Foi confirmada neste trabalho, portanto, a classificação da maioria das estirpes em nível de espécie e com indicativo de uma nova espécie, a SEMIA 6395, recomendada para a cultura da *Calliandra callothyrsus* (Tabela1).

No grupo 6 (G6), foram encontrados estirpes do gênero *Burkholderia*, que eram classificadas anteriormente no gênero *Bradyrhizobium* (Tabela 1). As estirpes do gênero *Burkholderia* pertencem às  $\beta$ -proteobactérias, descritas como apresentando a capacidade de nodular leguminosas (CHEN et al., 2003; MOULIN et al., 2001). Além disso, burkholderias também foram encontradas em uma análise de outras estirpes da Coleção de Culturas SEMIA, por Menna et al. (2006). Todas as estirpes desse grupo estão associadas à subfamília *Mimosoideae*, com exceção da SEMIA 6413, associada à *Papilionaceae*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que a caracterização genética e a taxonomia das estirpes que compõem a coleção SEMIA, ainda não estão suficientemente elucidadas, este trabalho, em conjunto com outros, é indispensável para o reconhecimento de cada uma das estirpes comerciais. Tornando-se essencial para o controle dos inoculantes, que pela legislação brasileira, devem carregar exclusivamente essas estirpes recomendadas pela pesquisa. E o uso da filogenia é indispensável para definir a classificação taxonômica dessas estirpes, por ser mais próxima da real.

A análise conjunta da morfo-fisiologia das estirpes e da árvore filogenética, permitiu uma classificação de consenso. Assim foi possível, inferir as relações filogenéticas e determinar a classificação taxonômica das 54 estirpes comerciais da “Coleção de Culturas SEMIA”. Ainda, baseado neste estudo, há possibilidade da descrição de 10 novas espécies, o que amplia o reconhecimento da biodiversidade.

O conhecimento da biodiversidade é de caráter importantíssimo para a economia brasileira, representando o capital básico para qualquer atividade produtiva, seja através da sua exploração direta, seja através da utilização dos benefícios e serviços indiretos. Nesse contexto, o seqüenciamento do gene ribossomal 16S torna-se uma ferramenta útil para o conhecimento e estimativa da diversidade de rizóbios no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- AGUILAR, O.M., LÓPEZ, M.V., RICCILO, P.M., GONZÁLEZ, R.A., PAGANO, M., GRASSO, D.H., PÜHLER, A., FAVELUKES, G. Prevalence of the *Rhizobium-etli* like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. **Applied Environmental and Microbiology**, Washington, v.64, p.3520-3524, 1998.
- BERNAL, G., GRAHAM, P. H. Diversity of the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. **Canadian Journal of Microbiology**, Othawa, v.47, p.526-534, 2001.
- BRENNER, D.J.; STALEY, J.T.; KRIEG, N.R. Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In: BOONE, D.R., CASTENHOLZ, R.W. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer-Verlag, 2001. p.27-32
- BREWEN, N. Plant cell wall remodelling in the rhizobium–legume symbiosis. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Palo Alto, v.23, p.293-316, 2004.
- BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.46, p.219-252, 1992.
- CAMPANHOLA, C. **Biodiversidade e oportunidade para a agricultura**. Disponível em: <[http://www.radiobras.gov.br/ct/artigos/1998/artigo\\_240798.htm](http://www.radiobras.gov.br/ct/artigos/1998/artigo_240798.htm)>. Acesso em: 03 de dezembro de 2007.
- CARRARO, D.M.; KITAJIMA, J.P. Seqüenciamento e bioinformática de genomas Bacterianos, **Biociência**, Brasília, v.28, p.16-20, 2002.
- CHEN, W.; WANG, E.; WANG, S.; LI, Y.; CHEN, X.; LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a Moderately and Slowly Growing Root Nodule Bacterium Isolated from an Arid Saline Environment in Xinjiang, People's Republic of China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.153–159, 1995.
- CHEN, W.M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOVIN-MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by  $\beta$ -Proteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.185, p.7266-7272, 2003.

CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.393-397, 1998.

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

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS M.D.; DREYFUS B.; KERSTERS K.; GILLIS M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.715-733, 1994.

DE LAJUDIE, P.; LAURENTE-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixation bacteria nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.58, p.1277-1290, 1998.

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

DUPUY, N.C.; DREYFUS, B.L. *Bradyrhizobium* populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2415-2419, 1992.

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

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

FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária). **Culture collection catalogue**, 8<sup>th</sup> ed, FEPAGRO: Porto Alegre, 1999.

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

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

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

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

HOPKINS, W.G.; HÜNER, N.P.A. **Introduction to plant physiology**. 3ed. New York: John Wiley & Sons, 2004.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAÚJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997.

HUNGRIA, M.; BODDEY, L.H.; SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.27, p.393-399, 1998.

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

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

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M.F.; MENDES, I.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H.: Inoculant preparation, production and application, In: WERNER, D.; NEWTON, W. E. (eds.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment** Springer: Dordrecht, 2005.



HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: The success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K. (Eds.). **Nitrogen Nutrition in Plant Productivity**. Houston: Studium Press, LLC, 2006. p.43-93.

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

ILDIS (International Legume Database & Information Service). Disponível em: <<http://www.ildis.org/>>, acesso em: 25 de novembro de 2007.

INDGE, B. Nitrogen cycle. **Biological Sciences Review**, Manchester, v.13, p.25-27, 2000.

JARVIS, B.D.W.; PANKHURST, C.E.; PATEL, J.J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.32, p.378-380, 1982.

JORDAN, D.C.; ALLEN, O.N. Genus I. *Rhizobium*. In: BUCHAMAN, R.E.; GIBBONS, N.E. (Eds.) **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1974. p.262-264

JORDAN, D.C. Rhizobiaceae. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins Co, 1984.

KOLLING, J.; SCHOLLES, D.; SELBACH, P.A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para trevo subterrâneo, alfafa e cornichão. **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v.19, p.103-111, 1983.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v.5, p.150–163, 2004.

LAEREMANS, T.; VANDERLEYDEN, J. Review: Infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v.14, p.787-808, 1998.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO P. I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. São Paulo: Contexto, 2002.

LINDSTRÖM, K.; van BERKUM, P.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ, E.; NOVIKOVA, N.; JARVIS, B. Report from the roundtable on rhizobium taxonomy. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. (Eds.). **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

LLORET, L.; MARTINEZ-ROMERO, E. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**. Cuernavaca, v. 47, p.43-60, 2005.

LUDWIG, W.; KLENK, H. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. (eds). **Bergey's Manual of Systematics Bacteriology**. 2<sup>nd</sup> Berlin: Springer-Verlag, 2001. p.49-65

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; KLUGBAUER, S.; KLUGBAUER, N.; WEIZENEGGER, M.; NEUMAIER, J.; BACHLEITNER, M.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. **FEMS Microbiology Review**, München, v.15, p.155-73. 1994.

MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/>>, acesso em: 10 de janeiro de 2008.

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

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.11-20, 1994.

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**. The Netherlands, v.29, p. 315–332, 2006.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, The Netherlands, v. 73, p.121–132, 2002.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. **Nature**, London, v.411, p.948-950, 2001.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**, Wageningen, v.7, p.869-885, 1995.

NCBI (National Center Biotechnology Information) Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>, acesso em: 2008.

NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.511-522, 1994.

OLIVEIRA, P.P.A.; TSAI, S.M.; CORSI, M.; DÍAZ, M. del P. Interação entre cultivares, estirpes comerciais de rhizobium meliloti e fungicidas no incremento da produção de alfafa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p.425-431, 1999. Disponível em : <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v34n3/8665.pdf>> . Acesso em: 18 de abril de 2008.

PINTO, F.G.S.; HUNGRIA, M; MERCANTE, F.M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.39, p. 1851-1864, 2007.

RODICIO, M. del R.; MENDOZA, M. del C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Oviedo, v.22, p.81-87, 2004.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

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

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001.

SETTE, L.D.; VAZOLLER, R.F. **Área coleções microbiológicas**. Disponível em: <[http://www.sbmicrobiologia.org.br/col\\_cult\\_a1.htm](http://www.sbmicrobiologia.org.br/col_cult_a1.htm)>, acesso em: 03 de dezembro de 2007.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, New York, v.45, p.379-396, 1991.

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

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Documentos, 93, 1999.

TEREFEWOR, Z.; LORTET, G.; SUOMINEN, L.; LINDSTRÖM, K. Molecular evolution of interactions between rhizobia and their legume hosts. In: TRIPLETT, E.W. (ed.), **Prokaryotic nitrogen fixation a model system for analysis of a biological process**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2000. p.187-206

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.4876-7882, 1997.

USDA (United States Department Of Agriculture). Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/>>. Acesso em: 15 de novembro de 2007.

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

VARGAS, M.A.T; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. London: Blackwell Scientific, 1970.

WANG, E.T; VAN BERKUM, P.; SUI, X.H.; BEYENE, D.; CHEN, W.X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** (on line), v.49, p.51-65, 1999.

WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.697-703,1991.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Baltimore, v.51, p.221-271, 1987.

XU, L.M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.706–711, 1995.

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**, Washington, v.173, p.2271-2277, 1991.