

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**Filogenia de Rizóbios do Feijoeiro com Base no  
Sequenciamento do Gene 16S rRNA e na Análise de  
Sequenciamento Multilocus**

**Thiago Gonçalves Ribeiro**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**FILOGENIA DE RIZÓBIOS DO FEIJOEIRO COM BASE NO  
SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RRNA E NA ANÁLISE DE  
SEQUENCIAMENTO MULTILOCUS**

**THIAGO GONÇALVES RIBEIRO**

*Sob a Orientação do Professor*

**Ederson da Conceição Jesus**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico  
Ficha catalográfica elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G643f                      Gonçalves Ribeiro, Thiago 1988-  
                                 Filogenia de Rizóbios do Feijoeiro com base no  
sequenciamento do gene 16S rRNA e na Análise de  
Sequenciamento Multilocus / Thiago Gonçalves Ribeiro. -  
2017.  
                                 76 f.: il.

                                 Orientador: Ederson da Conceição Jesus.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Agronomia - Ciência do Solo,  
2017.

                                 1. Taxonomia. 2. Rhizobium. 3. MLSA. I. da Conceição  
Jesus, Ederson, 1979, orient. II. Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia - Ciência do Solo. III. Título.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.**

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA CIÊNCIA DO SOLO**

**THIAGO GONÇALVES RIBEIRO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** no Curso de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do solo, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/02/2017.

---

Ederson da Conceição Jesus. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Ricardo Luis Louro Berbara Dr. UFRRJ

---

Fatima Maria de Souza Moreira. Dra. UFLA

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus primeiramente, por se mostrar presente na minha vida todas os dias, me guiando e me permitindo vencer mais essa etapa.

A minha mãe, Berenice Gonçalves, pelo seu amor incondicional e por sempre me incentivar na minha busca de conhecimento, ajudando-me a permanecer resoluto em meu caminho.

Aos meus pais de criação e Célia Shizuko Hirata Nakamura e Reinaldo Nakamura, e minha irmã de criação, Adriane Hirata Nakamura, que sempre acreditaram em mim e serviram de exemplo para a minha vida.

Ao meu Orientador Ederson da Conceição Jesus, me dar às chaves do castelo de mundo inteiro de novos conhecimentos, sempre paciente, diante minhas dificuldades e sempre solícito para sanar minhas dúvidas. Mais que um apenas meu orientador, sou grato pela sua amizade.

A Fernanda Dourado, por que mesmo na correria de seu dia-dia, com seus afazeres sempre teve um momento pra me ajudar. Até mesmo em sua folga enquanto eu me desesperava no laboratório.

Aos meus amigos Wanderson, Marciano e Camila por me ajudaram nos momentos difíceis e pelos momentos felizes e memoráveis que amenizaram as adversidades cotidianas.

A Rural e ao Programa de pós graduação em agronomia - Ciências do solo pela oportunidade, por todo o suporte e excelente trabalho no ensinar.

A Faperj e a Embrapa pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

A Capes pela bolsa que me possibilitou cursar uma pós-graduação durante esses dois anos.

"Se tomarmos as pessoas como elas são, nós as tornamos piores. Se as tratarmos como se fossem o que deveriam ser, nós as ajudamos a se tornarem o que são capazes de ser."

Johann Wolfgang von Goethe

## RESUMO

RIBEIRO, Thiago Gonçalves. **Filogenia de Rizóbios do feijoeiro com base no sequenciamento do gene 16S rRNA e na análise de sequenciamento multilocus**. 2017. 63f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

A caracterização genotípica dos rizóbios é fundamental para sua definição taxonômica e para o conhecimento de sua biodiversidade. Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar uma coleção de 139 estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de feijoeiro e realizar inferências filogenéticas com base na análise de sequenciamento multilocus de modo a definir o seu posicionamento taxonômico. Essas estirpes foram isoladas de diferentes localidades do Brasil e do mundo e depositadas na coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas (CCBD) da EMBRAPA Agrobiologia. As ferramentas utilizadas foram a análise de BOX-PCR e a inferência filogenética com base em sequências dos genes 16S rRNA, *recA*, *dnaK* e *glnII*. A análise de BOX-PCR mostrou que existe uma grande diversidade genotípica entre as estirpes, com 63 grupos formados a 85% de similaridade. O sequenciamento do gene 16S rRNA revelou que 87% delas pertencem ao gênero *Rhizobium*, principalmente às espécies *R. phaseoli*, *R. laguerrae* e *R. tropici*. As árvores filogenéticas revelaram a existência de dois grandes clados: um deles foi formado pelo grupo *R. phaseoli*-*R. etli*-*R. leguminosarum* e o outro pelo *R. tropici* e espécies relacionadas. Os grupos formados nas árvores individuais de cada gene mostraram-se coesos, porém algumas estirpes apresentaram resultados incongruentes. O gene *recA* apresentou o maior número de sinais filogenéticos conflitantes indicando possível evento de recombinação entre as espécies, especialmente dentro do clado *R. phaseoli*-*R. etli*-*R. leguminosarum*.

**Palavras-chave:** Taxonomia. *Rhizobium*. MLSA.

## ABSTRACT

RIBEIRO, Thiago Gonçalves. **Phylogeny of bean rhizobia based on 16S rRNA Gene sequencing and multilocus sequencing analysis.** 2017. 63 p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The genotypic characterization of rhizobia is fundamental for their taxonomic definition and to improving knowledge about their biodiversity. In this context, the present work aimed to characterize a collection of 139 rhizobium strains isolated from common bean nodules and to make phylogenetic inferences based on multilocus sequencing analysis in order to define their taxonomic positioning. These strains were isolated from different locations in Brazil and worldwide, and deposited in the Culture Collection of Diazotrophic Bacteria (CCBD) of EMBRAPA Agrobiologia. Those strains were examined with BOX-PCR analysis and phylogenetic inference based on 16S rRNA, *recA*, *dnaK* and *glnII* gene sequences. BOX-PCR analysis showed that there is a great genotypic diversity among the strains, with 63 groups formed at the level of 85% similarity. Sequencing of the 16S rRNA gene revealed that 87% belong to the genus *Rhizobium*, mainly to the species *R. phaseoli*, *R. laguerrae*, and *R. tropici*. Phylogenetic trees revealed the existence of two major clades: one of them was formed by the group *R. phaseoli*-*R. Etli*-*R. leguminosarum* and the other by *R. tropici* and related species. The groups formed in the individual trees of each gene were shown to be cohesive, but the results were incogruent for some of the strains. The *recA* presented the highest number of conflicting phylogenetic signs, indicating a possible recombination event among species, especially within the clade *R. phaseoli*-*R. etli*-*R. leguminosarum*.

**Keywords:** Taxonomy. *Rhizobium*. MLSA.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Características morfo-culturais de 139 estirpes de bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro. CC (cor da colônia), TC (tempo de crescimento), pH(alteração do pH do meio de cultura), FC (forma da colônia), TM (transparência do muco), EC (elevação da colônia) e PM (produção de muco). ..... 14
- Figura 2.** Classificação de 139 estirpes de bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro com base no sequenciamento do gene 16S rRNA. A classificação foi realizada com a ferramenta *RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.8* do *Ribosomal Database Project* e com o *RDP 16S rRNA training set 9*. ..... 15
- Figura 3.** Dendrograma de similaridade (primeira parte) obtido pela análise dos perfis de DNA das 137 estirpes da coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Organismos Multifuncionais da EMBRAPA Agrobiologia isoladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. (feijão-comum) após a amplificação por BOX-PCR. .... 16
- Figura 4.** Dendrograma de similaridade (segunda parte) obtido pela análise dos perfis de DNA das 137 estirpes da coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Organismos Multifuncionais da EMBRAPA Agrobiologia isoladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. (feijão-comum) após a amplificação por BOX-PCR. .... 17
- Figura 5.** Relação filogenética entre 63 estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene 16S rRNA feito no programa ARB, utilizando-se da base de dados do projeto *All-Species Living Tree* (YARZA et al., 2008). O método de *neighbour-joining* e a distância de Kimura-2-P foram utilizadas para a construção da árvore, com 1.000 replicatas de *bootstrap*. A sequência de *Geobacter sulfureducens* foi escolhida como grupo externo. . 18
- Figura 6.** Relação filogenética (primeira parte) entre 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *recA* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo. .... 22
- Figura 7.** Relação filogenética (segunda parte) entre 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *recA* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo. .... 23
- Figura 8.** Relação filogenética (primeira parte) entre as 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *dnaK* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo. .... 24

- Figura 9.** Relação filogenética (segunda parte) entre as 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *dnaK* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo. .... 25
- Figura 10.** Relação filogenética (primeira parte) entre as 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *glnII* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo. .... 26
- Figura 11.** Relação filogenética (segunda parte) entre as 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *glnII* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo. .... 27
- Figura 12.** Árvores filogenéticas em redes (*split trees*) calculadas com o algoritmo de *split decomposition* com a transformação de Hamming, representando os caminhos paralelos de evolução encontrados entre as partições de dados para os genes concatenados dois a dois. (neste caso, *glnII* + *recA*). .... 28
- Figura 13.** Árvores filogenéticas em redes (*split trees*) calculadas com o algoritmo de *split decomposition* com a transformação de Hamming, representando os caminhos paralelos de evolução encontrados entre as partições de dados para os genes concatenados dois a dois. (neste caso, *dnaK* + *recA*). .... 29
- Figura 14.** Árvores filogenéticas em redes (*split trees*) calculadas com o algoritmo de *split decomposition* com a transformação de Hamming, representando os caminhos paralelos de evolução encontrados entre as partições de dados para os genes concatenados dois a dois. (neste caso, *dnak* + *glnII*). .... 29
- Figura 15.** Relação filogenética (primeira parte) entre 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *recA* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima parcimônia foi utilizado para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo. .... 61
- Figura 16.** Relação filogenética (segunda parte) entre 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *recA* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima parcimônia foi utilizado para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo. .... 62

**Figura 17.** Relação filogenética (terceira parte) entre 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *recA* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima parcimônia foi utilizado para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo. .... 63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais genes constitutivos usados no MLSA e suas funções. ....	8
<b>Tabela 2.</b> Iniciadores utilizado nas reações de amplificação para análise por PCR e respectivas sequências de nucleotídeos dos genes 16S rRNA, <i>recA</i> , <i>glnII</i> e <i>dnaK</i> .....	11
<b>Tabela 3.</b> Informação filogenética dos locus analisados. ....	19
<b>Tabela 4.</b> Caracterização morfocultural de estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de feijoeiro e depositadas na Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Organismos Multifuncionais da EMBRAPA Agrobiologia. ....	51
<b>Tabela 5.</b> Amplificação, por estirpe, dos genes <i>recA</i> , <i>dnaK</i> e <i>glnII</i> . ....	59

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. A Cultura do Feijão.....	3
2.2. Fixação Biológica de Nitrogênio .....	3
2.3. Taxonomia de Rizóbios do Feijoeiro.....	4
2.4. Análise de Sequências Multilocus (MLSA) .....	6
2.5. Distribuição Geográfica do Rizóbio do Feijoeiro .....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1. Cepas Utilizadas .....	10
3.2. Extração do DNA.....	10
3.3. BOX-PCR .....	10
3.4. Análise de Sequenciamento Multilocus.....	11
3.4.1. Amplificação por PCR .....	11
3.4.2. Sequenciamento .....	11
3.4.3. Análise das sequências.....	12
3.4.4. Análise e árvores filogenéticas.....	12
4. RESULTADOS .....	14
4.1. Caracterização Morfológica.....	14
4.2. Diversidade Genética dos Isolados Através do Perfil de BOX-PCR.....	14
4.3. Análise do Sequenciamento Parcial do Gene 16S .....	15
4.4. Análise do Sequenciamento Multilocus dos Genes <i>recA</i> , <i>dnaK</i> e <i>glnII</i> .....	19
4.5. Análise de Congruência e Visualização de Padrões de Recombinação.....	27
5. DISCUSSÃO .....	30
6. CONCLUSÕES .....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
8. ANEXOS .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) pertence à família Fabaceae, que possui 970 gêneros e mais de 19.400 espécies (Lewis et al., 2005). É uma planta com uma ampla adaptação edafoclimática e que faz parte da maioria dos sistemas de produção de pequenos e médios produtores rurais, sendo a espécie mais cultivada do gênero *Phaseolus*. É uma cultura de grande importância para a segurança alimentar no Brasil, pois ela faz parte da dieta básica do brasileiro, servindo-lhe como uma relevante fonte de ferro e proteínas.

Segundo a FAO/Conab o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão, atrás de países como Myanmar e Índia. Porém mesmo assim não detém a maior produtividade ficando muito atrás de outros países, como Estados Unidos e China, com produtividades que chegam a ser o dobro da média nacional (SEAB, 2015). O estado com a maior produção do gênero no Brasil é o estado do Paraná, seguido pelo estado de Minas Gerais (SEAB, 2015). E dentre os diversos tipos de feijões produzidos, o feijão comum merece destaque pelo fato de representar 69,2% do mercado consumidor Brasileiro (CONAB, 2015).

Uma alternativa tecnológica de baixo custo para o incremento de produtividade é o uso de bactérias diazotróficas simbióticas como inoculantes, uma vez que reduz os custos econômicos advindos da utilização de adubos nitrogenados e evita a contaminação de aquíferos, lagos e rios causada pela lixiviação destes adubos (STRALIOTTO et al., 2002). A pesquisa científica tem procurado exaustivamente compreender as características da nodulação de bactérias que formam associações simbióticas com leguminosas para melhorar a eficiência na produção agrícola (EADY, 1991; SPAINK et al., 1998).

Inicialmente, acreditava-se que a simbiose com o feijoeiro era considerada bastante restrita, realizando simbiose com um grupo de bactérias classificada como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984), porém os avanços das técnicas moleculares e a coleta de rizóbios em vários locais do mundo indicaram que essa leguminosa é bastante promíscua (HERNANDEZ-LUCAS et al., 1995; MICHIELS et al., 1998).

O avanço da tecnologia tem propiciado uma mudança na maneira como diferenciamos um microrganismo do outro, com o desenvolvimento de análises cada vez mais sofisticadas nas diversas áreas (GEVERS et al., 2006). Para se obter um consenso quanto a classificação de um determinado microrganismo, diferentes tipos de dados e informações (fenotípica, genotípica e filogenética) são utilizadas, sendo denominado de taxonomia polifásica (VANDAMME et al., 1996).

Atualmente se conhece uma grande variedade de bactérias capazes de realizar simbiose com o feijoeiro, sendo comum encontrar  $\alpha$ -protoebactérias como, por exemplo, bactérias dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer* e *Neorhizobium* (JORDAN, 1982; DREYFUS; GARCIA; GILLIS, 1988; DE LAJUDIE et al., 1998; CHEN et al., 2001; GILLIS et al., 2001; MOUSAVI et al., 2014) e também  $\beta$ -proteobactérias como *Burkholderia* e *Cupriavidus* (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

A microbiota do solo varia de um local para outro, e boa parte das espécies e variedades ainda não foram testadas, nem mesmo descritas, podendo apresentar grande potencial biotecnológico (BOREM; SANTOS, 2004; RODRIGUES, 2011) já que ainda existem poucas estirpes comerciais que muitas vezes não são adequadas a peculiaridades regionais (FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003). O estudo da biodiversidade de rizóbios busca compreender suas relações ecológicas e evolutivas, visando encontrar genótipos tolerantes aos distintos estresses ambientais que vão limitar a simbiose (STRALIOTTO e RUMJANECK, 1999).

Esse trabalho teve como objetivo realizar a caracterização genotípica e inferências filogenéticas de bactérias da coleção de rizóbios da Embrapa Agrobiologia através da análise do gene 16S rRNA e da análise de sequências multilocus dos genes *recA*, *dnaK* e *glnII*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A Cultura do Feijão

A grande família das leguminosas (Fabaceae) se constitui numa das mais importantes famílias de plantas da agricultura, sendo a principal fonte de alimento em zonas tropicais e em países em desenvolvimento (Graham & Vance, 2000). Dentre as espécies agrícolas pertencentes à essa família, encontra-se o feijoeiro. Representando mais de 65% da produção mundial, os cinco maiores produtores de feijão são a Índia, o Brasil, Myanmar, os Estados Unidos e a China (FAO, 2010). O Brasil ocupou o posto de terceiro maior produtor mundial na safra 2012/2013, com uma produção estimada em 2,8 milhões de toneladas (CONAB, 2015). O brasileiro em média consome 16,5 quilos de feijão por ano (MAPA, 2012), sendo os principais estados produtores Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia, os quais respondem por mais de 65% da produção nacional (RICHETTI et al., 2011).

O feijoeiro é uma planta diplóide ( $2n=2x=22$ ), anual, herbácea levemente pubescente, de hábito de crescimento determinado ou indeterminado (VIEIRA, 1983). Seu desenvolvimento inicial é muito lento e sua taxa de crescimento começa a aumentar a partir do vigésimo dia, atingindo o desenvolvimento máximo quando alcança a idade de 55-70 dias (OLIVEIRA & THUNG, 1988). Em função do sistema radicular do feijoeiro ser pequeno e pouco profundo e seu ciclo ser curto, ele é considerado uma planta exigente em nutrientes (ROSOLEN & MARUBAYASHI, 1994). Por se tratar de uma planta que apresenta uma grande adaptabilidade edafoclimática, isso possibilitou que ela fosse cultivada em quase todo território brasileiro, durante todo o ano e nas diferentes épocas e safras (SALVADOR, 2011).

O feijoeiro tem dois centros primários de diversidade: o Centro Mesoamericano, que se estende da América Central até a Colômbia e Venezuela, e o Centro Andino, que inclui a Argentina, Bolívia e Peru. Segundo Maciel et al. (2003) ocorrem misturas entre os dois principais grupos gênicos (Mesoamericano e Andino), um vez que identificaram a faseolina tipo 'T' no grupo mesoamericano, sabidamente encontrada somente em feijões andinos.

Apesar do Brasil não ser um dos centros primários de diversidade do feijoeiro, segundo estudos de Burle et al. (2010) utilizando marcadores moleculares, observou-se que existe uma vasta gama de variabilidade genética da espécie no país, provavelmente decorrente da domesticação da cultura em épocas de pré e pós-colonização européia. Atualmente, devido à introdução da cultura em outras regiões pelos portugueses e espanhóis após a descoberta da Américas, considera-se existir quatro centros de diversificação além dos dois centros americanos: um na Europa e outro na África (HIDALGO, 1991).

Uma característica importante é a capacidade do feijoeiro em realizar simbiose com rizóbios, os quais são capazes de fixar o N atmosférico e fornecê-lo às plantas, suprimindo assim sua demanda por N. A adubação nitrogenada causa aumento na produtividade do feijoeiro, porém, há uma tendência de se reduzir esse tipo de adubação e substituir pela fixação simbiótica, devido ao seu processo de seleção de cultivares eficientes (PARRA, 1989; OLIVEIRA & THUNG, 1988).

### 2.2. Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico é um processo complexo realizado por determinados procariontes. Dentre eles se destacam os rizóbios, que são capazes de fixar nitrogênio em simbiose com espécies da família Fabaceae. Esse processo envolve modificações fisiológicas e morfológicas, tanto na planta hospedeira como na bactéria (MERCANTE et al., 2002) e se caracteriza por uma alta demanda energética, obtida do metabolismo de carboidratos da planta hospedeira (HUNGRIA & NEVES, 1986).

A infecção das plantas pelas bactérias se inicia com a troca de sinais químicos moleculares (HUNGRIA et al., 1994) que disparam uma cadeia de reações nas células do córtex da planta hospedeira, levando à formação dos nódulos. Isso ocorre tanto quando o rizóbio está presente no solo de forma natural ou via inoculação. Os nódulos são ligados à planta hospedeira por meio de vasos sendo, portanto, totalmente integrados em termos hormonais e nutricionais (SILVEIRA et al., 2001). O desenvolvimento e a manutenção dos nódulos e também a assimilação de nitrogênio chegam a consumir entre 13 e 28% dos produtos fotossintetizados (NEVES & RUMJANECK 1992).

Depois da formação dos nódulos, o rizóbio se diferencia em uma forma conhecida como bacteróide e começa a sintetizar a nitrogenase, dando início à fixação biológica de nitrogênio (JORGE, 1988). A nitrogenase é um complexo enzimático formado por duas unidades proteicas, a ferro-proteína e a molibdênio-ferro-proteína. Para que a nitrogenase consiga fixar nitrogênio é necessário que ela se encontre em uma condição anaeróbica, uma vez que quando entra em contato com oxigênio ela é inativada irreversivelmente. Dessa forma a planta produz a leghemoglobina, que possui uma alta afinidade por oxigênio, e possui a barreira de difusão de oxigênio no nódulo regulando, assim, a tensão de oxigênio (NEVES E RUMJANEK, 1992).

O tempo para o aparecimento dos nódulos é variável com a espécie de leguminosa e com a estirpe de rizóbio, contudo, os nódulos são geralmente visíveis cinco a dez dias após o plantio, enquanto que a atividade da nitrogenase só é detectada de quatro a dez dias após o aparecimento dos nódulos (SIQUEIRA, 1993). Diferentemente das hiperplasias provocadas por insetos, nematóides ou bactérias patogênicas, as estruturas dos nódulos são perfeitamente organizadas (FREIRE, 1975).

Porém devido a problemas com o simbiote ou com o hospedeiro, a infecção pode falhar na produção de nódulos efetivos. Dessa forma isso pode dar à planta uma característica de “doente” pelo fato do comportamento parasítico dos nódulos ineficientes (ARAUJO & HENSON, 1988). Mesmo em uma planta que apresente nódulos efetivos, ocorre o amarelecimento da cultura entre quinze e vinte e cinco dias após a emergência, isso porque os nódulos e as raízes nesta fase concorrem com a parte aérea pelo nitrogênio assimilado, sendo um dreno a planta (VOSS; FREIRE; SELBACH, 1981).

A eficiência da simbiose é muito variável sob condições ambientais. Conforme relatado por RUMJANEK & XAVIER (2010) esse processo pode ser afetado pelo tipo de solo, clima e cultivar, sendo necessário realizar avaliações para se determinar qual estirpe é mais eficiente para determinado lugar. Pode-se afirmar que, para se atingir esta taxa média, seria necessário fornecer às plantas 100 kg ha de N fertilizante, sabendo que a eficiência de utilização do N raramente excede 50% (BLISS, 1993). Em diversos experimentos com inoculante em feijoeiro, não se observou diferença entre tratamentos inoculados e tratamentos que receberam até 75 kg.ha<sup>-1</sup> de N (VARGAS et al., 1991).

### **2.3. Taxonomia de Rizóbios do Feijoeiro**

Os primeiros estudos que relataram bactérias nodulando raízes de plantas foram realizados por Beijerinck, quem determinou que elas eram responsáveis pelo processo de fixação biológica de nitrogênio. Primeiramente elas foram classificadas como *Bacillus radicola* e, posteriormente, como *Rhizobium* (FRANK, 1889), sendo o único gênero da família *Rhizobiaceae*.

O agrupamento dos rizóbios era baseado somente nas características fenotípicas, principalmente, na especificidade do rizóbio em nodular e fixar N<sub>2</sub> com a respectiva leguminosa hospedeira. Esse conceito é conhecido como “grupo de inoculação cruzada” (ANTUNES, 2010). Utilizando esse conceito Fred et al. (1932) descreveram seis espécies

simbióticas: *Rhizobium leguminosarum* (espécie tipo), *R. phaseoli* (que nodula o feijoeiro), *R. japonicum* (que nodula a soja), *R. meliloti* (que nodula a alfafa), *R. trifolii* (que nodula o trevo branco, *Trifolium repens*) e *R. lupini* (que nodula o tremço, *Lupinus* spp.) (COUTINHO, 2003). Nessa classificação foram incluídas na família *Rhizobiaceae* espécies que causam hipertrofia em plantas como a *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *Phyllobacterium myrsinacearum* e *P. rubiacearum* (SKERMAN et al., 1980).

Porém, foi observado que varias plantas não apresentavam especificidade com as bactérias simbióticas acontecendo reações cruzadas entre elas (TEREFEFWORK et al., 2000). O feijoeiro, que hoje é considerada uma planta promíscua, é um exemplo: ela é capaz de formar simbiose com um grande diversidade de rizóbios dentre eles *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. tropici*, *R. etli*, *R. giardinii* e *R. gallicum* (MOSTASSO et al., 2002; GRANGE E HUNGRIA, 2004). Dessa forma a taxonomia baseada na especificidade da planta hospedeira foi sendo substituída pela taxonomia numérica, que leva em conta as características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (Hungria et al., 1997).

Através disso, Jordan (1982) definiu um novo gênero levando em conta o tempo que as bactérias levam para formar colônias isoladas em meio YMA, ou seja, a taxa de crescimento. As bactérias desse novo gênero, diferente dos *Rhizobium* de crescimento rápido, apresentavam crescimento lento e, por esse motivo, foram chamadas de *Bradyrhizobium* (*Bradus*, do grego, significa lento) (Vargas & Hungria, 1997). Após isso, foram descritos mais quatro gêneros: *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988) e *Allorhizobium* (de Lajudie et al., 1998).

O avanço das técnicas de biologia molecular, particularmente a PCR (reação em cadeia da polimerase) e o sequenciamento direto do DNA amplificado, revolucionou a taxonomia e a filogenia. Aliado a isso o isolamento de rizóbios de várias regiões do mundo permitiu observar que os rizóbios do feijoeiro apresentavam características fisiológicas e genéticas distintas, possibilitando a formação de dois grupos, nomeados como tipo I e tipo II (Martinez et al., 1987).

Após isso, Martínez-Romero e colaboradores reclassificaram as estirpes do tipo II como *R. tropici* a partir de uma caracterização genotípica baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e hibridização DNA-DNA (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991). Sendo que este ainda possuía dois subgrupos, IIA e IIB devido ao baixo nível de homologia de DNA (36%) e diferenças em características fenotípicas e genotípicas (GENIAUX et al., 1995). Dois anos depois, utilizando a análise da sequência do gene 16S rRNA, alguns rizóbios isolados que haviam sido classificados como pertencentes ao tipo I, foram reclassificados como uma nova espécie, chamada de *Rhizobium etli* (Segovia et al. 1993). Nessas bactérias anteriormente classificadas como pertencentes ao tipo I, *R. etli* e *R. leguminosarum*, foi verificada uma alta correlação para regiões cromossômicas e genes contidos nos plasmídeos simbióticos (Vasquez et al., 1993).

A estirpe PRF 81 que é uma das estirpes recomendadas como inoculante comercial para a cultura do feijoeiro pelo MAPA, foi isolada no Estado do Paraná e inicialmente classificada como *Rhizobium tropici*. Porém ela apresentava propriedades fisiológicas intermediárias entre os tipos IIA e IIB (Hungria et al., 2000). Dall'Agnol et al. (2013) depois de análises fenotípicas e genotípicas reclassificaram essa estirpe como uma nova espécie, o *Rhizobium freirei*.

Utilizando também o sequenciamento do gene 16S rRNA, bactérias do gênero *Agrobacterium*, algumas sendo responsáveis por induzir o surgimento de hipertrofias em plantas, foram reclassificadas como *Rhizobium* (Young et al., 2001) A *Agrobacterium rhizogenes* é intimamente relacionada com o *R. tropici* e forma um grupo com *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. gallicum*, *R. mongolense* e *R. hainanense*.

Vale ressaltar que o feijoeiro é uma planta promíscua, ou seja, ele não apresenta especificidade com estirpes rizobianas, sendo capaz de formar nódulos com várias espécies e estirpes de rizóbio (MICHIELS et al., 1998). Esses tipos de simbioses promíscuas são considerados mais antigos e mais distribuídos do que simbioses restritivas (PERRET et al. 2000). A espécie é capaz de nodular com diversas espécies do gênero *Rhizobium*, além de espécies dos gêneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e com  $\beta$ -proteobactérias do gênero *Burkholderia*. Contudo, essas simbioses variam em eficiência e podem ser limitadas por incompatibilidade em diferentes etapas do processo de formação dos nódulos, induzindo desde nódulos vazios a nódulos amorfos ou infectados, mas sem a diferenciação adequada do rizóbio em bacteróides e a consequente fixação biológica do nitrogênio (MICHIELS et al., 1998). Essa promiscuidade também tem uma importância prática, visto que dificulta a introdução de inoculantes em condições de campo. A existência de rizóbios nativos do solo competitivos e com uma baixa eficiência simbiótica associada à promiscuidade do feijoeiro, influenciará negativamente a introdução de estirpes inoculadas visto que estas terão que ser competitivas o suficiente para vencer a competição com estirpes nativas e, conseqüentemente, conseguir formar uma maior proporção de nódulos no feijoeiro (FERNANDES JUNIOR & REIS).

Os pesquisadores acreditavam que a capacidade de nodular leguminosas era restrita às bactérias da classe  $\alpha$ -*Proteobacteria*. Porém pesquisas recentes mostraram que membros de outras classes também poderiam estabelecer simbiose com essas plantas, sendo eles membros da classe  $\gamma$ -*Proteobacteria*, como a *Pseudomonas* (Shiraishi et al., 2010) e  $\beta$ -*proteobacteria*, particularmente dos gêneros *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001; Shiraishi, 2010) e *Cupriavidus* (sin. *Ralstonia* ou *Wautesia taiwanensis*) (CHEN et al., 2001).

$\beta$ -rizóbios tem a capacidade de formar nódulos e fixar nitrogênio, como exemplo genótipos de *Burkholderia* e *Cupriavidus*, inoculados em *Mimosa pigra* e *Mimosa pudica* na Costa Rica, que tiveram um melhor desempenho quanto ao crescimento de plantas e a atividade da nitrogenase em comparação a plantas inoculadas com estirpes de *Rhizobium* ( $\alpha$ -*Proteobacteria*). Diversos trabalhos já observaram a ocorrência de diversas espécies de *Burkholderia* fixadoras de nitrogênio (Reis et al., 2004; Perin et al., 2006; Chen et al., 2006, 2008), contudo apenas um relato para *Cupriavidus* (Florentino et al., 2009) no Brasil. Moulin et al. (2001) propõem que os genes *nod* observados nas  $\beta$ -*Proteobacteria* tenham sido adquiridos através de múltiplas transferências horizontais de genes com as  $\alpha$ -*Proteobacteria*. Foi observado genes simbióticos em *Pseudomonas*, mostrando que estas bactérias endofíticas de nódulos podem sofrer transferências horizontal de genes e evoluírem para bactérias simbióticas (Shiraishi et al., 2010).

Nos estudos das bactérias fixadoras de nitrogênio, observamos a sua promiscuidade com relação à escolha da planta hospedeira e a sua ampla distribuição geográfica, dessa forma é importante continuar com os estudos de taxonomia desse grupo de bactérias.

#### **2.4. Análise de Sequências Multilocus (MLSA)**

Com a evolução dos estudos de genética molecular, varias técnicas foram criadas permitindo o estudo do parentesco genético de cepas bacterianas. A filogenia bacteriana é tradicionalmente baseada na análise do gene ribossomal 16S. Esse gene é considerado conservado entre as bactérias, mas ao mesmo tempo variável o suficiente e com uma quantidade de informação capaz de revelar as relações filogenéticas entre as espécies (WOESE, 1987; WEISBURG et al., 1991)

O RNA da subunidade menor do ribossomo é tido como um marcador molecular universal uma vez que tem um taxa de evolução baixa, e está envolvido na síntese proteica, função que se mantém há milhares de anos, podendo reter informações filogenéticas e com

uma baixa ocorrência de eventos de transferência horizontal (Harris et al. 2003). Nesse gene a substituição nucleotídica em sua sequência é tida como proporcional ao tempo transcorrido evolutivamente na diferenciação das espécies (Lloret; Esperança, 2005).

Foram realizados vários trabalhos nos quais se utilizaram estudos fenotípicos e hibridização DNA-DNA e com isso conseguiram inferir que, com relação a sequência do gene 16S rRNA, bactérias apresentando similaridade inferior a 97% com a estirpe tipo da espécie poderia se tratar de uma nova espécie (GEVERS et al., 2005; Rosseló-Mora et al., 2001). Esse valor foi revisto e atualmente se propõe o uso de 98,7 - 99% similaridade no lugar do antigo valor de 97% para se avaliar a singularidade genômica de novos isolados (STACKBRANDT & EBERS, 2006). A amplificação de sequência parcial ou completa desse gene pela PCR tornou possível o estudo da diversidade microbiana sem a necessidade de cultivar o microrganismo (WARD; WILLER; BATESON, 1990).

Porém os genes ribossomais apresentam resolução limitada no nível de espécie (KONSTANTINIDIS et al., 2007) e, dessa forma, o uso exclusivo do gene 16S rRNA em estudo taxonômico, filogenético e evolutivo de espécies muito relacionadas nem sempre possibilita a identificação das divergências evolutivas no nível da espécie (STACKEBRANDT E et al., 2002). Outra problemática é o fato de algumas bactérias terem varias cópias do operon RNAr (16S, 23S, 5S e IGS) e os alelos podem divergir em cada cópia, em maior ou menor extensão, devido à recombinação intragênica localizada e transferência lateral parcial, ou total, dos operons (Yap et al., 1999).

Além disso, atualmente, vários trabalhos tem concluído que os genes ribossomais podem, ocasionalmente, sofrerem transferência horizontal de genes (THG), duplicação gênica e recombinação resultando em mosaicos de sequências (SULLIVAN et al., 1996; VAN BERKUM et al., 2003; VINUESA et al., 2005; GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2007). Exemplificando isso, no trabalho realizado por Martens et al. (2007) foram encontrados incongruências nas árvores construídas para alguns genes quando comparadas com a árvore gerada para o gene ribossomal 16S, dessa forma podendo indicar a ocorrência de um evento de recombinação ou THG.

Nos últimos anos o uso de genes constitutivos (em inglês, *housekeeping*) tem sido cada vez mais comum, o que tem aumentado ainda mais as potencialidades do sequenciamento. Esses genes codificam proteínas com funções vitais para as células. Além disso, são genes de cópias únicas no genoma, teoricamente menos prováveis de sofrer transferência horizontal e, por codificarem uma proteína, tornam a porcentagem de substituição nucleotídica superior àquela encontrada no gene 16S rRNA. Essas características permitem utilizá-los para filogenia principalmente para se estudar relações evolutivas entre organismos filogeneticamente mais próximos (Sawada et al., 1999; Martens et al., 2008).

Uma das estratégias para o estudo taxonômico e filogenético bacteriano consiste na análise conjunta de múltiplos genes (loci) onde essa análise conjunta poderia funcionar como um “tampão” contra efeitos de recombinação ou transferência horizontal (THG) que porventura ocorram em um único gene específico (GEVERS et al., 2005).

A metodologia descrita por Maiden et al. (1998), a tipagem de sequências multilocus (MLST), utiliza as sequências de fragmentos internos (400-600 bp) de 6 a 10 genes constitutivos (MAIDEN, 2006). Para cada gene constitutivo, as diferentes sequências presentes dentro de uma espécie bacteriana são atribuídas a alelos distintos e, para cada isolado, os alelos de cada um dos *loci* definem o perfil alélico ou tipo de sequência (ST). Essa metodologia foi desenvolvida para a tipagem de espécies de patógenos e estudos epidemiológicos agrupando linhagens relacionadas em complexos clonais (Ramos, 2007).

Baseado nessa metodologia foi proposta a metodologia de análise de sequência multilocus (MLSA) visando sua utilização na elucidação de relações taxonômicas entre espécies (GEVERS et al., 2005.; MARTENS et al., 2007; SCHLEIFER, 2009). Utilizando

apenas como base o gene ribossomal 16S, é possível identificar os organismo em nível de gênero ou família, já com base na metodologia de MLSA, por ter um alto poder de resolução, é possível identificar em nível de espécie (GEVERS et al., 2005).

ZEIGLER (2003) e THOMPSON et al. (2005) propuseram que os genes constitutivos escolhidos devem obedecer aos seguintes critérios: 1) estar presentes em um única cópia no genoma; 2) ser distribuídos no genoma com uma distância mínima de 100 kb entre si; 3) apresentar extensão nucleotídica suficiente para permitir seu sequenciamento; e 4) conter informações suficientes para a análise. Como os dados obtidos com essa análise são utilizados para fins taxonômicos e filogenéticos, eles devem apresentar correlação com aqueles obtidos com o 16S rRNA e com os percentuais de similaridade obtidos por hibridação DNA-DNA (GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2007; MENNA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009).

A princípio a metodologia de MLSA baseava-se na análise das sequências concatenadas de no mínimo cinco genes conservados, concatenados em um única sequência (STARCKEBRANDT et al., 2002). Porém o trabalho feito por Konstantinidis et al. (2006) observou que o número mínimo de três genes já seria o suficiente para se ter uma resolução filogenética, sendo que, se um dos genes apresentasse transferência horizontal ou evento de recombinação, os outros dois compensariam esse primeiro gene. Alguns genes utilizados na classificação de estirpes de rizóbios são os genes constitutivos *recA*, *dnaK*, *gltA*, *glnII*, *rpoA*, *pheS*, *rpoB* e *atpA* (DRANCOURT et al., 2004; NASER et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009) A Tabela 1 demonstra alguns genes e suas funções.

Atualmente a metodologia de MLSA se mostrou uma ferramenta decisiva na descrição de novas espécies bacterianas e já foi aplicada no estudo taxonômico de diferentes gêneros bacterianos: *Burkholderia*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Shinella*, *Microvirga*, *Phyllobacterium*, *Cupriavidus* e *Gluconacetobacter* (DALL'AGNOL et al., 2013.; DELAMUTA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2012).

**Tabela 1:** Principais genes constitutivos usados no MLSA e suas funções.

Gene	Função
<i>recA</i>	Recombinase A
<i>dnaK</i>	Chaperona (Proteína de choque térmico)
<i>gltA</i>	Citrato sintase I
<i>glnII</i>	Glutamina sintetase II
<i>rpoA</i>	RNA polimerase subunidade Alfa
<i>pheS</i>	fenilalanil-tRNA sintetase subunidade alfa
<i>rpoB</i>	RNA polimerase subunidade beta
<i>atpA</i>	ATP sintase Subunidade alfa

## 2.5. Distribuição Geográfica do Rizóbio do Feijoeiro

Mesmo não se conhecendo todos os fatores que influenciam a distribuição geográfica dos rizóbios do feijoeiro, acredita-se que esteja relacionada com a difusão da cultura pelo mundo, uma vez que o rizóbio pode ser carregado com as sementes (Hungria et al., 1997). Com a análise de populações de feijões crioulos através de diversas caracterizações genotípicas e fenotípicas, atribui-se a origem da cultura do feijão a duas regiões distintas: o centro mesoamericano (México, América central e Colômbia) e o centro andino na América do Sul (Equador, Peru e Argentina) (Tohme, 1996; Beebe et al., 2001).

Devido à grande frequência de isolamento de *Rhizobium tropici* na América do sul, principalmente no Brasil, permite-se acreditar que essa espécie seja nativa dessa região (Martínez-Romero et al., 1991; Hungria et al., 1995; Mercante et al., 1995). Outra hipótese é

que o *R. tropici* seja proveniente da região andina e adaptado ao solo e condições ambientais do Brasil. Vários trabalhos levantando as espécies que nodulam o feijoeiro na Europa tem mostrado uma grande diversidade: além de ser encontrada a presença significativa de *R. etli* e *R. tropici*, foram encontradas duas novas espécies isoladas de nódulos de feijoeiro na França, o *R. gallicum* (Laguerre et al., 1993; Amarger et al., 1994) e o *R. giardinii* (Amarger et al., 1997). A grande presença de *R. tropici* em algumas regiões da África pode ser devido a introdução do feijoeiro via países da América do sul (Ayanango et al., 1995).

Uma hipótese é a de que a espécie *R. etli* seria originalmente encontrada na Mesoamérica, porém ela foi levada junto com sua hospedeira quando a introduziram na Europa (Segovia et al., 1993). Com isso a transferência do plasmídeo simbiótico do *R. etli* bv. *phaseoli* para o *R. leguminosarum*, teria surgido o *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e mais tarde esse mesmo processo teria ocorrido do *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* para o *R. gallicum* e *R. giardinii* bv. *phaseoli* (AMARGER et al., 1997). Essa espécie foi encontrada em diversos locais da França (Amarger et al., 1993, 1994, 1995). O *R. etli* bv. *phaseoli* é muito encontrado associado com espécies selvagens de feijão e ao feijão comum em países do centro de origem da cultura como o México, Colômbia e sul dos Andes e, devido a isso, Bernal & Graham (2001) com isso propuseram a hipótese de coevolução entre hospedeiro e rizóbio, ou seja, tanto a planta quanto o rizóbio evoluíram juntos nesse processo de simbiose, porém isso não foi demonstrado claramente (Amarger, 2001).

O *R. etli* já foi isolado de nódulos de feijoeiro cultivado em países como Espanha, França, Áustria, Quênia, Tunísia e Indonésia, regiões onde a cultura do feijoeiro foi introduzida a partir do século XVI (Silva et al. 2003). Aguilar et al. (2004) encontraram um polimorfismo no gene *nodC*, gene comum entre os rizóbios de diferentes origens geográficas, revelando, assim, três tipos de *nodC*. Esses alelos variavam sua predominância dependendo da região geográfica, ou seja, a população de *Rhizobium etli* obtida de solos mexicanos apresentou um alelo diferente do encontrado em bactérias de solos bolivianos e argentinos e aquelas encontradas em solos equatorianos apresentaram características intermediárias.

A análise da população de rizóbio em solos cultivados com feijoeiro no estado do Paraná revelou que, em média, a população era constituída de 29% de rizóbios capazes de nodular somente o feijoeiro (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* ou *R. etli*), 25% capaz de nodular feijoeiro e leucena (*R. tropici* ou *R. etli*) e 46% de *Rhizobium* capaz de nodular apenas leucena (Hungria & Stacey, 1997). Em região dos Cerrados, a população de rizóbios isolada de feijoeiro consistia, aproximadamente, de 70% de *R. tropici* IIA, 19% de *R. tropici* IIB e 11% de *R. etli* ou *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Hungria et al., 1997). Em trabalhos realizados em Santa Catarina por Stocco et al. (2008), constatou-se que a composição de espécies de rizóbios microssimbiontes de feijoeiros na região é de 17,1% de *Rhizobium tropici*, 35,9% de *R. etli*, 32,5% de *R. leguminosarum*, 1,7% de *R. giardinii* e 12,8% de perfis distintos.

A estirpe SEMIA 4080 (= PRF 81) foi isolada no estado do Paraná e sua alta capacidade de fixação de N<sub>2</sub> e competitividade em relação às estirpes nativa do solo foi comprovada em diversos ensaios (HUNGRIA et al., 2000), sendo recomendada como inoculante para a cultura do feijoeiro desde 1998. Essa estirpe estreitamente relacionada com o *R. tropici*, baseado em análises de sequências do gene 16S rRNA, apresenta características fisiológicas intermediárias entre os tipos IIA e IIB de *R. tropici* porém difere dessa espécie quanto às características fenotípicas e genotípicas. Dessa forma, Dall'Agnol et al. (2013) propuseram sua reclassificação como *R. freirei*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cepas Utilizadas

Foram selecionadas 139 estirpes da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Organismos Multifuncionais da EMBRAPA Agrobiologia. As estirpes oriundas da coleção foram isoladas do feijoeiro e são provenientes de várias localidades do Brasil (Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Goiás) e de outros países (Colômbia, Bélgica, Inglaterra, USA e Iraque) e foram depositadas nessa coleção ao longo dos anos desde a sua criação (**Anexo A**).

A caracterização morfológica das bactérias foi disponibilizada pela coleção. Essa caracterização foi realizada cultivando-se as bactérias em meio de cultura sólido 79 (FRED & WASKMAN, 1928)(Anexo B) com o indicador azul de bromotimol em pH ideal de 6,8 a 7,0. A caracterização acontece quando a primeira colônia isolada aparece, durante a primeira semana. As avaliações foram realizadas com 3 e 8 dias, quanto a: cor, quantidade de exopolissacarídeos produzidos (muco) em relação ao número de dias de crescimento, velocidade de crescimento de aparecimento das colônia, diâmetro das colônias em milímetros, sua forma, tipo de borda e elevação. A mudança de pH do meio (ácido, neutro ou básico) foi avaliada a partir do quinto dia.

#### 3.2. Extração do DNA

O DNA foi extraído com o kit Minikit QUIamp DNA® conforme recomendações do fabricante. As células bacterianas foram cultivadas em meio líquido 79 por até 72 horas (**Anexo B**). Conforme Sambrook & Russell (2001) a quantificação e qualificação do DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1%. Após ser corado com brometo de etídio, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak ®).

#### 3.3. BOX-PCR

O DNA das cepas foi analisado por BOX-PCR utilizando-se o iniciador BOX-A1R (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG -3') conforme o protocolo descrito por VERSALOVIC et al. (1994) e VINUESA et al. (1998). Os reagentes utilizados foram da PROMEGA, seguindo as indicações do fabricante. As reações de amplificação com volume final de 25 µL, continham 5 µL de tampão de PCR 5 X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,75 µL de uma solução com 10 mM de cada dNTP, 2,5µL do iniciador BOX-A1R 10 µM, 2,5 µL de DMSO 50%, 1 unidade de GoTaq® DNA polimerase em 0,25µL, 3µL de DNA molde e água ultrapura estéril.

Todas as reações de PCR foram realizadas em termocicladores disponíveis na Embrapa Agrobiologia. A amplificação foi realizada com uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por cinco minutos, seguida de 30 ciclos, sendo cada ciclo composto por mais uma etapa de desnaturação a 94°C por um minuto, uma etapa de anelamento a 53°C por um minuto e uma etapa de extensão a 65°C por oito minutos. Para garantir que a amplificação completa dos produtos de PCR fosse alcançada, procedeu-se uma etapa de extensão final a 65°C por 16 minutos.

Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 2% utilizando o tampão TAE através da técnica de eletroforese com voltagem constante (90 V) por 4 horas. Posteriormente os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5µg mL<sup>-1</sup>) e visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodac®). Por fim, foram fotografados e analisados quanto a presença de fragmentos de DNA. Os perfis foram examinados visualmente e com o programa Bionumerics (Applied Maths) a fim de construir um dendrograma de similaridade

no qual foram empregados o coeficiente de similaridade de Sørensen-Dice (DICE, 1945; SØRENSEN, 1948) e o método da média aritmética não ponderada (UPGMA).

As amostras no dendograma que apresentaram uma similaridade de 85% entre si foram arbitrariamente consideradas como pertencendo ao mesmo grupo. Ou seja, essas amostras que apresentaram um perfil muito próximo ou até mesmo idêntico foram consideradas como um agrupamento do qual foi selecionado um único indivíduo de cada grupo para análise de sequenciamento multilocus.

### 3.4. Análise de Sequenciamento Multilocus

#### 3.4.1. Amplificação por PCR

Os perfis de BOX-PCR foram utilizados para selecionar as estirpes que apresentassem um perfil com 85% de similaridade e dessas foi possível escolher 63 cepas, as quais foram caracterizadas pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA, *dnaK*, *glnII* e *recA*, visando a sua classificação taxonômica (Tabela 2). Os protocolos de amplificação utilizados são aqueles recomendados por RIBEIRO et al. (2009).

**Tabela 2.** Iniciadores utilizado nas reações de amplificação para análise por PCR e respectivas sequências de nucleotídeos dos genes 16S rRNA, *recA*, *glnII* e *dnaK*.

Gene	Iniciador	Sequencia (5' - 3')	Programa do PCR	Referência
16S rRNA	Amp1	GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG	3min 94°C, 34X (1min 94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C) e 5min 72°C	WARD et al., (1992)
	Amp2	AAGGAGGTGATCCARCCGCA		
<i>recA</i>	6F	CGRCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA'	5min 95°C, 30X (1min 95°C, 1 min 55°C, 1,3 min 72°C) e 5min 72°C	GAUNT et al., (2001)
	555F	CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT'		
<i>glnII</i>	TSglnII F	AAGCTC GAGTACATCTGGCTCGACGG	5min 95°C, 30X (45seg 95°C, 45seg 55°C, 1,30 min 72°C) e 5min 72°C	STEPKOW SKI et al., (2005)
	TSglnII R	SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG		
<i>dnaK</i>	dnaK1466F	AAG GAR CAN CAG ATC CGC ATC CA	5 min 94°C, 30X (5min 94°C, 1min 55°C, 1min 72°C) e 7min 72°C	STEPKOW SKI et al., (2003)
	dnaK1777R	TAS ATS GCC TSR CCR AGC TTC AT		

#### 3.4.2. Sequenciamento

Visando o sequenciamento, duas alíquotas dos produtos de PCR foram separadas para quantificação do DNA (2 µL) e para purificação (10 µL) com as enzimas EXO/FastAP. A mistura da amostra com a enzima foi então aquecida a 37°C por 15 minutos e então a 85°C por 20 minutos. Amostras com uma baixa quantidade passaram novamente pelo processo de amplificação por PCR de modo a se conseguir produto suficiente para o tratamento enzimático.

Após esse tratamento as amostras foram marcadas utilizando-se o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1* (Applied Biosystems, EUA) em uma placa de 96 poços. O mix formado continha o DNA da amostra e água ultrapura para PCR, os iniciadores, o tampão da reação, o Big Dye somando um volume final de 10 µL. Sendo diferenciado uma coluna para cada iniciador utilizado, ou seja, uma coluna com o iniciador da fita líder e uma outra coluna com o iniciador da fita reversa.

A placa foi levada ao termociclador, passando por um estágio inicial de desnaturação de 96°C por 1 minuto, seguido por 35 ciclos compostos por uma desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Finalizando o processo, foi realizada uma purificação pós-reação com acetato de Sódio, EDTA e etanol e o DNA foi encaminhado para injeção no sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems) e sequenciamento pela metodologia Sanger no Laboratório de Genoma da EMBRAPA agrobiologia.

### 3.4.3. Análise das sequências

As sequências dos genes *recA*, *glnII* e *dnaK* foram analisadas com o auxílio do programa ChromasPro 1.7.5 (Technelysium Pty Ltd.) para verificação de sua qualidade e montagem de contigs. Para se obter sequências de boa qualidade, as extremidades de baixa qualidade de cada sequência, indicadas pelo programa, foram eliminadas. As porções complementares do gene, obtidas a partir da amplificação das fitas líder e complementar, foram sobrepostas, criando-se, assim, sequências consenso denominadas de contigs.

Os contigs formados foram submetidos à análise com o algoritmo Blastn (ALTSCHUL et al., 1990) para busca de sequências de alta similaridade no banco de dados publico NCBI GenBank®. A base de dados de pesquisa utilizada foi a *Nucleotide collection – (nr/nt)* e os parâmetros de análise utilizados foram os *default* do Blastn. As sequências que apresentaram alta identidade com as amostras estudadas foram selecionadas para servirem como estirpes de referência.

No programa MEGA 6 (TAMURA et al. 2013) as múltiplas sequências de nucleotídeos de cada gene foram convertidas em proteínas e então alinhadas utilizando-se a ferramenta Muscle (EDGAR, 2004). Esse alinhamento foi, então, utilizado como guia para se alinhar as sequências das bases nucleotídicas, as quais foram utilizadas para a análise filogenética. Os alinhamentos foram editados manualmente com o programa BioEdit V 7.2.5 (HALL, 1999).

Para as sequências do gene 16S rRNA, os contigs foram montados utilizando-se o programa Bionumerics (AppliedMaths, Bélgica). O alinhamento foi realizado com o programa SINA 1.2.11 (Pruesse et al., 2012) disponibilizado pela base de dados ARB-Silva (<https://www.arb-silva.de/>).

### 3.4.4. Análise e árvores filogenéticas

A classificação das sequências do gene 16S rRNA foi feita com base na ferramenta RDP Naive Bayesian rRNA Classifier versão 2.8, de junho de 2014 e com RDP 16S rRNA training set 9 (WANG et al., 2007). As relações filogenéticas com base nesse gene foram inferidas utilizando-se o programa ARB (LUDWIG et al., 2004) e a base de dados do projeto “The All-Species Living Tree” de 2015 (YARZA et al., 2008) (<https://www.arb-silva.de/projects/living-tree/>).

As árvores de cada gene constitutivo foram geradas utilizando-se o programa MEGA 6 (TAMURA et al. 2013) com as estirpes de referência obtidas no Genbank®. O melhor modelo de substituição para o cálculo das distâncias utilizadas na análise filogenética, definido com base na análise de modelos disponibilizada no MEGA 6, foi o Tamura 3 parâmetros (T92) para *recA* e *dnaK* e Tamura-Nei (TN93) para *glnII*. Para se ter uma maior confiabilidade no método escolhido, foram geradas árvores utilizando-se os métodos de máxima verossimilhança, *neighbor-joining*, evolução mínima e máxima parcimônia. O suporte estatístico para os diferentes clados formados nas árvores foi calculado pela análise de amostragem “bootstrap” (SWOFFORD et al., 1996) onde um valor alto indica a

confiabilidade do agrupamento. Como as árvores geradas por esses métodos foram congruentes, escolhemos apresentar, para cada gene, as árvores geradas pelo método de máxima verossimilhança. As árvores geradas pelo método de máxima parcimônia são apresentadas no anexo D. Em todas as árvores, a estirpe *Bradyrhizobium japonicum* E109 (genoma CP010313) foi utilizada como grupo externo.

Os testes de homogeneidade de partição (HP) (FARRIS et al., 1995) e Shimodaira-Hasegawa (SH) (SHIMODAIRA & HASEGAWA, 1999) foram utilizados para avaliar a congruência entre as filogenias obtidas com os diferentes genes constitutivos. O critério de otimização utilizado para o teste HP foi o da máxima parcimônia. Foram calculadas 100 repetições. O teste SH foi realizado para comparar árvores obtidas pelo método da máxima verossimilhança. As topologias e os valores dos parâmetros foram escolhidos com o ajuste do modelo GTR com proporção de sites invariáveis de 0.51 e distribuição gama (4 categorias e alfa de 0.87). Foram utilizadas 10.000 repetições. Todos os testes foram realizados no programa PAUP\* 4.0a151, versão para Macintosh (SWOFFORD, 2002).

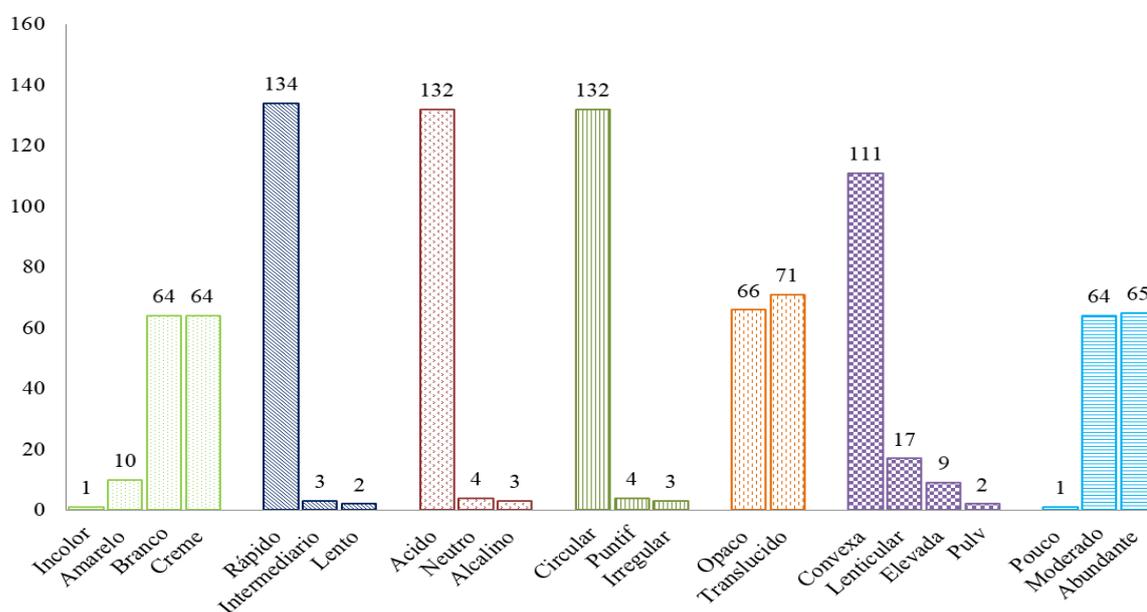
A existência de sinais filogenéticos conflitantes para cada gene e para a concatenação de diferentes partições foi avaliada por meio da análise de “split decomposition”, utilizando-se a transformação de Hamming, no programa SplitsTree4 versão 4.14.4. (Huson, 1998).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização Morfológica

Quanto à caracterização fenotípica das estirpes oriundas da coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Organismos Multifuncionais da EMBRAPA Agrobiologia, através da morfologia das colônias, observou-se que a maioria das colônias formadas possuía cor branca (64 estirpes) ou creme (64 estirpes). Dez estirpes apresentaram colônias de cor amarela e apenas uma delas apresentou colônias incolores.

Verificou-se que 96,4% das estirpes apresentaram crescimento rápido, sendo que apenas 2,2% apresentaram crescimento intermediário e 1,4% apresentou crescimento lento. Quanto à alteração do pH do meio de cultura, a quase totalidade das estirpes apresentou reação ácida, sendo que apenas 2 estirpes apresentaram reação alcalina. Majoritariamente as colônias tiveram formato circular, com poucas estirpes apresentando colônias puntiformes e irregulares. Quanto a sua elevação, 80% das estirpes apresentaram colônias convexas, 12,2% lenticulares 6,5% elevadas e 1,4% pulvinadas. Em relação a produção de muco, a maior parte das bactérias apresentou produção moderada (64 estirpes) e produção abundante (65 estirpes) e apenas 10 estirpes apresentaram pouca produção de muco (Figura 1).



**Figura 1.** Características morfológicas de 139 estirpes de bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro. CC (cor da colônia), TC (tempo de crescimento), pH (alteração do pH do meio de cultura), FC (forma da colônia), TM (transparência do muco), EC (elevação da colônia) e PM (produção de muco).

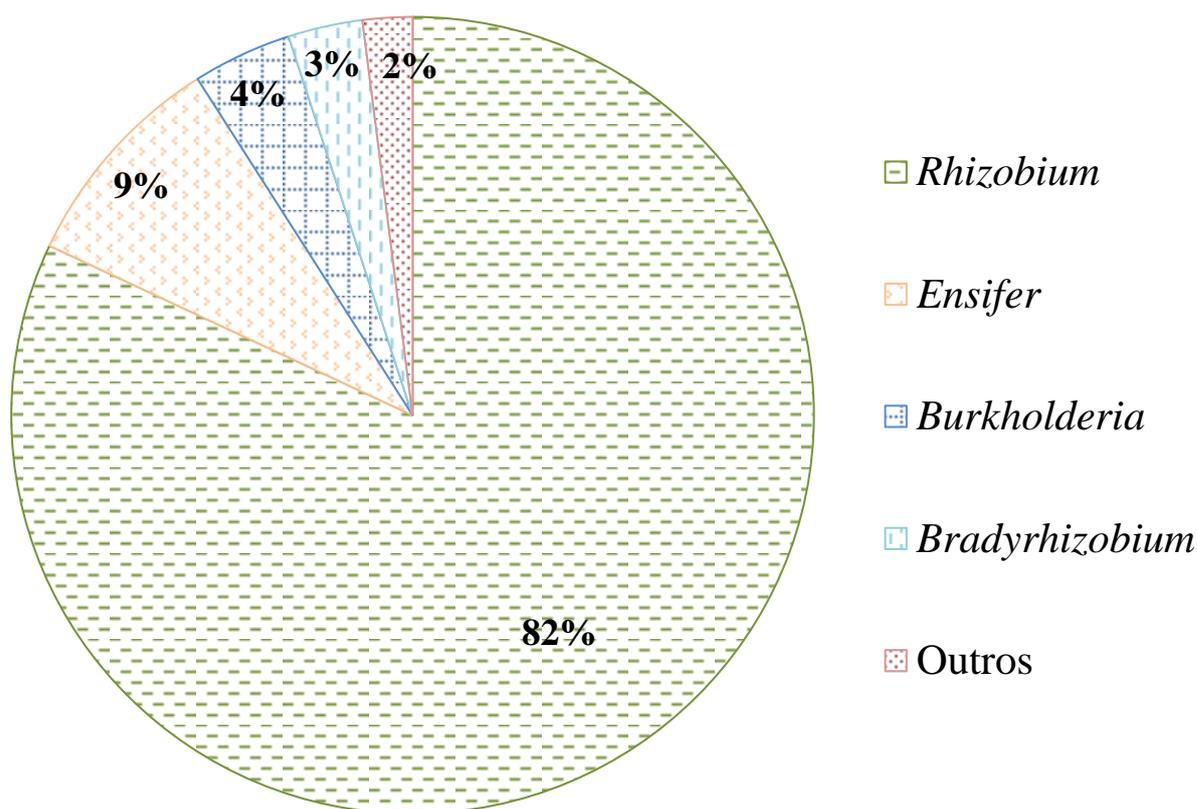
### 4.2. Diversidade Genética dos Isolados Através do Perfil de BOX-PCR

Realizou-se a análise de BOX-PCR para se obter o perfil genômico de todas as estirpes. Foi gerado um dendrograma com 137 estirpes da coleção como observado nas Figuras 3 e 4. Nesse dendrograma não estão presentes as amostras BR520 e BR 534; essas duas amostras foram acrescentada posteriormente para as análises de sequenciamento. Com esse dendrograma pode-se observar uma grande diversidade genotípica, com a formação de 63 grupos a 85% de similaridade. Algumas estirpes possuem um perfil 100% similar entre si, mesmo sendo provenientes de locais diferentes. Como exemplo, pode-se citar o grupo que inclui as estirpes BR 281 e BR 239.

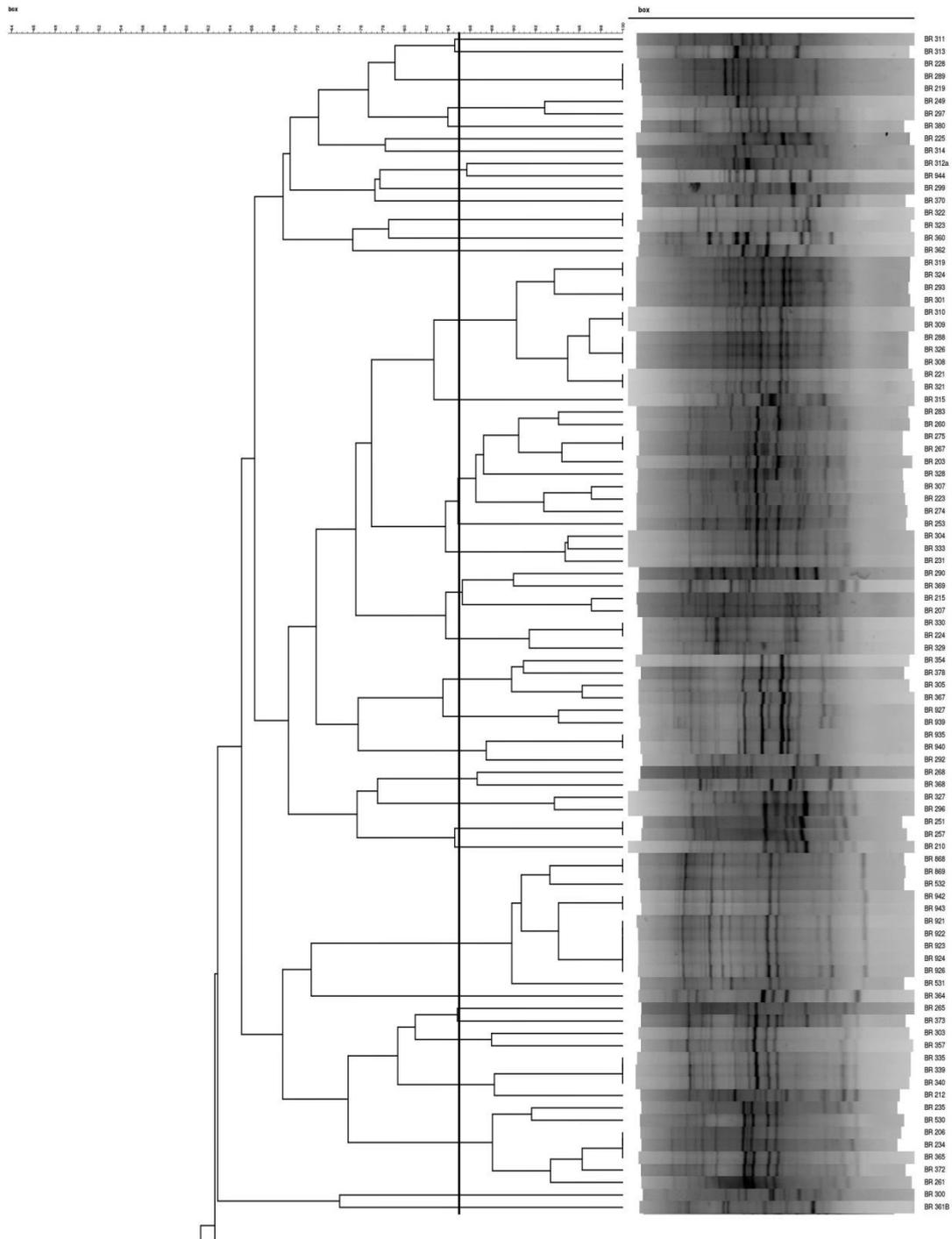
### 4.3. Análise do Sequenciamento Parcial do Gene 16S

Através das sequências do gene 16S rRNA, as 139 estirpes foram classificadas como sendo 82% pertencentes ao gênero *Rhizobium*, 8,7% ao gênero *Ensifer*, 3,6% ao gênero *Burkholderia*, 2,2% ao gênero *Bradyrhizobium* e 3,6% aos gêneros *Sphingomonas*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Bacillus* e *Herbaspirillum* (Figura 2).

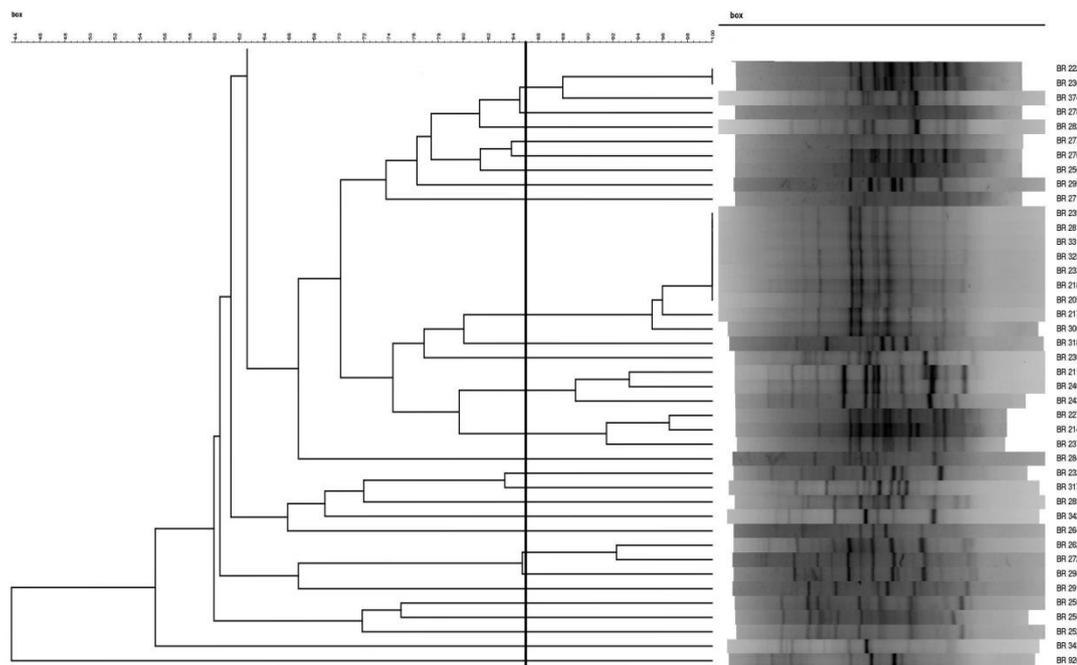
Os indivíduos representantes dos 63 grupos foram usados para construir uma árvore filogenética baseada no sequenciamento parcial (~ 1.300 pb) do gene 16S rRNA (Figura 4). As relações filogenéticas foram inferidas utilizando-se o programa ARB-Silva (PRUESSE et al., 2007) e a base de dados do projeto “The All-Species Living Tree” (YARZA et al., 2008). Foram incluídas na análise filogenética indivíduos classificados em gêneros previamente comprovados como rizóbios ( $\alpha$ - ou  $\beta$ -rizóbios) ou, como no caso do *Herbaspirillum*, previamente isolado de nódulos, embora não comprovados como indutores da nodulação.



**Figura 2.** Classificação de 139 estirpes de bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro com base no sequenciamento do gene 16S rRNA. A classificação foi realizada com a ferramenta *RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.8* do *Ribosomal Database Project* e com o *RDP 16S rRNA training set 9*.



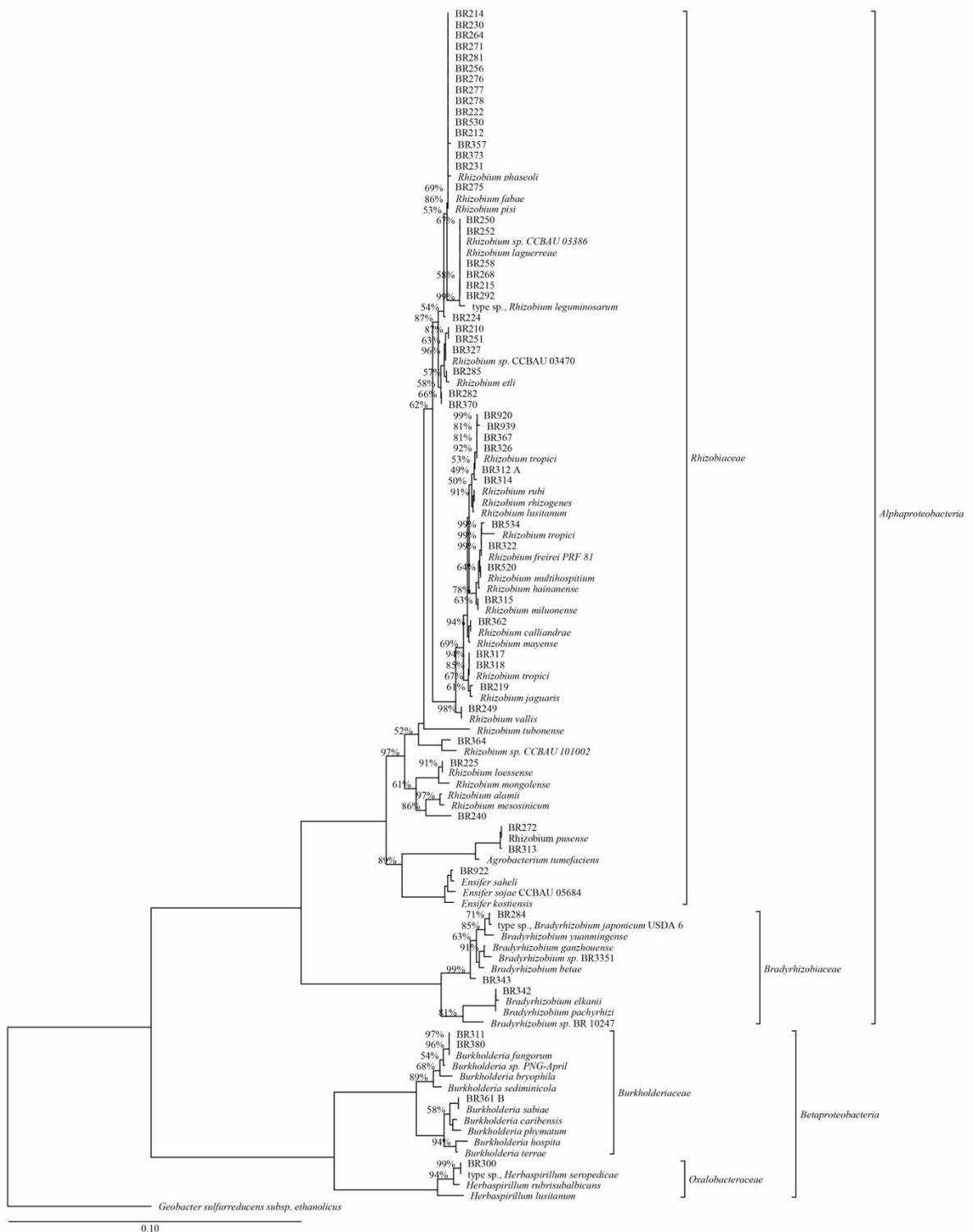
**Figura 3.** Dendrograma de similaridade (primeira parte) obtido pela análise dos perfis de DNA das 137 estirpes da coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Organismos Multifuncionais da EMBRAPA Agrobiologia isoladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. (feijão-comum) após a amplificação por BOX-PCR.



**Figura 4.** Dendrograma de similaridade (segunda parte) obtido pela análise dos perfis de DNA das 137 estirpes da coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Organismos Multifuncionais da EMBRAPA Agrobiologia isoladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. (feijão-comum) após a amplificação por BOX-PCR.

Na seleção das estirpes, levamos em consideração as estirpes de gêneros descritos como capazes de induzir a formação de nódulos e previamente isoladas de nódulos de feijão. Dessa forma algumas estirpes que foram identificadas através das sequências do gene 16S rRNA como pertencentes ao gêneros *Sphingomonas*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Bacillus* e *Herbaspirillum* não foram incluídas nas outras análises realizadas.

Nesse trabalho podemos observar que as estirpes selecionadas se organizam predominantemente nas classes *Alphaproteobacteria* (88,89%) e *Betaproteobacteria* (6,35%). As estirpes pertencentes a *Alphaproteobacteria* são das famílias *Rhizobiaceae* e *Bradyrhizobiaceae* e dentre as *Betaproteobacteria* estão as famílias *Burkholderiaceae* e *Oxalobacteraceae*. Também, em menor número, dentre as selecionadas estão representantes das classes *Firmicutes* (3,17%) e *Actinobacteria* (1,59%), porém essas duas classes não entraram na construção da árvore.



**Figura 5.** Relação filogenética entre 63 estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene 16S rRNA feito no programa ARB, utilizando-se da base de dados do projeto *All-Species Living Tree* (YARZA et al., 2008). O método de *neighbour-joining* e a distância de Kimura-2-P foram utilizadas para a construção da árvore, com 1.000 replicatas de *bootstrap*. A sequência de *Geobacter sulfurreducens* foi escolhida como grupo externo.

Dentro do subgrupo formado pela família *Rhizobiaceae* foi observado que as estirpes se agruparam em maior número com as cepas de referência de *Rhizobium phaseoli* (15 estirpes), *Rhizobium laguerreae* (6 estirpes), *Rhizobium sp. CCBAU 03470* (4 estirpes) e *Rhizobium tropici* (4 estirpes). No subgrupo formado pela família *Bradyrhizobiaceae*, as estirpes se aproximaram das cepas de referência *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6 (1 estirpe) e *Bradyrhizabium elkanii* (1 estirpe). Dentro da classe *Betaproteobacteria* estão presentes os grupos formados pelas famílias *Burkholderiaceae* e *Oxalobacteraceae*.

No subgrupo formado pela família *Burkholderiaceae* as estirpes se agruparam próximo às cepas de referência de *Burkholderia fungorum* (2 estirpes) e *Burkholderia sabiae* (1 estirpe). No subgrupo da família *Oxalobacteraceae* uma estirpe se aproximou da cepa de referência *Herbaspirillum seropedicae*.

Quando comparamos o perfil das amostras no BOX-PCR com o agrupamento formado pelo sequenciamento parcial do 16S rRNA, conseguimos observar que das 15 estirpes que se aproximam de *Rhizobium phaseoli* na árvore do gene 16S rRNA com uma alta similaridade, nem todas apresentaram perfis de BOX-PCR agrupados com uma alta similaridade entre si. Ou seja, algumas amostras apresentaram uma similaridade através das sequências do gene 16S rRNA que não foi observada pelo perfil de BOX-PCR, uma vez que no dendograma estas estirpes ficaram separadas. E o mesmo comportamento é observado nos outros grupos formados, mostrando que embora tenham alta similaridade do gene 16S rRNA, essas estirpes apresentam diferenças genômicas que podem se expressar em capacidade adaptativa e eficiência simbiótica diferenciais.

#### 4.4. Análise do Sequenciamento Multilocus dos Genes *recA*, *dnaK* e *glnII*

Como não foi possível amplificar os três genes para todas as amostras, levamos em consideração para a construção das árvores filogenéticas apenas as amostras para as quais foi possível amplificar os três genes (Anexo C). Dessa forma continuamos com 43 amostras, todas pertencendo à família *Rhizobiaceae*. Dos genes analisados para as 43 amostras, o gene *recA* foi o mais conservado, apresentando a menor porcentagem de sítios parcimônia-informativos (26,3%). A proporção de sítios parcimônia-informativos foi um pouco maior para o gene *glnII* (27,3%). O gene *dnaK*, por sua vez, apresentou a maior porcentagem desses sítios, com 30,1%.

**Tabela 3.** Informação filogenética dos locus analisados.

Locus	Número de nucleotídeos			Total
	Conservados	Variáveis	Parcimônia-informativos	
<i>recA</i>	393(68,1%)	184(31,9%)	152(26,3%)	577
<i>dnaK</i>	197(64,4%)	109(35,6%)	92(30,1%)	306
<i>glnII</i>	415(65%)	223(35%)	174(27,3%)	638

Para a árvore gerada para o gene *recA* (Figuras 6 e 7) é possível observar a formação de 12 grupos com um “bootstrap” de 50 a 100%. O primeiro grupo foi formado com um “bootstrap” de 100%. Nele estão incluídas as estirpes BR 278, BR 276, BR 275, BR 256, BR 357, BR 271, BR 214, BR 222 e BR 281, as quais se aproximaram das estirpes N671 (CP013574.1), R744 (CP013522.1) e R744 (X62479.1) de *Rhizobium phaseoli*. A proximidade dessas estirpes com essa espécie foi observada na árvore do gene 16S rRNA, e também foi observada nas árvores geradas para os genes *glnII* (Figuras 8 e 9) e *dnaK* (Figuras 10 e 11). A única diferença foi quanto à topologia dessas árvores, ou seja, a posição dessas

estirpes dentro do grupo formado. Porém esse agrupamento conta com um suporte estatístico de 100% e 95% para as árvores dos genes *glnII* e *dnaK*, respectivamente.

As amostras BR 214, BR 222 e BR 281 formaram um subgrupo em todas as árvores com um suporte estatístico variando de 60% a 87%. Essas 3 amostras são provenientes do Brasil, sendo as estirpes BR 214 e BR 222 provenientes do Rio de Janeiro, enquanto a BR 281 é proveniente do Rio grande do Sul segundo as informações do Anexo A. As outras amostras pertencem a diferentes lugares: USA (BR 256), Inglaterra (BR 278), Colômbia (BR 276) e Brasil (BR 275 e BR 357).

O segundo agrupamento reuniu o *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* (CP007641.1) e *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (CP006986.1) com as estirpes BR 210 e BR 251. Na árvore do gene *dnaK*, as estirpes BR 210 e BR 251 formaram um agrupamento com a estirpe BR 212 e a estirpe de referência *Rhizobium* sp. (AJ431171.1) com um suporte estatístico de 88%. Já na árvore do gene *glnII*, as estirpes BR 210 e BR 251 ficaram agrupadas com as estirpes BR 282, além das estirpes de referência *Rhizobium etli* (JN580707.1), *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (CP006986.1) e *Rhizobium* sp. (JN580708.1).

Esse outro agrupamento com estirpes de referência *Rhizobium etli*, sendo elas *Rhizobium etli* (JN580646.1), *Rhizobium etli* bv. *mimosae* (CP005950.1), *Rhizobium etli* CFN 42 (CP000133.1) e *Rhizobium etli* (JN580626.1) além de *Rhizobium* sp (CP013595.1) e *Rhizobium* sp VLP1091 (KF638386.1), possui um suporte estatístico de 51%. Nesse grupo ficaram as amostras BR 264, BR 282, BR 285, BR 370 similar a árvore do gene *dnaK* e *glnII*, sendo que este segundo gene se diferenciou por colocar a estirpe BR 282 em outro grupo próximo a *Rhizobium etli*, já citado. Na árvore do gene 16S rRNA, a estirpe BR 264 ficou próxima a estirpe de referência de *Rhizobium phaseoli*.

O grupo seguinte, com um “bootstrap” de 91%, agrupou as estirpes de referência: *Rhizobium Leguminosarum* bv. *phaseoli* (JF792207.1), *Rhizobium Leguminosarum* bv. *trifolii* (KX487184.1) e *Rhizobium Leguminosarum* bv. *trifolii* (CP001191.1), *Rhizobium leguminosarum* vaf10 (CP016286.1) e o *Rhizobium* sp N941, formando um único grupo com essa espécie. Agruparam-se junto a elas as estirpes BR 292, BR 215, BR 268, BR 252, BR 250 e BR 258. O mesmo grupo foi observado nas árvores dos genes *dnaK* e *glnII* (“bootstrap” de 95% e 54%, respectivamente), diferenciando-se da árvore do gene *recA* pelo acréscimo das estirpes BR 224 e BR 249. Essas duas estirpes aparecem formando um grupo com um *Rhizobium* sp. (KF638386.1), mais próximas de estirpes de referência de *Rhizobium etli* com um suporte estatístico de 85%.

A estirpe BR 225 foi agrupada com uma estirpe de referência de *Rhizobium gallicum* na árvore de cada um dos três genes, porém a posição desse subgrupo foi diferente em cada árvore em relação à formação de dois grandes clados, um formado pelo grupo *R. phaseoli-R. etli-R. leguminosarum* e, o outro, por *R. tropici* e espécies relacionadas. Nas árvores dos genes *recA* e *dnaK*, essa estirpe ficou junto ao clado formado pelo grupo *R. phaseoli-R. etli-R. leguminosarum*. Porém, na árvore do gene *recA* ela ficou na parte externa do clado, enquanto na árvore do gene *dnaK* ela aparece dentro do grupo. Essa estirpe aparece mais próxima do grupo formado pelo *Rhizobium tropici* na árvore formada para o gene *glnII*.

O grupo seguinte aproximou as estirpes BR 939, BR 920, BR 295, BR 326 e BR 367 da estirpe de referência *Rhizobium leucaenae* (JF318193.1) com um suporte estatístico de 100%. Na árvore do gene *glnII* o grupo formado com também 100% de “bootstrap” aproximou essas estirpes, excluindo a BR 326, do *Rhizobium leucaenae* (JF318179.1). Diferindo desses genes, a árvore gerada pelo gene *dnaK* agrupou essas mesmas estirpes com a estirpe de referência *Rhizobium tropici* (EU488757.1) concordando com a árvore do gene 16S rRNA.

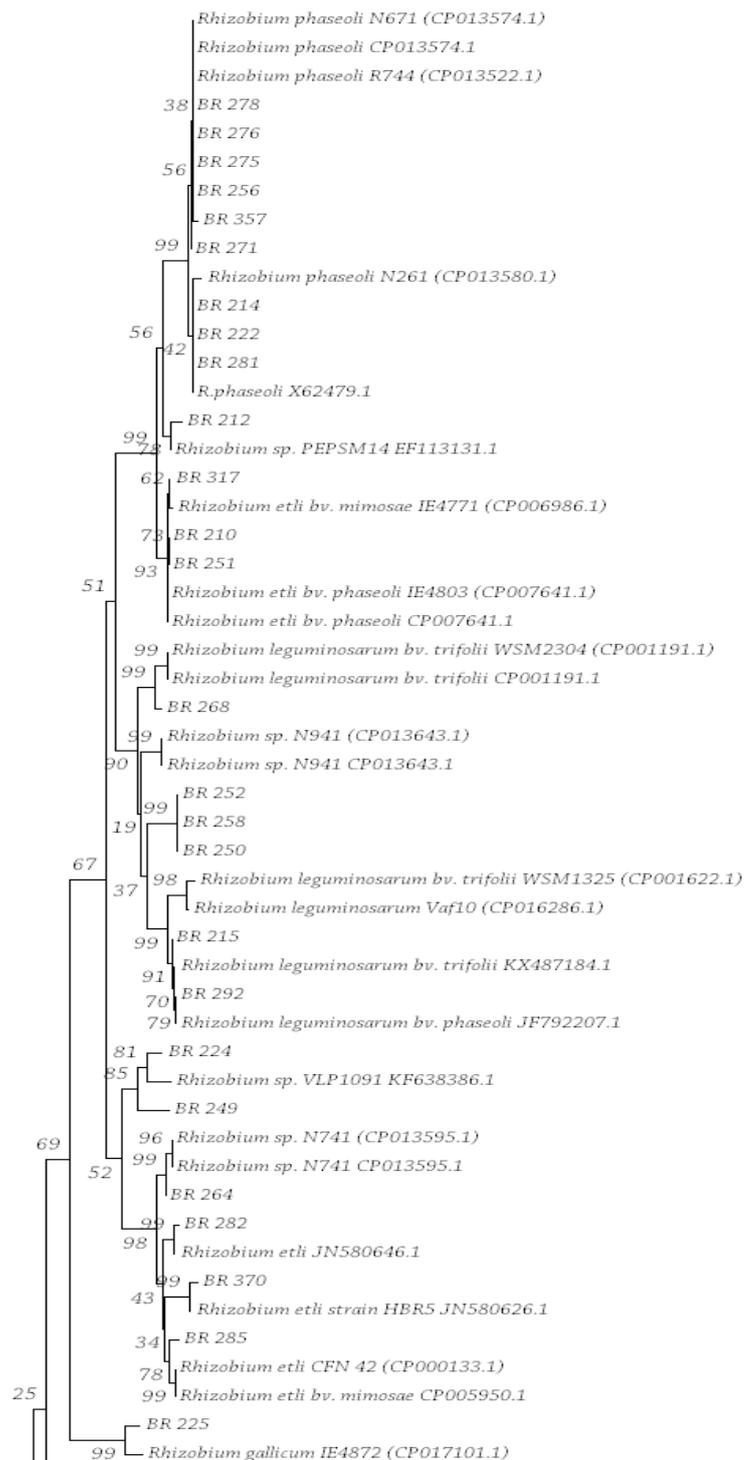
Outro agrupamento formado na árvore do gene *recA* com 86% de “bootstrap” aproximou as estirpes BR 219 e BR 362 do *Rhizobium calliandrae* (JX855191.1). Na árvore

do gene 16S rRNA, a estirpe BR 362 ficou próxima ao *Rhizobium calliandrae*, enquanto a BR 219 ficou próxima ao *Rhizobium jaguaris*. Na árvore do gene *dnaK*, as duas estirpes ficaram próximas à estirpe de referência de *Rhizobium tropici* com um suporte estatístico de 89% . Para o gene *glnII* a estirpe BR 219 ficou próxima a estirpe de referência de *Rhizobium mesoamericanum* (JF424617.1), enquanto que a estirpe BR 362 ficou próxima ao grupo formado com a estirpe *Rhizobium leucaenae* (JF318179), mas com um baixo suporte estatístico.

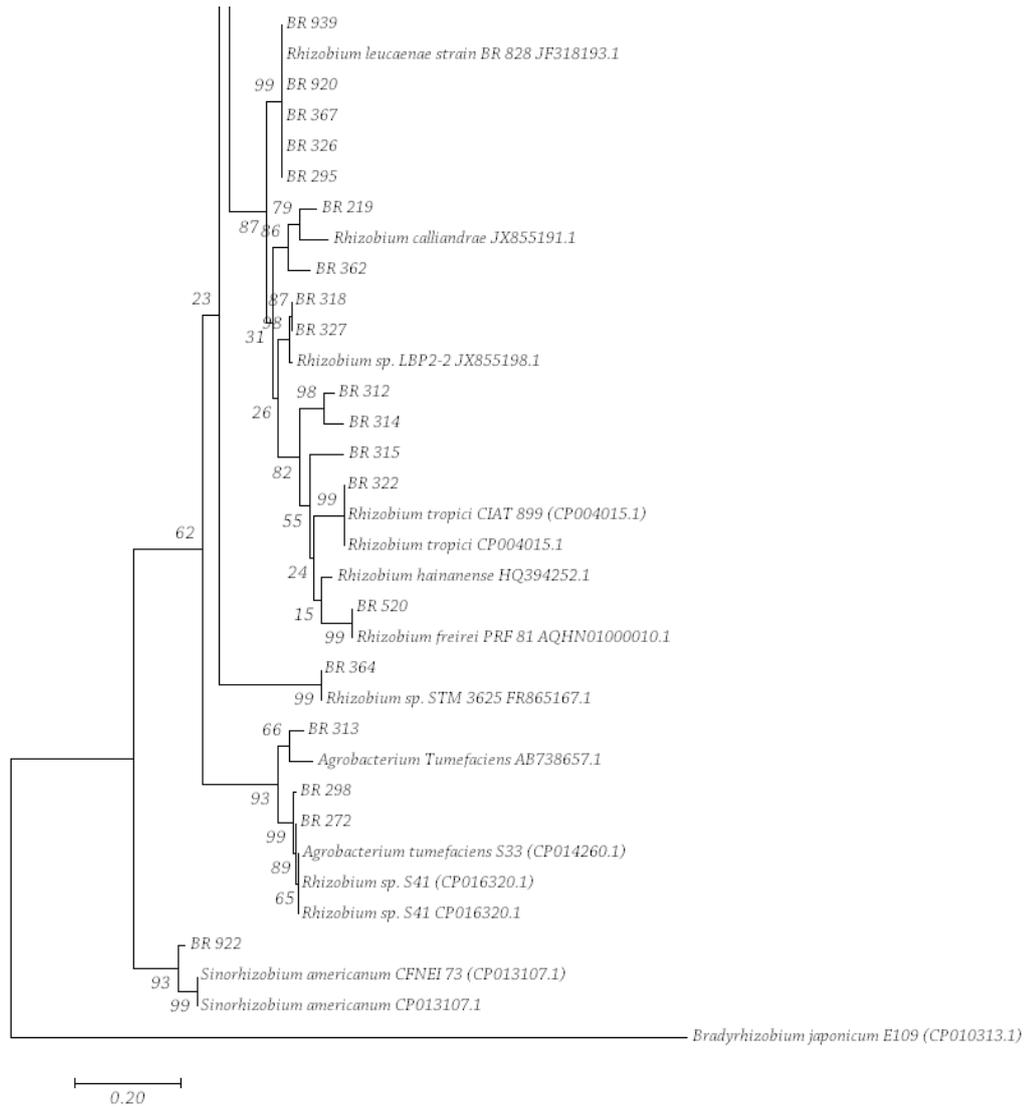
O próximo grupo, reuniu as estirpes BR 312, BR 314, BR 315 e as estirpes elite BR 322 e BR 520 com as estirpes de referência *Rhizobium tropici* (CP004015.1), *Rhizobium freirei* (AQHN01000010) e *Rhizobium hainanense* (HQ394252.1) com um suporte estatístico de 72%. A estirpe elite BR 322 se aproximou da estirpe de referência *Rhizobium tropici* e a BR 520 da *Rhizobium freirei*, como era de esperado, uma vez que essas estirpes são as recomendadas como inoculantes comercial, sendo que a BR322 é a CIAT 899 e a BR 520 é a PRF 81. As estirpes BR 312 e BR 314 ficaram próximas em todas as árvores com um alto valor de “bootstrap”, porém se aproximaram de estirpes de referência diferentes, dependendo da árvore gerada. A BR 315 ficou próxima a estirpe de referência *Rhizobium miluonense* em todas as árvores.

A estirpe BR 364 ficou próxima à estirpe de referência *Rhizobium sp.* (FR865167.1) na árvore do gene *recA*. Nas árvores dos genes *dnaK* e *glnII*, ela ficou próxima a estirpe de referência *Rhizobium mesoamericanum*. A estirpe BR 922 ficou próxima à estirpe de referência *Sinorhizobium americanum* em todas as árvores.

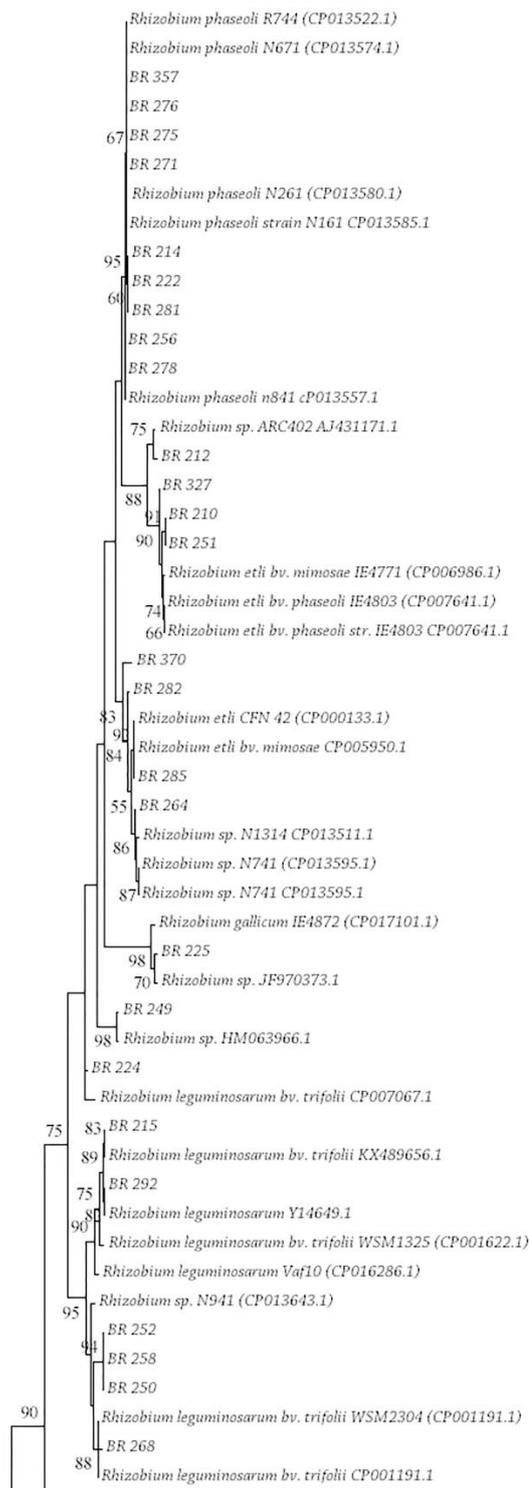
O grupo formado pelas estirpes BR 313, BR 298 e BR 272, com um suporte estatístico de 100%, ficou próximo da estirpe de referência *Agrobacterium tumefaciens* (AB738657) e *Rhizobium sp.* (CP016320.1). Nas árvores do gene *glnII* esse grupo ficou próximo das estirpes de referência *Rhizobium pusense* (HG326955) e *Agrobacterium genomosp 7* (HG326955.1), enquanto que na árvore do gene *dnaK* elas se agruparam com as estirpes de referência *Agrobacterium genomosp 7* (HG326893.1), *Rhizobium sp.* (HG518322.1) e *Agrobacterium tumefaciens* (CP014260.1). Com base no gene 16S rRNA as bactérias do gênero *Agrobacterium* foram agrupadas com estirpes do gênero *Rhizobium* (YOUNG et al., 2001).



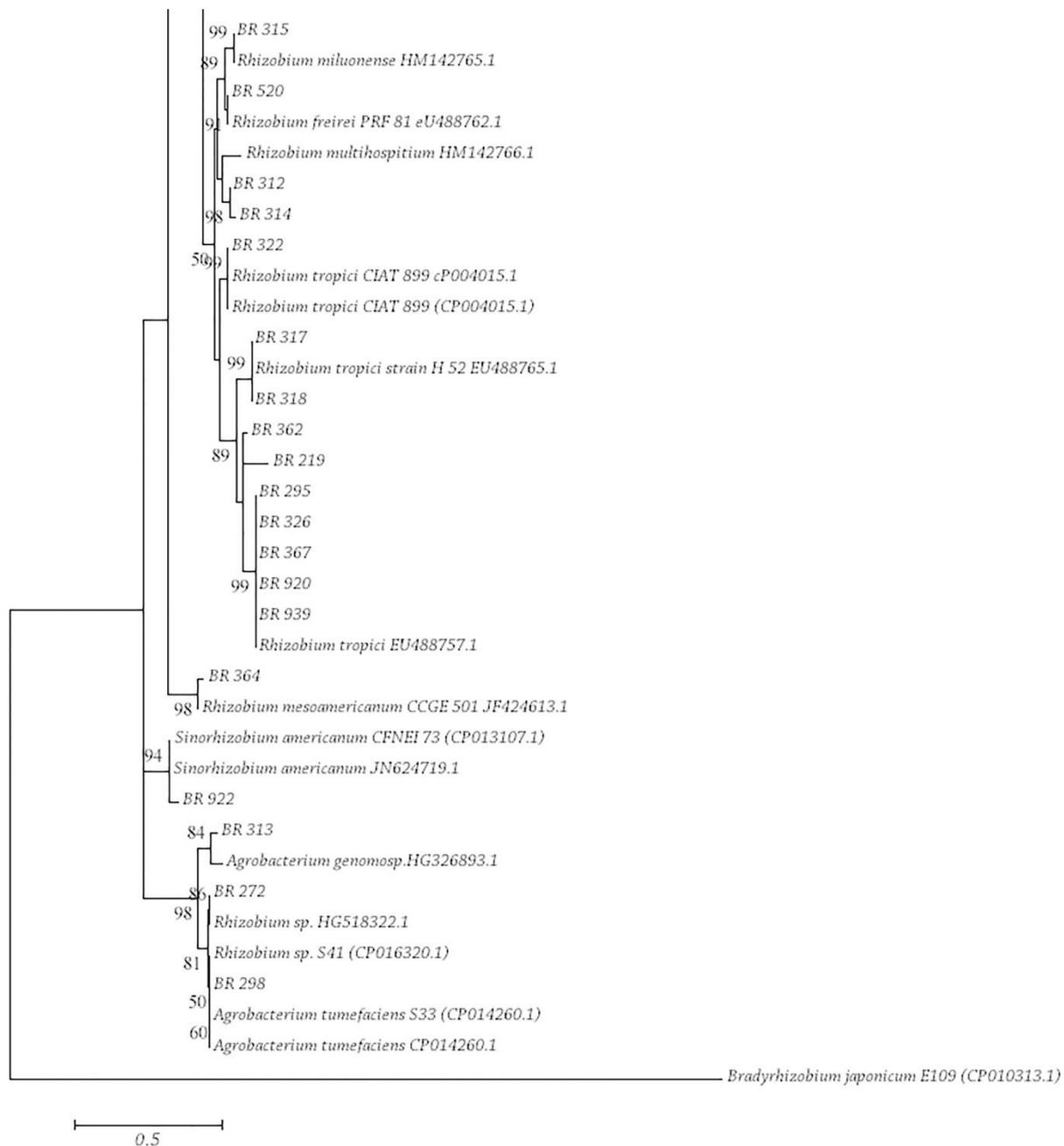
**Figura 6.** Relação filogenética (primeira parte) entre 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de seqüências do gene *recA* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com seqüências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A seqüência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo.



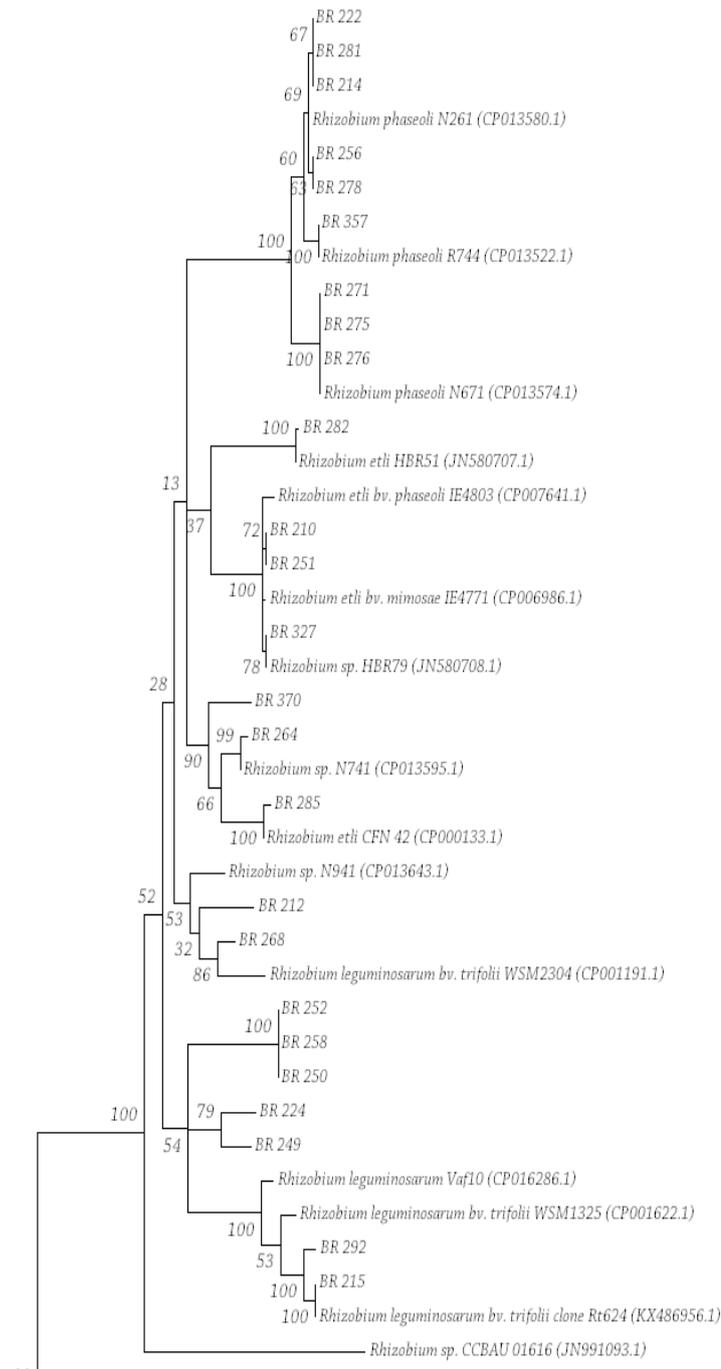
**Figura 7.** Relação filogenética (segunda parte) entre 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *recA* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo.



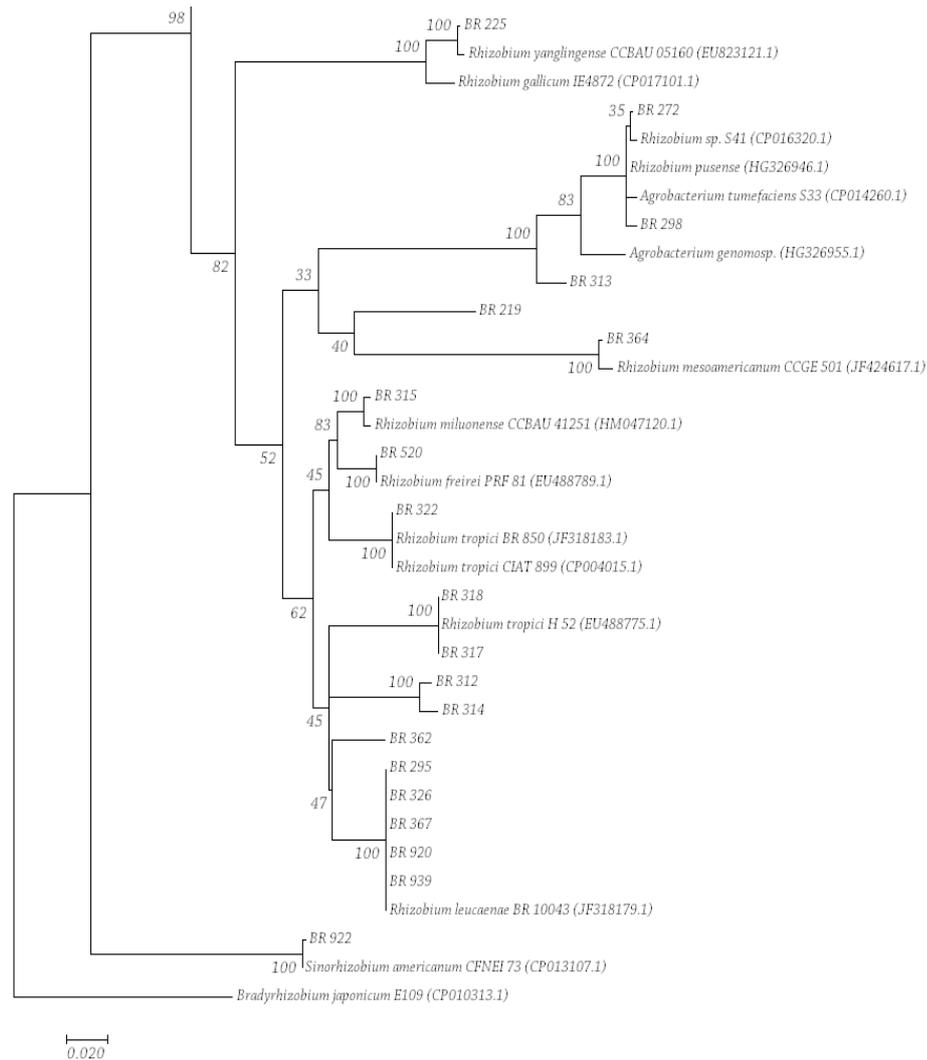
**Figura 8.** Relação filogenética (primeira parte) entre as 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *dnaK* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo.



**Figura 9.** Relação filogenética (segunda parte) entre as 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de seqüências do gene *dnaK* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com seqüências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A seqüência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo.



**Figura 10.** Relação filogenética (primeira parte) entre as 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de seqüências do gene *glnII* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com seqüências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A seqüência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo.



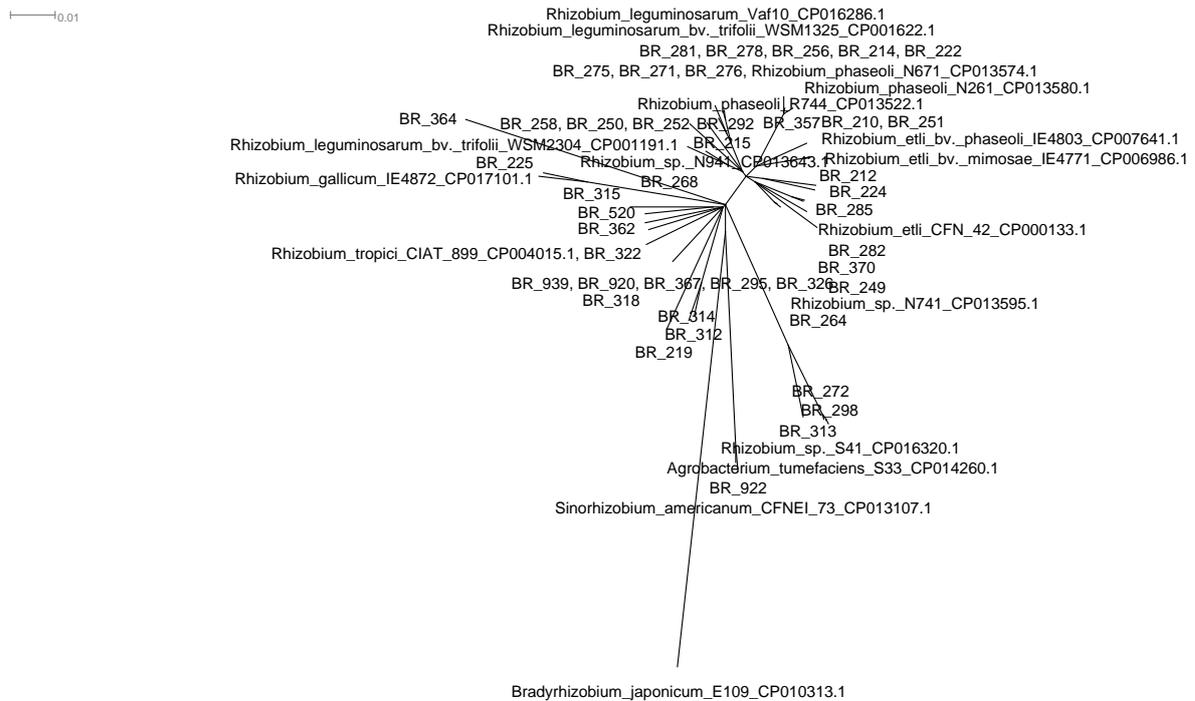
**Figura 11.** Relação filogenética (segunda parte) entre as 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *glnII* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima verossimilhança e a distância de Tamura-Nei foram utilizados para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo.

#### 4.5. Análise de Congruência e Visualização de Padrões de Recombinação

O teste de homogeneidade de partição (ou *incongruence length difference*, ILD) foi realizado com o programa PAUP\* 4.0b para verificar o grau de incongruência entre as árvores dos genes *recA*, *dnaK* e *glnII*. O resultado foi significativo ( $p \leq 0,01$ ), dessa forma indicando um alto grau de incongruência entre os dados. Esse resultado pode ser por causa de recombinação gênica entre as espécies ou transferência horizontal de genes. Utilizamos a análise de “split decomposition” (Figura 8) que foi realizada com todos os genes concatenados e concatenados em pares. Essas imagens mostram um grande número de caminhos paralelos de evolução das sequências, representados na forma de redes. Isso normalmente é observado quando se trata de incongruências nas partições de dados resultantes de eventos de recombinação (Brown et al., 2002; Dykhuizen & Green, 1991; Zhou et al., 1997).

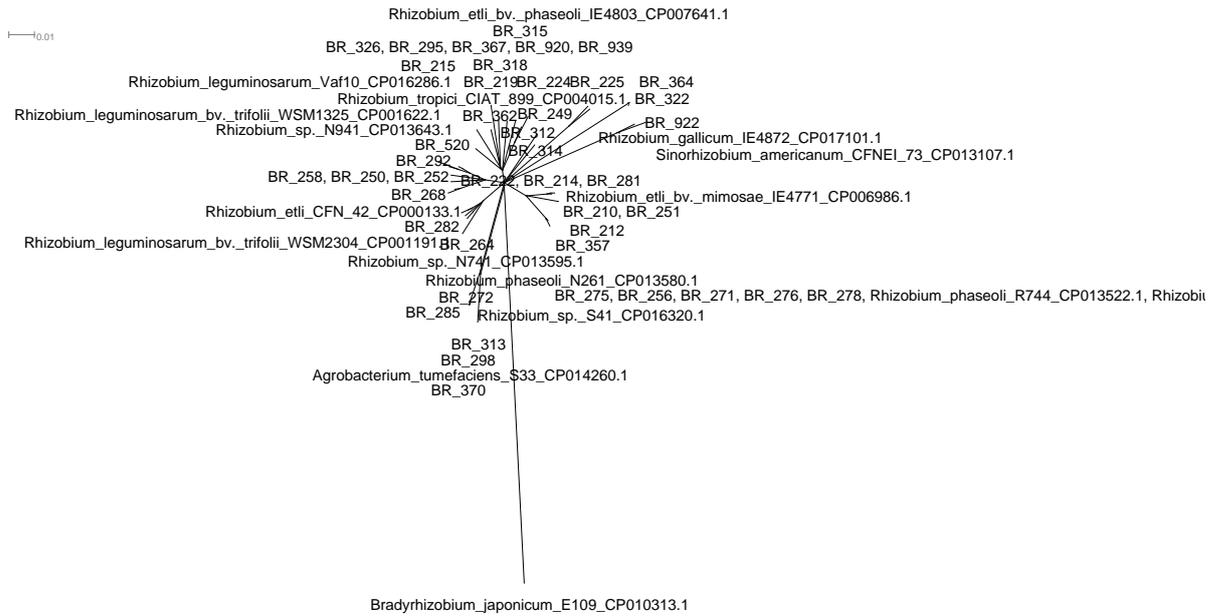
Com essas imagens dos genes *glnII* + *recA* e *dnaK* e *glnII* não foi possível observar os sinais filogenéticos conflitantes nos genes estudados. Na imagem do *dnaK* + *recA* podemos observar um evento de recombinação dentro do grupo formado pelas estirpes BR 272, BR 298, BR 313 que ficaram próximas a *Agrobacterium tumefaciens*. E também uma recombinação entre as BR 318 e BR 327. Na imagem do *dnaK* + *glnII* podemos observar um divisão na imagem formando claramente os dois grandes clados, de um lado o grande grupo formado pelos *R. phaseoli*, *R. etli* e *R. leguminosarum* e, do outro lado, o grupo formado pelo *R. tropici* e outras espécies próximas relacionadas.

*glnII* + *recA*



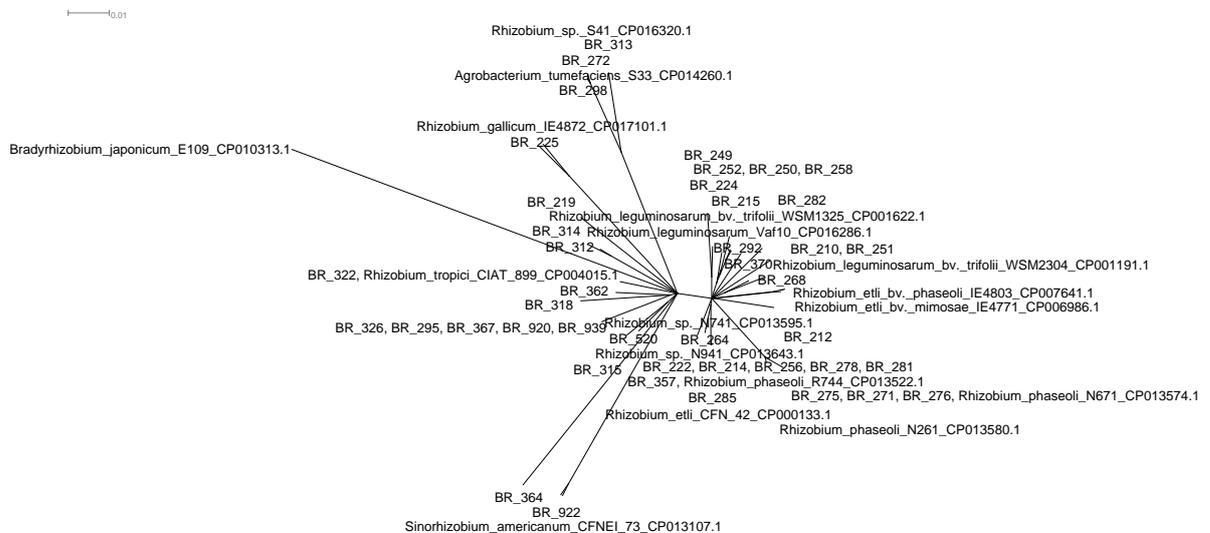
**Figura 12.** Árvores filogenéticas em redes (*split trees*) calculadas com o algoritmo de *split decomposition* com a transformação de Hamming, representando os caminhos paralelos de evolução encontrados entre as partições de dados para os genes concatenados dois a dois. (neste caso, *glnII* + *recA*).

*dnaK + recA*



**Figura 13.** Árvores filogenéticas em redes (*split trees*) calculadas com o algoritmo de *split decomposition* com a transformação de Hamming, representando os caminhos paralelos de evolução encontrados entre as partições de dados para os genes concatenados dois a dois. (neste caso, *dnaK + recA*).

*dnaK + glnII*



**Figura 14.** Árvores filogenéticas em redes (*split trees*) calculadas com o algoritmo de *split decomposition* com a transformação de Hamming, representando os caminhos paralelos de evolução encontrados entre as partições de dados para os genes concatenados dois a dois. (neste caso, *dnaK + glnII*).

## 5. DISCUSSÃO

Foi observada alguma variação morfocultural entre os isolados, sendo que a grande maioria das colônias apresentou características esperadas para o gênero *Rhizobium*, como crescimento rápido e acidificação do meio de cultura 79. Este resultado foi confirmado pela análise de sequências do gene 16S rRNA, a qual classificou esses rizóbios como pertencentes ao gênero *Rhizobium*. Apenas uma única estirpe de crescimento rápido foi classificada como sendo do gênero *Sinorhizobium*. Aguilar et al. (1998) sugere que no centro de origem o feijoeiro coevoluiu com o *Rhizobium* spp. resultando em uma associação simbiótica preferencial. Porém 5 estirpes tiveram crescimento diferente, apresentaram crescimento intermediário e lento e dentre as bactérias que apresentaram alteração do pH do meio entre neutro e alcalino estão presentes os gêneros *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* e *Sphingomonas*.

Aliado a isso, o crescimento lento é uma característica típica do gênero *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1982). Dentre as bactérias analisadas, aquelas dos gêneros *Sphingomonas*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Bacillus* e *Herbaspirillum* são provavelmente endófitos, não induzindo a formação de nódulos em leguminosas (BAI et al., 2002; DENG et al., 2011; CARRO et al., 2013; YIN et al., 2015). López-López et al. (2010) já reportaram a presença dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Kocuria*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* e *Staphylococcus* em sementes e/ou raízes de *P. vulgaris*. Inclusive um espécie de *Herbaspirillum* foi descrita a partir de isolados provenientes de nódulos do feijoeiro (VALVERDE et al., 2003) e Schmidt et al. (2011) verificaram a colonização endofítica das raízes de feijoeiro pela espécie *H. seropedicae*. Estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, são capazes de induzir a formação de nódulos no feijoeiro, porém estes são inefetivos (MICHIELS et al., 1998). Por sua vez, isolados do gênero *Burkholderia* são capazes de induzir a formação de nódulos efetivos (PEIX et al., 2010; TALBI et al., 2010) e recentemente foi relatado o predomínio de *Burkholderia* em nódulos de feijoeiro cultivado em solos ácidos de cerrado (DALL'AGNOL et al., 2016).

Com o perfil de BOX-PCR, pode-se observar a grande diversidade genotípica dentre as estirpes estudadas, com 63 grupos formados ao nível de 85% de similaridade. Contudo, estes grupos não corresponderam diretamente aos mesmos grupos obtidos pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Da mesma forma que nos trabalhos realizados por Menna et al., (2009) e Cassetari (2010), observou-se uma alta similaridade entre alguns perfis de BOX-PCR que com base no sequenciamento do gene 16S rRNA acabaram sendo classificados em taxa diferentes. Segundo BINDE et al. (2009) isso possivelmente ocorre porque diferentes regiões do genoma são estudadas em cada técnica. Enquanto a análise de BOX-PCR, explora a distribuição diferencial de elementos repetitivos dispersos ao longo do genoma (SAVELKOUL et al., 1999), a análise de sequenciamento do gene 16S rRNA se baseia nas diferenças existentes na sequência de um marcador molecular que é capaz de mostrar relações evolutivas até o nível de domínio. Esses autores relatam que, apesar da análise combinada de 16S rRNA e produtos de BOX-PCR poder gerar resultados mais acurados de filogenia e classificação taxonômicas, eles tiveram dificuldade de usar essa técnica de agrupamento para identificar espécies. Isso se contrapõe ao resultado obtido por Rademaker et al. (2000), que observaram uma forte correlação (0,779) dos resultados de BOX-PCR com os resultados de DNA-DNA para o gênero *Xanthomonas*, sugerindo ser ela uma técnica capaz de revelar relações genotípicas e filogenéticas verdadeiras (RADEMAKER et al., 2000).

Embora a BOX-PCR tenha a sua utilidade para identificação rápida de clones e para a discriminação no nível intraespecífico (VANDAMME et al., 1996; RADEMAKER & BRUIJN, 1997), os resultados aqui obtidos indicam que a interpretação dos resultados deve

ser feita com cautela quando a análise incluir indivíduos de espécies diferentes, mesmo que dentro de um mesmo gênero. Versalovic et al. (1994) afirmaram que essa técnica pode ser limitada e insuficiente para identificação de espécies de procariotos (VERSALOVIC et al. 1994) quando ocorrem elevadas taxas de transferência horizontal e, também, duplicações e deleções genômicas. Dessa forma essa técnica é utilizada somente em estudos de diversidade e não para identificação taxonômica (VERSALOVIC et al., 1991, 1994; de BRUIJIN, 1992). É importante ressaltar que os resultados da análise de sequenciamento multilocus (MLSA) do presente estudo indicam a ocorrência de recombinação gênica entre as espécies de *Rhizobium* representadas pelas estirpes aqui estudadas, o que corrobora a interpretação de Versalovic et al. (1994).

As sequências do gene 16S rRNA são apropriadas para separar os isolados em nível de gêneros e de espécies próximas, mas não são capazes de diferenciar estirpes de uma mesma espécie e grupos filogeneticamente muito próximos (COENYE et al. 2005). Isso foi corroborado, no presente trabalho, pela formação de agrupamentos filogenéticos com um suporte estatístico menor que 50%. Várias espécies foram agrupadas com alta similaridade pela análise filogenética do gene 16S rRNA, não podendo ser discriminadas entre si. Além disso, Gevers et al. (2005) aponta que, em análise com o gene 16S rRNA, é possível ser induzido a falsas interpretações mesmo existindo uma similaridade de 99% entre a estirpe estudada e uma estirpe tipo de referência. É sabido que o gene 16S rRNA não proporciona resolução suficiente para separar espécies de *Bradyrhizobium* (VINUESA et al., 2005). Próximo a isso temos a descoberta da estirpe comercial PRF 81 que era tida como um *R. tropici* com base na análise do gene 16S rRNA, porém observou-se que se tratava de uma espécie diferente após as análises fisiológicas e de MLSA (HUNGRIA et al., 2000).

Atualmente a MLSA é muito utilizada para diferenciar espécies de rizóbio, utilizando-se genes constitutivos como *atpD*, *glnII*, *recA*, *dnaK*, *gltA* e *rpoA* (GEVERS et al., 2005; VINUESA et al. 2005, MARTENS et al. 2008; RIBEIRO et al. 2009). A metodologia estabelecida por Maiden et al. (1998) e adaptada para a análise de sequências multilocus fazia uso de 7 genes constitutivos. Porém, no trabalho realizado por Konstantinidis et al. (2006) observou-se que três genes seriam suficientes para classificar estirpes adequadamente com alta correlação com comparações no nível do genoma. Dessa forma nesse trabalho utilizamos a análise de sequência multilocus dos genes *recA*, *glnII* e *dnaK* como uma alternativa de marcador filogenético para discriminar as estirpes estudadas.

Nas árvores geradas para cada gene observamos um grande clado formado pelo agrupamento *R. phaseoli-R. etli-R. leguminosarum*. López-Guerrero et al. (2012) relatam que as espécies *Rhizobium phaseoli* e *Rhizobium etli* constituem um único grupo com pouca diferenciação baseado na sequência do gene 16S rRNA e na relação de outros genes em seus genomas, chegando a considerar necessária a reclassificação de algumas estirpes de *R. etli* como *R. phaseoli*. Além disso, é conhecido que as espécies *R. leguminosarum* e *R. etli* são intimamente relacionadas (SANTILLANA et al., 2008). Essas duas espécies possuem 45% de homologia de DNA e homologia entre várias regiões cromossômicas (LAGUERRE et al., 1993), podendo sugerir uma transferência gênica e recombinação entre elas (AMARGER et al., 1997).

Dessa forma, o gênero *Rhizobium* se divide em dois grandes agrupamentos: o “Complexo de espécies de *Rhizobium leguminosarum*” e o “grupo de *Rhizobium tropici*” (RIBEIRO et al., 2012). Esses agrupamentos podem ser observados com clareza na árvore do gene *glnII* com um “bootstrap” de 100% para o grupo intimamente relacionado com o *Rhizobium leguminosarum* e 82% para o grande grupo formado com as estirpes de *Rhizobium tropici*. Nas árvores dos outros genes é possível também observar essa formação, mas com algumas diferenças no grupo formado pelo *Rhizobium tropici*.

Ormeño-Orrillo et al. (2015), durante suas análises com o genoma do *Rhizobium gallicum* R602sp, observaram sequências divergentes em todos os genes estudados e que com isso o *Rhizobium gallicum* ficou agrupado dentro do clado do *R. leguminosarum*. Em outro trabalho, Ribeiro et al. (2013) construíram uma árvore concatenando os genes *recA*, *glnIII*, *gyrB* e *rpoA* e a estirpe de *Rhizobium gallicum* também se posicionou no clado formado pelo grupo *R. phaseoli-R. etli-R. leguminosarum*.

É importante observar que o *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* que ficou intimamente relacionado com as estirpes BR 268 e BR 215 é considerado como uma espécie de *Rhizobium* que possui um hospedeiro específico: no caso dessa espécie seu hospedeiro é considerado o trevo (*Trifolium* spp.) (HIRCH et al., 2001). Porém, essas estirpes foram isoladas e depositadas na coleção como oriundas de nódulos de feijoeiro. Confirmando o que encontramos, o trabalho realizando por Abril et al. (2003) isolou estirpes do feijoeiro na Argentina e que foram identificadas como sendo *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

É sugerido que o *Rhizobium tropici* tem seu centro de origem na América do Sul (Martínez-Romero et al., 1991). Esta espécie é amplamente conhecida por demonstrar elevada eficiência e competitividade (MERCANTE et al. 2006) e, através de análises moleculares, foi observado que essa espécie é intimamente relacionada com *Rhizobium multihospitium* (Han et al, 2008), *Rhizobium miluonense* (Gu et al., 2008) e *hainanense* (Chen et al., 1997), sendo que estas estirpes foram isoladas de províncias da China. A Proximidade das estirpes elite com representantes de pelo menos uma dessas espécies foi observada na árvore de cada gene e na árvore do gene 16S rRNA. Dentre essas estirpes está a BR 315, podendo ser uma estirpe interessante para estudos de seleção de fixadoras de nitrogênio para inoculantes. A espécie de *Rhizobium leucaenae* é relativamente recente, tendo sido descrita no trabalho realizado por Ribeiro et al. (2012) com a reclassificação de estirpes de *Rhizobium tropici*. Esse agrupamento e os dois seguintes fazem parte do grande clado do *Rhizobium tropici*.

As estirpes BR 313, BR 298 e BR 272, se mostraram próximas de *Agrobacterium*. Mrabet et al., (2006) mencionam em seu trabalho que a inoculação com agrobactérias não nodulantes isoladas de feijão pode ter um efeito negativo sobre a planta, sendo observado principalmente na taxa de nodulação. Além disso, eles observaram que as agrobactérias tiveram um efeito inibitório quanto à estirpe que inoculou a planta, sendo o *R. gallicum* reprimido em detrimento do *S. Medicae*.

Após gerar cada árvore, foi realizado o teste IDL para confirmar a possibilidade de concatenação dos alinhamentos de cada gene. Esse é um teste muito utilizado, pois permite testar se partições são homogêneas a ponto de poderem ser combinadas, porém não mede a contribuição de cada partição nem serve como critério para saber de uma das partições deve ser ignorada ou se deve receber peso menor na análise (Bull et al., 1993; de Queiroz et al., 1995; gatesy et al., 1999; Salle & Brower. 1997).

O resultado obtido indicou que os genes mostram histórias evolutivas distintas, o que segundo alguns autores indica que não poderiam ser concatenados. Além disso, o teste de Shimodaira-Hasegawa (1999) indicou que as topologias das árvores com os diferentes genes não são congruentes. Estes resultados mostram que os genes utilizados apresentam sinais filogenéticos diferentes. Isto pode estar relacionado com algum evento de recombinação ou transferência horizontal de genes. Esses eventos são capazes de resultar em alterações abruptas na estrutura e organização do genoma de uma bactéria, promovendo um “salto genético” ou seja, sendo capaz de gerar novas estirpes bacterianas através dessas mudanças no genoma (Falkow, 1996). Porém as mudanças que ocorreram ou gene adquirido tem que persistir no cromossomo do organismo em questão e promover a ele algum benefício seletivo (Lawrence, 1999).

Genes que participam de sistemas complexos, como transcrição, tradução e processos relacionados (informativos) são raramente transferidos, sendo que seus produtos são menos

prováveis de funcionar efetivamente em um citoplasma estranho (JAIN et al., 1999). Já genes constitutivos podem sofrer transferência horizontal mais frequentemente (Rivera et al., 1998).

Com a análise de “split decomposition” foi possível observar a formação de redes apenas no grupo formado com a estirpe de referência de *Agrobacterium tumefaciens*, que indicou a existência de caminhos evolutivos alternativos. Embora não seja uma causa exclusiva, a transferência horizontal e recombinação genética são possíveis explicações para o padrão observado. A transferência horizontal dentro da população é bem conhecida por produzir topologias incongruentes para a relação intraespecífica de bactérias com base na análise de sequência multilocus (Brown et al., 2002; Dykhuizen & Green, 1991; Escobar-Páramo et al., 2004).

## 6. CONCLUSÕES

A caracterização das estirpes isoladas de feijoeiro através da caracterização morfológica das colônias, do sequenciamento do gene 16S rRNA e, sobretudo, da análise de sequenciamento multilocus mostrou a existência de uma alta diversidade genética na coleção de rizóbios analisada, sendo possível identificar que 82% das estirpes são pertencentes ao gênero *Rhizobium*. Porém existem algumas bactérias pertencentes a gêneros como *Sphingomonas*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Bacillus* e *Herbaspirillum*.

A análise de cada gene constitutivo permitiu agrupar as estirpes próximas a estirpes de referência, permitindo melhorar as definições das relações filogenéticas, uma vez que obtivemos a formação de grupos nas árvores que se mostraram bastante consistentes. Além disso, temos estirpes que sempre ficaram próximas apenas de uma estirpe de referência como a BR 225, que em todos genes ficou próxima à estirpe de *R. gallicum*, a estirpe BR 922 com *Sinorhizobium americanum*. Dessa forma foi possível classificar as estirpes estudadas como pertencentes às espécies *R. phaseoli*, *R. etli*, *R. leguminosarum*, *R. gallicum*, *R. leucaenae*, *R. tropici*, *R. mesoamericanum*, *S. Americanum* e *Agrobacterium tumefaciens*.

Os genes estudados mostram históricos evolutivos diferentes e os dados indicam a ocorrência de possíveis eventos de recombinação, porém só observamos sinais filogenéticos conflitantes no grupo formado com a estirpe de referência *Agrobacterium tumefaciens*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRIL, A.; ZURDO-PIÑEIRO, L.; PEIX, A.; RIVAS, R. & VELÁZQUEZ. Solubilization of phosphate by a strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* isolated from *Phaseolus vulgaris* in El Chaco arido soil (Argentina). **First international meeting on Microbial phosphate solubilizations** 135-138. 2003.
- AGUILAR, O. M.; LOPEZ, M. V.; RICCILLO, P. M.; GONZALEZ, R. A.; PAGANO, M.; GRASSO, D. H.; PUHLER, 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 Microbiology**, Reading, v. 64, p. 3520-3524, 1998.
- AGUILAR, O. M.; RIVA, O.; PELTZER, E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A**, Washington, v. 101, n. 37, p. 13548-13553, 2004.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. E LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology** 215:403-410. 1990.
- AMARGER, N. Rhizobia in the field. **Advances in Agronomy**, v. 73, p.109–168, 2001.
- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M. R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 161, p. 147-156, 1994.
- AMARGER, N.; GENIAUX, E.; LAGUERRE, G. 1995. *Rhizobium* associated with field-grown *Phaseolus vulgaris*. In: **International Symposium On Microbial Ecology**, 7., 1995, Santos. Abstracts. São Paulo: SBM, 1995. Abst. P2-14.1.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 996-1006, 1997.
- AMARGER, N.; MAZURIER, S.I.; GENIAUX, E.; LAGUERRE, G. Indigenous populations of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris*. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., eds. **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.593.
- ANTUNES, J.E.L. Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) Dissertação (mestrado em Agronomia – Produção vegetal) Universidade Federal do Piauí, Piauí, maio, 2010.
- ARAUJO, R.S.; HENSON, RA. Fixação biológica de nitrogênio In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M., YAMADA, T. (eds). **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p. 213-227.

- AYANANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYMON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.4016-4021, 1995.
- BAI, Y., D'AOUST, F., SMITH, D.L., DRISCOLL, B.T. Isolation of plant-growth-promoting Bacillus strains from soybean root nodules. **Can J Microbiol**. 2002 Mar;48(3):230-8.
- BEEBE, S.; RENGIFO, J.; GAITAN, E.; DUQUE, M. C.; TOHME, J. Diversity and origin of Andean Landraces of common bean. **Crop Sciences**, Madison, v.41, n.3, p.854-862, 2001.
- BERNAL, G., GRAHAM, P.H., Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. **Can. J. Microbiol.** 47, 526e534.2001.
- BINDE, D.R, MENNA, P., BANGEL, E.V., BARCELLOS, F.G., HUNGRIA, M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobia strains. **Appl Microbiol Biotechnol** (2009) 83:897–908.
- BLISS, F.A. Breeding common bean for improvement of biological nitrogen fixation. **Plan and Soil**, Dordrecht, v. 152, n.1,p.71-79, 1993.
- BOREM, A.; SANTOS, F.R. **Biotecnologia Simplificada**. 2. Ed Viçosa. UFV, 2004.
- BROWN, E.W., KOTEWICZ, M.L., CEBULA, T.A., Detection of recombination among *Salmonella enterica* strains using the incongruence length difference test. **Mol. Phylogenet. Evol.** 24, 102–120. 2002.
- BULL, J.J.; HUELSENBECK, J.P.; CUNNINGHAM, C.W.; SWOFFORD, D.; WADDELL, P.J. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. **Systematic Biology** 42: 384-397;1993.
- BURLE, M.L.; FONSECA, J.R.; KAMI, J.A.; GEPTS, P. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, v.121, p.801-813, 2010.
- CASSETARI, A. DE S. **Diversidade de bactérias diazotróficas nodulífera na mata Atlântica**. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2010.
- CHEN, W. M.; JAMES, E. K.; COENYE, T.; CHOU, J. H.; BARRIOS, E.; DE FARIA, S. M.; ELLIOTT, G. N.; SHEU, S. Y.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 56, n. 8, p. 1847-1851, Aug. 2006.
- CHEN, W. X.; TAN, Z. Y.; GAO, J. L.; LI, Y.; WANG, E. T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, n. 3, p. 870-873, July 1997.
- CHEN, W.-M.; LAEVENS, 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, p.1729-1735, 2001.

CHEN, W.-M.; WU, C.H.; JAMES, E. K.; CHANG, J-S. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 151, n. 2-3, p. 364-371, Mar. 2008.

COENYE, T.; GEVERS D.; Van de PEER Y.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, 147–167. 2005.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Brasília: Conab, 2015.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo levantamento, julho de 2012. Brasília: Conab, 2012.

COUTINHO, H. L. C. 2003. Biodiversidade: perspectivas e oportunidades biotecnológicas. Disponível em <<http://www.bdtfat.org.br/publicações/padct/bio/cap9/1/>> Acesso em: 12 junho de 2015.

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

DALL'AGNOL, R. F.; PLOTEGHER, F.; SOUZA, R. C.; MENDES, I. de C.; REIS JUNIOR, F. B. dos; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. *Paraburkholderia nodosa* is the main N<sub>2</sub>-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian 'Cerradão'. **FEMS Microbiology Ecology**, 2016, v. 92, n. 8, 14 p., nov. 2016.

DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacterial. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2180-2187, 1992.

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; LINDSTRÖM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 369-382, 1998.

DE QUEIROZ, A.; DONOGHUE, M.J.; KIM, J. 1995. Separate versus combined analysis of phylogenetic evidence. **Annual Review of Ecology and Systematics** 26: 657-681.  
DELAMUTA J.R.M., RIBEIRO R.A., ORMEÑO-ORRILLO E., MELO I.S., MARTÍNEZ-ROMERO E., HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.63, p.3342-3351, 2013.

DENG, Z., S., ZHAO, L. F., KONG, Z. Y., YANG, W. Q., LINDSTRÖM, K WANG, E. T. & WEI, G. H. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. **FEMS Microbiol Ecol** 76 (2011) 463–475.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**. v. 26, n. 3, p. 297–302, 1945.

DRANCOURT, M.; ROUX, V.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. rpoB gene sequence based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.497–504, 2004.

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

DYKHUIZEN, D.E., GREEN, L., Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. **J. Bacteriol.** 173, 7257–7268. 1991.

EADY, R.R. The Mo-, V-, and Fe- based nitrogenase systems of *Azotobacter*. **Advances in Inorganic Chemistry**, San Diego, v.36, p.77–102, 1991.

EDGAR, ROBERT C. MUSCLE. A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**. 2004 Aug 19;5:113.

ESCOBAR-PÁRAMO, P., SABBAGH, A., DARLU, P., PRADILLON, O., VAURY, C., DENAMUR, E., LECOINTRE, G., Decreasing the effects of horizontal gene transfer on bacterial phylogeny: the *Escherichia coli* case study. **Mol. Phylogenet. Evol.** 30, 243–250. 2004.

FALKOW, S. The evolution of pathogenicity in *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: NEIDHARDZ, F., C. (Ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: **Cellular and Molecular Biology**. Washington: American Society for Microbiology Press, 1996, p. 2723–2729.

FARRIS, J.S., KALLERSJÖ, J., KLUGE, A.G., BULT, C., Testing significance of congruence. **Cladistics** 10, 315–319.1995.

FERNANDES JUNIOR, P.I., REIS, V. M. Algumas limitações à fixação Biológica de Nitrogênio em leguminosas. Seropédica Embrapa agrobiologia (Embrapa CNPAB. Documentos, 252). 2008.

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**, Brasília, v. 38, n. 7, July 2003.

FLORENTINO, L. A.; GUIMARAES, A. P.; RUFINI, M.; SILVA, K.; MOREIRA, F. M. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667–676, Sept. 2009.

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

FRED, E.B., BALDWIN, I.L. AND MCCOY, E. *Root Nodule Bacteria of Leguminous Plants*. **University of Wisconsin Press**, Madison, USA. 1932.

FREIRE, J. **Microbiologia do solo**. Porto Alegre: UFRGS, 1975.

GATESY, J., O'GRADY, P., BAKER, R.H. Corroboration among data sets in simultaneous analysis: Hidden support for phylogenetic relationships among higher level *Artiodactyla* taxa. **Cladistics** 15: 271-313. 1999.

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

GENIAUX, E.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ, E. Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v.45, p.392-394, 1995.

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

GRAHAM PH, VANCE CP, 2000, "Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs", **Field Crops Research**, 65, n.2-3, 93-106, 2000.

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.

GU, C. T., WANG, E. T., TIAN, C. F., HAN, T. X., CHEN, W. F., SUI, X. H. & CHEN, W. X. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. **Int J Syst Evol Microbiol** 58, 1364–1368. 2008.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl.Acids. Simp.** Ser. 41:95-98. 1999.

HAN, T. X., WANG, E. T., WU, L. J., CHEN, W. F., GU, J. G., GU, C. T., TIAN, C. F. & CHEN, W. X. *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. **Int J Syst Evol Microbiol** 58, 1693–1699. 2008.

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

HERNANDEZ-LUCAS, I.; SEGOVIA, L.; MARTÍNEZROMERO, E. & PUEPPKE, S.G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium spp.* That nodulates *Phaseolus vulgaris* L. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61:2775-2779, 1995.

HIDALGO, R. CIAT's World *Phaseolus* Collection. In: SCHOONHOVEN, A van, VOYSEST, O. (ed.) Common Beans: research for crop improvement. **Wallingford: CAB International**, p. 163-198, 1991.

HIRCH, A.M.; LUM, M.R.; DOWNIE, J.A. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? **Plant Physiology**, v127(4), p.1484-1492, 2001.

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.

HUNGRIA, M., VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Res.** v.65, n.2, p.151-164, mar. 2000.

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

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; SANTOS, J.C.F. Ecologia microbiana em solos sob cultivos na Região Sul do Brasil. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. (Ed.) **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, p.234- b270. 1995.

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

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C. Efeito da manipulação de fotossintatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 9-24, 1986.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAÚJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M., (Ed.). *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p. 188-294. 1997.

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

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

HUSON, D.H.,. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. **Bioinformatics** 14, 68–73. 1998.

JAIN, R.; RIVERA, M. C.; LAKE, J.A. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. Proceedings of the National. **Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 96, p.3801–3806, 1999.

JARVIS, B. D. W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W. X.; NOUR, S. M. FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesohizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.895-898, 1997.

JORDAN, D. C. *Rhizobium*. In: KRIEG, N. R. e HOLT, J. G. Bergey's **Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 235-242. 1984.

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

JORGE, J.A. **Solo: manejo e adubação**. 2a ed. São Paulo. Nobel, 1988.

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

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

LAGUERRE, G.; FERNANDEZ, M. P.; EDEL, V.; NORMAND, P.; AMARGER, N. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, p. 761-767, 1993.

LAWRENCE, J. G. & ROTH, J. R. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. **Genetics, Pittsburgh**, v. 143, p.1843–1860, 1996.

LEWIS G, SCHRIRE B, MACKINDER B & LOCK M 2005. Legumes of the world. **Kew publishing** 592p; LLORET, L.; ROMERO, E.M. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. **Revista latinoamericana de Microbiología**, 47, 43-60, 2005.

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

LÓPEZ-LÓPEZ A., ROGEL M.A., ORMEÑO-ORRILLO E., MARTÍNEZ-ROMERO J., MARTÍNEZ-ROMERO E. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. **Syst. Appl. Microbiol.** 33: 322-327. 2010.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMA; BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JOBB, G.; FÖRSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A. W.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST R.; KÖNIG, A.;

LISS, T.; LÜBMAN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, ROBERT STREHLOW, ALEXANDROS STAMATAKIS, NORBERT STUCKMANN, B.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE A. & SCHLEIFER, K.-H. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**. v. 32, n. 4., p.1363-1371, 2004.

MACIEL F.L, ECHEVERRIGARAY S, GERALD L.T.S, GRAZZIOTIN F.B Genetic relationships and diversity among Brazilian cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by AFLP markers. **Genet Res Crop Evol** 50:887–893. 2003.

MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A. B.; FEIL, E; MORELLI, G.; RUSSELL, J.E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D.A.; FEATHERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.95, p.140–3145, 1998.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Perfil do feijão no Brasil. Disponível em . Acesso em 25 de outubro de 2012.

MARTENS M, DAWYNDT P, COOPMAN R, GILLIS M, DE VOS P AND WILLEMS A Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **Int J Syst Evol Microbiol** 58:200-214. 2008.

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

MARTÍNEZ, E.; PALACIOS, R.; SÁNCHEZ, F. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens*, harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.169, p.2828-2834, 1987.

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

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

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

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

MERCANTE, F. M.; GOI, S. R.; FRANCO, A. A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **Revista Universidade Rural**, Rio de Janeiro, v. 22, n.1, p. 65-81, 2002.

MERCANTE, F.M.; OTSUBO, A.A. & LAMAS, F.M. Inoculação de *Rhizobium tropici* e aplicação de adubo nitrogenado na cultura do feijoeiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DE SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 27.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 11.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 9.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 6., 2006, Bonito, MS. Fertbio 2006: A busca das raízes. Dourados, Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. CD-ROM. (Documentos, 82).

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do solo. 2.ed. atual. E ampl., Lavras: Editora UFLA, 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**, v. 73, n. 2, p. 121–132, 2002.

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

MOUSAVI, S.A., OSTERMAN, J., WAHLBERG, N., NESME, X., LAVIRE, C., VIAL, L., PAULIN, L., DE LAJUDIE, P., LINDSTROM, K. Phylogeny of the *Rhizobium*–*Allorhizobium*–*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. **Syst. Appl. Microbiol.** 37, 208–215. 2014.

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** n. 56, p. 304–309, 2006.

NASER, S. M., THOMPSON, F. L., HOSTE, B., GEVERS, D., DAWYNDT, P., VANCANNEYT, M., SWINGS, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. **Microbiology**, 151: 2141–2150. 2005.

NEVES, M.C.P.; RUMJANECK N. G. Bioquímica e fisiologia da fixação de nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. Microbiologia do solo. Campinas: SBCS, p. 141-155. 1992.

OLIVEIRA, I.P.; THUNG, M.D.T. Nutrição mineral in: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M.; YAMADA, T (eds). Cultura do feijoeiro: Fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS, P. 175-212. 1988.

PARRA, M.S. Nutrição e Adubação. In: IAPAR. O feijão no Paraná. Londrina: IAPAR, 1989. P.79-100.

PEIX, A., MATEOS, P.F., RODRIGUES-BARRUECO, C., MARTINEZ-MOLINA, E., VELAZQUE, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry** 33 1927-1935, 2011.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO- MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 56, n. 8, p. 1931-1937, Aug. 2006.

PERRET, X., STAHELIN, C.; BROUGHTON, W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64: 180 – 201, 2000.

PRUESSE, E., PEPLIES, J. AND GLÖCKNER, F.O. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. Opens external link in new window **Bioinformatics**, 28, 1823-1829. 2012.

RADEMAKER, J. L. W.; de BRUIJN, F. J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLE, G.; GRESSHOFF, P. M. **DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews**, pp. 151–171. New York : John Wiley, 1997.

RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. L.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; de BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 665-677, 2000.

RAMOS, P.L. **Taxonomia do gênero *Stenotrophomonas* através de Multi locus sequence Analysis (MLSA)**. Tese de doutorado. USP – São Paulo, 2007.

REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen- fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 54, n. 6, p. 2155-2162, Nov. 2004.

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

RIBEIRO, R.A.; BARCELLOS, F.G.; THOMPSON, F.L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus*

*Vulgaris L.*) Reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, 160 p. 297-306. 2009.

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

RICHETTI, A.; DE MELO, C. L. P.; DE SOUSA, J. P. B. Viabilidade Econômica da Cultura do Feijão Comum, Safra 2012, em Mato Grosso do Sul. Dourados-MS: Embrapa Agropecuária oeste, 2011. 9p. (Comunicado Técnico).

RIVERA, M.C.; JAIN, R.; MOORE, J.E.; LAKE, J.A. Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Washington, v. 95, p.6239–6244, 1998.

RODRIGUES, T.B. Diversidade metagenômica microbiana de biomas terrestres e marinhos. 2011. 250 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, ago. 2011.

ROSOLEN, C.A.; MARUBAYASHI, O.M. Seja o doutor do seu Feijoeiro. Arquivo do agrônomo, n. 7, Piracicaba: **POTAFOS**, 1994.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.39-67, 2001.

RUMJANEK, N.G. & XAVIER, G.R. Inoculação do feijão-caupi: uma tecnologia que garante aumento real na produtividade. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&idT=883>. Acesso em: 01 out. 2015.

SALLE, R.; BROWER, A.V.Z. Process partitions, congruence, and the independence of characters: Inferring relationships among closely related *Hawaiian Drosophila* from multiple gene regions. **Systematic Biology** 46: 751-764. 1997.

SALVADOR, CARLOS A. Análise da conjuntura agropecuária safra 2011/12.SEAB, 2011.Disponível em: Acesso em 30 de abril de 2014.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001. 745 p.

SANTILLANA, N.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E.; ZÚÑIGA, D. Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* genes and 16S– 23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 189, p. 239–247, 2008.

SAVELKOUL, P. H. M.; AARTS, H. J. M.; de HASS, J.; DIJKSHOORN, L.; DUIM, B.; OTSEN, M.; RADEMAKER, J. L. W.; SCHOOLS, L.; LENSTRA, J. A. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3083-3091, 1999.

SAWADA H, SUZUKI F, MATSUDA I AND SAITOU N. Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. **J Mol Evol** 49:627- 644. 1999.

SCHLEIFER K.H. Classification of *Bacteria* and *Archaea*: Past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**. v.32, p.533-542, 2009.

SCHMIDT, SOUZA, E.M.; BAURA, V.; WASSEM, R.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.44, p. 182-185, 2011.

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.

SHIMODAIRA, H.; HASEGAWA, M. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 8, p. 1114-1116. 1999.

SHIRAISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the *Gammaproteobacteria Pseudomonas* sp. and the *Betaproteobacteria Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 269-274, 2010.

SILVA, C.; VINUESA, P.; EGUIARTE, L.E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SOUZA, V. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* Nodulate Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed Milpa plot in México: population genetics and biogeographic implications. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 884-893, 2003.

SILVEIRA, J.A.G. DA; COSTA, R.C.L. DA; OLIVEIRA, J.T.A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 187-194, 2001.

SIQUEIRA, J O. Biologia do solo. Lavras: ESAL/FAEPE, 1993.

SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.30, p.225-420, 1980.

SØRENSEN, T. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. Kongelige Danske Videnskaberne Selskabs. **Biologiske Skrifter**, v.5, p.1-34, 1948.

SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. The Rhizobiaceae. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, The Netherlands. 1998.

STACKEBRANDT E., FREDERIKSEN W., GARRITY G.M., GRIMONT P.A.D., KÄMPFER P., MAIDEN M.C.J., NESME X., ROSSELLÓ-MORA R., SWINGS J. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.1043-1047, 2002.

STEPKOWSKI T., L. MOULIN, A. KRZYZANSKA, A. MCINNES, I. J.LAW, J. HOWIESON. European Origin of Bradyrhizobium Populations Infecting Lupins and Serradella in Soils of Western Australia and South Africa. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, p.7041–7052, 2005.

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

STOCCO, P., DO SANTOS, J.C.P., VARGAS, V.P. HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) Em Santa Catarina. **R. Bras. Ci. Solo**, 32:1107-1120, 2008.

STRALIOTTO, R. A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro. EMBRAPA-Agrobiologia, 2002. Disponível em: <[http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fbml\\_inocula\\_feijoeiro.html](http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fbml_inocula_feijoeiro.html)>. Acessado em: 10 de julho de 2015.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose. Seropedica: Embrapa Agrobiologia, 51p. (Embrapa CNPAB. **Documentos**, 94). 1999.

SULLIVAN, J. T.; EARDLY, B. D.; VAN BERKUM, P.; RONSON, C. W. (1996). Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. **Appl Environ Microbiol** v. 62, p. 2818-2825, 1996.

SWOFFORD, D. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and Other Methods). Version 4. **Sinauer Associates**, Sunderland, Massachusetts. 2002.

TALBI, C., DELGADO, M. J., GIRARD, L. RAMÍREZ-TRUJILLO, A., CABALLERO-MELLADO, J., AND BEDMAR, E. J. *Burkholderia phymatum* Strains Capable of Nodulating *Phaseolus vulgaris* Are Present in Moroccan Soils. **Applied And Environmental Microbiology**, July 2010, p. 4587–4591.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. **Molecular Biology and Evolution** 9: 678-687. 1992.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; AND KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**:30 2725-2729. 2013.

TANURA K. AND NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control regions of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution** 10:512-526. 1993.

TEREFEWOR, Z., LORTET, G., SUOMINEN, L. AND LINDSTRÖM, K. Molecular evolution of interactions between rhizobia and their legume hosts. In: TRIPLETT, E.W. Prokaryotic nitrogen fixation. **Wyomondham: Horizon Scientific Press**, p.187-206. , 2000.

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

TOHME, J.; GONZÁLEZ, D.O.; BEEBE, S.; DUQUE, M.C. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1375-1384, 1996.

VALVERDE, A., VELÁZQUEZ, E. GUTIÉRREZ, C., CERVANTES, E., VENTOSA, A., AND IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** (2003), 53, 1979–1983.

VAN BERKUM, P., Z.; TEREFEWOR, L.; PAULIN, S.; SUOMALAINEN, K.; LINDSTRO'M.; EARDLY, B. D. 2003. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. **J. Bacteriol.** v. 185, p. 2988–2998, 2003.

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

VARGAS, A.A.T.; SILVEIRA, J.S.M.; ATHAYDE, J.T.; ATHAYDE, A.; PACOVA, B.E.V. Comparação entre genótipos de feijão quanto à capacidade nodulante e à produtividade com inoculação com rizóbios e/ou adubação de N-Mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 15, p 267-272, 1991.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.) **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997, 524p.

VÁSQUEZ, M.; DÁVALOS, A.; DE LAS PEÑAS, A.; SÁNCHEZ, F.; QUINTO, C. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.1250-1258, 1991.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. AND LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p.6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J. & LUPSKI, J. R. 1994 Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods Mol. Cell. Biol.** 5, 25–40.

VIEIRA, C. Cultura do Feijão, 2ª ed. Viçosa, ufv 1983.

VINUESA P., M. LEÓN-BARRIOS, C. SILVA, A. WILLEMS, A. JARABO-LORENZO, R. PÉREZ- GALDONA, D. WERNER, E. MARTÍNEZ-ROMERO. *Bradyrhizobium canariense*

sp. nov., an acid tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (*Papilionoideae: Genisteae*) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium genospecies* alpha and *Bradyrhizobium genospecies* beta. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 569-575. 2005.

VINUESA, P. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rDNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16 rDNA sequencing. **Appl. Environ. Microbiol.**v. 64, p. 2096-2104, 1998.

VINUESA, P.; SILVA, C.; WERNER, D.; MARTINEZ-ROMERO, E. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 34, p. 29-54, 2005.

VOSS, M.; FREIRE, J.R.J.; SELBACH, P.A. Seleção de *Rhizobium phaseoli*, de regiões produtoras de feijão do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Agronomia, 1981. 75p.

WANG, Q., GARRITY, G.M., TIEDJE, J.M., AND COLE, J.R. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Appl. and Environ. Microbiol.** 73: 5261-5267. 2007.

WARD, D.M.; BATESON, M.M.; WELLER, R.; RUFFROBERTS, A.L. Ribosomal-RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. **Advances in Microbial Ecology**, v.12, p.219-286, 1992.

WARD, D.M.; WLLER, R.; BATESON, M.M. 16S *rRNA* sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, London, v.345, p.63-65, 1990.  
WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study . **J.Bacteriol.**,v. 173, p. 697-703,1991.

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

YAP, W.H.; ZHANG, Z.; WANG, Y. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.5201-5209, 1999.

YARZA P1, RICHTER M, PEPLIES J, EUZEBY J, AMANN R, SCHLEIFER KH, LUDWIG W, GLÖCKNER FO, ROSSELLÓ-MÓRA R., The All-Species Living Tree project: a 16S *rRNA*-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. **Syst Appl Microbiol.** 2008 Sep; 31(4):241-50. doi: 10.1016/j.syapm.2008.07.001. Epub 2008 Aug 9.

YIN, J., HE, D., LI, X., ZENG, X., TIAN, M., CHENG, G. *Paenibacillus enshidis* sp. nov., Isolated from the Nodules of *Robinia pseudoacacia* L. **Curr Microbiol** (2015) 71:321–325.

YOUNG, J.M.; KUYKENDALL, L.D.; MARTINEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie

et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*, **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51 (2001) 89–103.

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

ZHOU, J., BOWLER, L.D., SPRATT, B.G., Interspecies recombination, and phylogenetic distortions, within the glutamine synthetase and shikimate dehydrogenase genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species. **Mol. Microbiol.** 23, 799–812. 1997.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo A – Caracterização Morfocultural

**Tabela 4.** Caracterização morfocultural de estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de feijoeiro e depositadas na Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Organismos Multifuncionais da EMBRAPA Agrobiologia.

Estirpe	Identificação Anterior	Características da Colônia								Local de Isolamento
		Cor	Transparência	Elevação	Forma	Muco	Superfície	Crescimento	pH	
BR 203	F-5b	Creme	Translucido	Elevada	Irregular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	
BR 205	F21a	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Rio de Janeiro
BR 206	F26	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	
BR 207	CSYRO 35	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Cambridge, Inglaterra
BR 210	SEMIA 484	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	Rio Grande do Sul
BR 211	SEMIA4012	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	São Paulo
BR 212	SEMIA4005	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Iraque
BR 214	F 54a	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	Rio de Janeiro
BR 215	3644	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Pouco	Lisa	Rápido	Ácido	Cambridge, Inglaterra
BR 217	57b	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Rio de Janeiro
BR 218	F 72	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	
BR 219	BR 266 st	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Rio de Janeiro
BR 221	F 161B	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Itaguaí, Rio de Janeiro
BR 222	SEMIA442	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	Itaguaí, Rio de Janeiro

Continua...

Continuação da **Tabela 4.**

Estirpe	Identificação Anterior	Características da Colônia								Local de Isolamento
		Cor	Transparência	Elevação	Forma	Muco	Superfície	Crescimento	pH	
BR 223	F171b	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápida	Ácido	Nova Friburgo, RJ
BR 224	F172a	Branco	Opaco	Elevada	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Nova Friburgo, RJ
BR 225	F182a	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	Itaguaí, RJ
BR 227	BR 281	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	Rio de Janeiro
BR 228	BR 289	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Inteira	Rápido	Ácido	Rio de Janeiro
BR 230	CIAT 144	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Antioquia, Colômbia
BR 231	SEMIA4037	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	La Buitrera, Colombia
BR 232	F246b	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	Rio de Janeiro
BR 233	F248a	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Bom Jesus do Itabapoana, RJ
BR 234	F252a	Branco	Translucido	Elevada	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	Bom Jesus do Itabapoana, RJ
BR 235	F261b	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Viçosa, MG
BR 236	F262a	Branco	Translucido	Lenticular	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Ácido	
BR 237	F263a	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	
BR 239	F267	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Rio de Janeiro
BR 240	F268a	Branco	Translucido	pulv	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	*Recife
BR 243	F301	Creme	Translucido	Elevada	Circular	Abundante	Lisa	Rápida	Ácido	Rio de Janeiro
BR 249	CIAT 45	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápida	Ácido	Alegre, E.S.
BR 250	F312	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Alegre, E.S.
BR 251	F400	Brando	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápida	Acido	USA
BR 252	F401	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	USA

Continua...

Continuação da **Tabela 4.**

Estirpe	Identificação Anterior	Características da Colônia								Local de Isolamento
		Cor	Transparência	Elevação	Forma	Muco	Superfície	Crescimento	pH	
BR 253	CIAT 116	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Palmira, Colombia
BR 256	SEMIA 452	Creme	Translucido	Pulv.	Circular	Moderada	Lisa	Rápida	Acido	USA
BR 257	F410	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Pouco	Lisa	Rápido	Acido	USA
BR 258	F411	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	USA
BR 260	F511	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	USA
BR 261	CB 1156	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	
BR 262	DF 5	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Planaltina, D.F.
BR 264	SEMIA 4021	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	USA
BR 265	SEMIA 4009	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderado	Irregular	Rápido	Acido	Piracicaba, SP
BR 267	SEMIA 4010	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	Piracicaba, SP
BR 268	SEMIA 493	Branco	Translucido	Elevado	Irregular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Piracicaba, SP
BR 271	C201	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	
BR 272	DF 6	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Inteira	Rápido	Acido	Planaltina, DF
BR 274	SEMIA 4002	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Danli, Honduras
BR 275	SEMIA 4026	Creme	Translucido	Elevada	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Maquiné, RS
BR 276	CIAT 349	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Cali, colômbia
BR 277	CIAT 642	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Cali, Colômbia
BR 278	CIAT 668	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Ácido	Inglaterra
BR 281	CIAT 904	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápida	Acido	Rio Grande do Sul
BR 282	PNF-1	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	

Continua...

Continuação da **Tabela 4.**

Estirpe	Identificação Anterior	Características da Colônia								Local de Isolamento
		Cor	Transparência	Elevação	Forma	Muco	Superfície	Crescimento	pH	
BR 283	PNF-2	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	
BR 284	CIAT 164	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	USA
BR 285	CIAT 40	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	USA
BR 288	CENA 1020	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Piracicaba, SP
BR 289	SMS 196	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Inteira	Rápido	Acido	
BR 290	SEMIA 498	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Bélgica
BR 291	SEMIA 499	Amarela	Opaca	Convexa	Puntif.	Pouca	Lisa	Rápido	Acido	Bélgica
BR 292	SEMIA 476	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápida	Acido	USA
BR 293	2E1	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Brasília
BR 295	CENA1024	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Piracicaba, SP
BR 296		Branco	Opaco	Elevada	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	USA
BR 297	CENA 1025	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Ácido	Piracicaba
BR 298	Avelar -st	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Rio de Janeiro
BR 299	CENA 1026	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Piracicaba, SP
BR 300	CENA 1048	Branco	Translucido	Lenticular	Irregular	Pouco	Inteira	Rápido	Acido	Piracicaba, SP
BR 301	CENA 1049	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Piracicaba, SP
BR 303	Avelar 14	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	
BR 304	Avelar 18	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Rio de Janeiro
BR 305	IAPAR 82	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Paraná
BR 306	IAPAR 84B	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Paraná

Continua...

Continuação da **Tabela 4.**

Estirpe	Identificação Anterior	Características da Colônia								Local de Isolamento
		Cor	Transparência	Elevação	Forma	Muco	Superfície	Crescimento	pH	
BR 307	IAPAR 86	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Paraná
BR 308	SEMIA 4042	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Paraná
BR 309	IAPAR 80	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Paraná
BR 310	IAPAR 84A	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Paraná
BR 311	IAPAR 88	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Paraná
BR 312	IAPAR 89	Branco	Translucido	Lenticular	Circular	Abundante	Inteira	Rápido	Acido	Paraná
BR 313	IAPAR 94	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Paraná
BR 314	IAPAR 70	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Paraná
BR 315	IAPAR 69	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rapido	Acido	Paraná
BR 317	SEMIA 4047	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rapido	Acido	Paraná
BR 318	CAR 37	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	Paraná
BR 319	IAPAR 14	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Pouco	Lisa	Rápido	Acido	Parana
BR 321	IAPAR 40	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	Paraná
BR 322	CIAT 899	Amarela	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Colômbia
BR 323	CIAT 2545	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	
BR 324	CIAT 145	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Uruana, GO
BR 325	CNPAF 150	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Goiás
BR 326	CNPAF 243	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Goiás
BR 327	KIM 5	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	USA
BR 328	FP 2	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Rio de Janeiro

Continua...

Continuação da **Tabela 4.**

Estirpe	Identificação Anterior	Características da Colônia								Local de Isolamento
		Cor	Transparência	Elevação	Forma	Muco	Superfície	Crescimento	pH	
BR 329	FP 3	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Rio de Janeiro
BR 330	FP 4	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Rio de Janeiro
BR 331	FP 5	Branco	Opaco	Elevada	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	Rio de Janeiro
BR 333	F 2 PM	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	
BR 335	F 4 PM	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	
BR 339	F 8 PM	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	
BR 340	F 9 PM	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	
BR 342	2173	Branco	Translucido	Lenticular	Puntif.	Pouco	Lisa	Lento	Alcalino	USA
BR 343	2155b	Branco	Opaco	Convexa	Puntif.	Pouco	Lisa	Lento	Alcalino	USA
BR 354	CENA 1149	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	Brasil
BR 357	CENA 1640	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Brasil
BR 360	CNPAF 743	Amarela	Opaco	Convexa	Circular	Pouco	Lisa	Rápido	Acido	Ribeira do pombal, BA
BR 361	CNPAF 744	Branco	Opaco	Lenticular	Circular	Moderado	Inteira	Rápido	Acido	Ribeira do Pombal, BA
BR 362	CNPAF 745	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Pouco	Lisa	Rápido	Acido	Ribeira do Pombal, BA
BR 364	UW 1-3F	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Brasil
BR 365	CNPAF 149	Amarela	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	Uruana, GO
BR 367	CNPAF 195	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	Uruana, GO
BR 368	CNPAF 243	Incolor		Convexa	Puntif.	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	
BR 369	CNPAF 260	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	Itapuranga, Go
BR 370	CNPAF 307	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Carmo do Rio Verde, Go

Continua...

Continuação da Tabela 4.

Estirpe	Identificação Anterior	Características da Colônia								Local de Isolamento
		Cor	Transparência	Elevação	Forma	Muco	Superfície	Crescimento	pH	
BR 372	CNPAF 366	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	Catuari, GO
BR 373	CNPAF 386	Creme	Translucido	Convexa	Circular	Moderada	Lisa	Rápido	Acido	Inhaúmas, Go
BR 374	CNPAF 417	Branco	Translucido	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Itaberaí, Go
BR 378	CNPAF 536	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Pouco	Lisa	Rápido	Acido	Inhaúmas, GO
BR 380	CNPAF 587	Branco	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Finuinópolis, GO
BR 520	PRF 81	Creme	Opaco	Convexa	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	
BR 530		Creme	Translucido	Lenticular	Circular	Moderado	Inteira	Intermediário	Acido	Linhares, ES
BR 531		Creme	Opaco	Lenticular	Circular	Moderado	Interira	Rápido	Acido	Canarana, BA
BR 532		Branco	Opaco	Lenticular	Circular	Moderado	Ondulada	Rápido	Acido	Canarana, BA
BR 534		Amarela		Elevadas	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Planaltina, GO
BR 868		Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	Irecê, BA
BR 869		Creme	Opaco	Lenticular	Circular	Moderado	Lisa	Rápido	Acido	Irecê, BA
BR 920		Amarela	Translúcido	Convexa	Circular	Moderado	Inteira	Rápido	Acido	Canarana, BA
BR 921		Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Inteira	Intermediário	Acido	Lapão, BA
BR 922		Branco	Opaco	Convexa	Circular	Moderado	Inteira	Rápido	Acido	Lapão, BA
BR 923		Amarela	Opaco	Lenticular	Circular	Abundante	Lisa	Rápido	Acido	Irecê, BA
BR 924		Branco	Opaco	Lenticular	Circular	Abundante	Inteira	Intermediário	Acido	Linhares, ES
BR 926		Amarela	Opaco	Lenticular	Circular	Moderado	Inteira	Rápido	Acido	Lapão, BA
BR 927		Creme	Translucida	Convexa	Circular	Abundante	Inteira	Rápido	Acido	Linhares, BA
BR 935		Creme	Opaco	Lenticular	Circular	Moderado	Inteira	Rápido	Acido	Cipó, BA

Continua...

Continuação da **Tabela 4.**

Estirpe	Identificação Anterior	Características da Colônia								Local de Isolamento
		Cor	Transparência	Elevação	Forma	Muco	Superfície	Crescimento	pH	
BR 939		Amarela	Opaco	Lenticular	Circular	Moderado	Inteira	Rápido	Acido	Linhares, ES
BR 940		Amarela	Opaco	Lenticular	Circular	Moderado	Inteira	Rápido	Acido	Linhares, ES
BR 942		Creme	Opaco	Lenticular	Circular	Abundante	Inteira	Rápido	Acido	Irecê, BA
BR 943		Creme	Opaca	Lenticular	Circular	Moderada	Inteira	Rápido	Acido	Canarana, BA
BR 944		Banca	Opaca	Convexa	Circular	Abundante	Inteira	Rápido	Acido	Irecê,

## 8.2. Anexo B - Meio

Meio 79 (FRED & WAKSMAN, 1928). Este meio é utilizado para o crescimento de rizóbios, porém se for para rizóbio de crescimento lento, usar Manitol como fonte de Carbono. Usar Açúcar Cristal como fonte de Carbono para rizóbio de crescimento rápido.

Açúcar Cristal ou Manitol	10 g
Azul de Bromotimol a 0,5 % em 0,2 N de KOH P/V4	5 mL
Cloreto de Sódio a 10% P/V4	1 mL
Extrato de Levedura5	0,4 g
Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V4	1 mL
Fosfato de Potássio Monobásico a 10% P/V4	4 mL
Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10% P/V4	2 mL

Completar o volume a 1000 ml com água destilada, ajustar o pH para 6,8-7,0. Adicionar ágar, 1 g.L<sup>-1</sup> (meio semi-sólido) ou 15 g.L<sup>-1</sup> (meio sólido).

## 8.3. Anexo C - Amplificação

**Tabela 5.** Amplificação, por estirpe, dos genes *recA*, *dnaK* e *glnII*.

Estirpes	<i>recA</i>	<i>dnaK</i>	<i>glnII</i>	Estirpes	<i>recA</i>	<i>dnaK</i>	<i>glnII</i>
210	+	+	+	300	-	+	+
212	+	+	+	311	-	+	-
214	+	+	+	312	+	+	+
215	+	+	+	313	+	+	+
219	+	+	+	314	+	+	+
222	+	+	+	315	+	+	+
224	+	+	+	317	+	+	+
225	+	+	+	318	+	+	+
230	+	+	-	322	+	+	+
231	+	+	-	326	+	+	+
232	-	-	+	327	+	+	+
240	-	-	+	342	-	+	+
249	+	+	+	343	-	+	+
250	+	+	+	357	+	+	+
252	+	+	+	360	-	+	+
256	+	+	+	361	-	-	-
251	-	+	+	362	+	+	+
258	+	+	+	364	+	+	+
264	+	+	+	367	+	+	+
268	+	+	+	370	+	+	+
271	+	+	+	373	+	+	-
272	+	+	+	380	-	+	-

Continua...

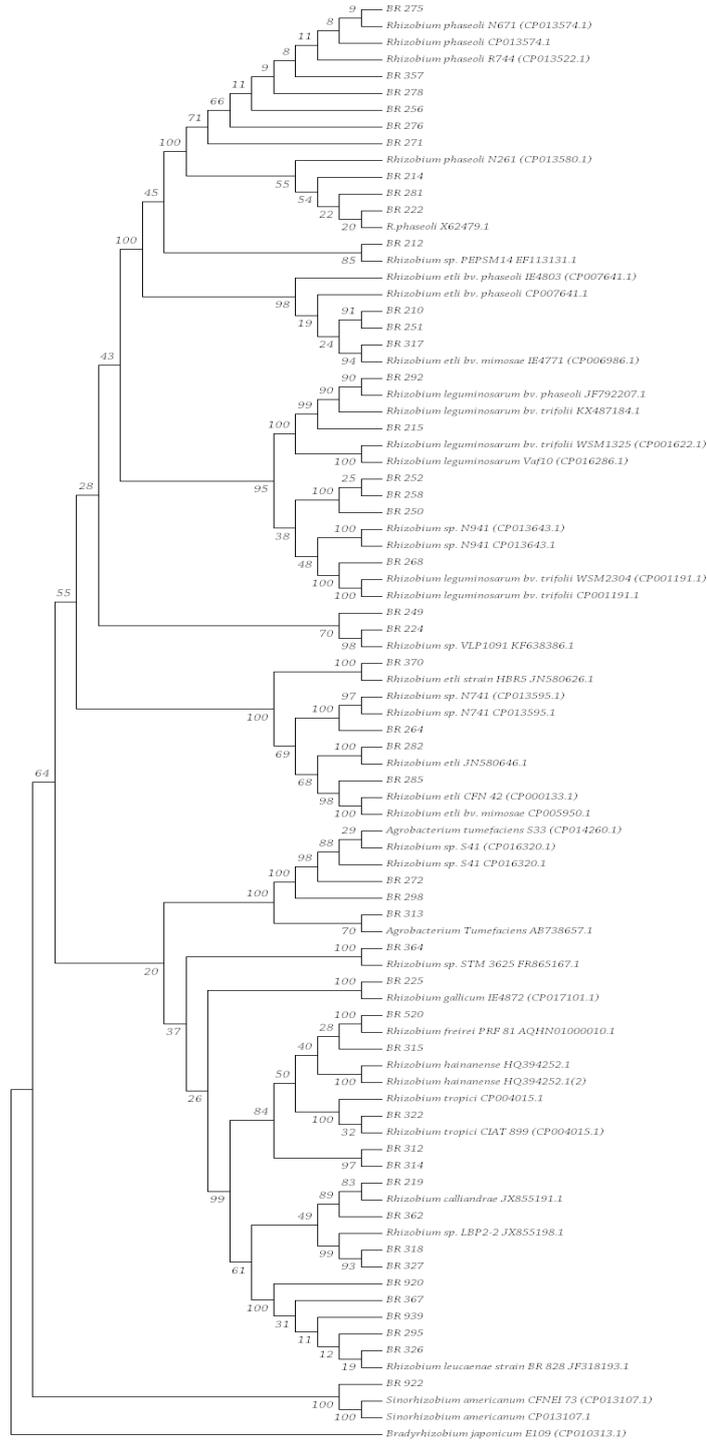
Continuação da **Tabela 5.**

<b>Estirpes</b>	<b><i>recA</i></b>	<b><i>dnaK</i></b>	<b><i>glnII</i></b>	<b>Estirpes</b>	<b><i>recA</i></b>	<b><i>dnaK</i></b>	<b><i>glnII</i></b>
275	+	-	+	520	+	+	+
276	+	+	+	530	+	+	-
277	-	+	+	534	-	+	+
278	+	+	+	920	+	+	+
281	+	-	+	922	+	+	+
282	+	+	+	939	+	+	+
284	-	-	+				
285	+	+	+				
291	-	+	-				
292	+	+	+				
295	+	+	+				
298	+	+	+				
299	-	+	+				

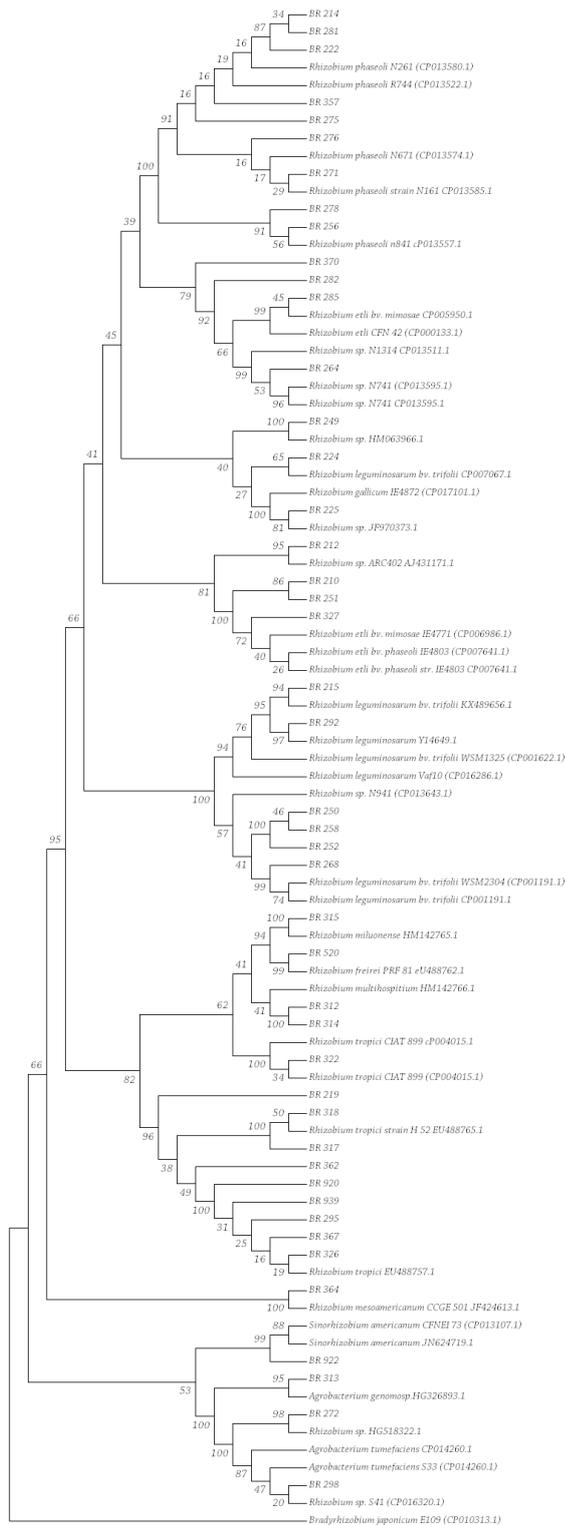
+ Amplificação bem sucedida;

- Amplificação mal sucedida.

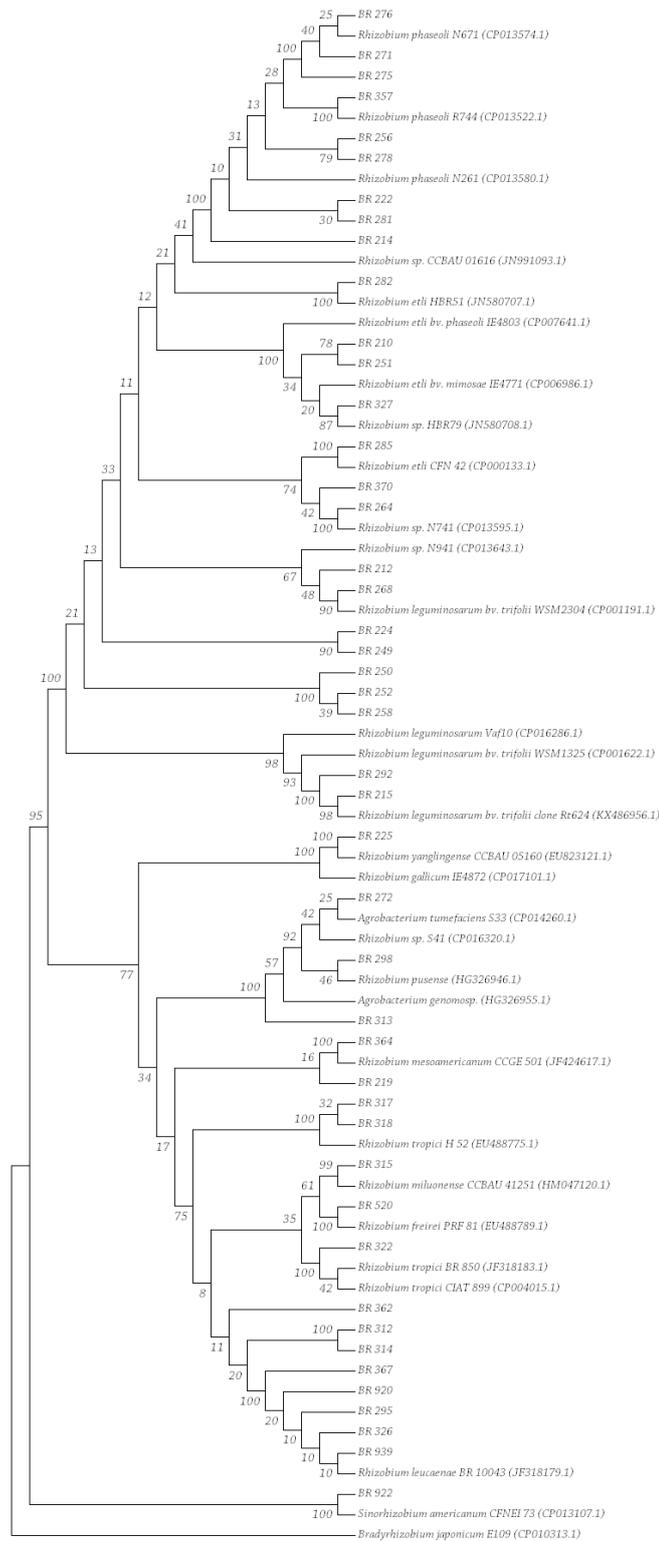
## 8.4. Anexo D – Relação Filogenética



**Figura 15.** Relação filogenética (primeira parte) entre 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *recA* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima parcimônia foi utilizado para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo.



**Figura 16.** Relação filogenética (segunda parte) entre 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de sequências do gene *recA* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com sequências obtidas no Genbank. O método da máxima parcimônia foi utilizado para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A sequência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo.



**Figura 17.** Relação filogenética (terceira parte) entre 45 estirpes de rizóbios isolados de nódulos do feijoeiro. A árvore enraizada foi construída com base em um alinhamento de seqüências do gene *recA* feito com o programa MUSCLE, conforme implementado na plataforma MEGA 7 e com seqüências obtidas no Genbank. O método da máxima parcimônia foi utilizado para a construção da árvore, com 100 replicatas de “bootstrap”. A seqüência de *Bradyrhizobium japonicum* foi escolhida como grupo externo.