

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

Descrição de Novas Espécies de *Bradyrhizobium*
Isoladas de *Centrolobium paraense*

Daniele Cabral Michel

2017



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

**DESCRIÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES DE *BRADYRHIZOBIUM*
ISOLADAS DE *CENTROLOBIUM PARAENSE***

DANIELE CABRAL MICHEL

Sob a Orientação do Pesquisador

Jerri Édson Zilli

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, 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 autor

C623d Cabral Michel, Daniele , 1987-
Descrição de novas espécies de Bradyrhizobium
isoladas de Centrolobium paraense / Daniele Cabral
Michel. - 2017.
67 f.: il.

Orientador: Jerri Édson Zilli.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia
Ciência do Solo, 2017.

1. FBN. 2. Taxonomia. 3. Filogenia. I. Édson Zilli,
Jerri, 1974-, orient. II Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia Ciência
do Solo III. Título.

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

DANIELE CABRAL MICHEL

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14/02/2017

Jerri Édson Zilli. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Nivaldo Schultz. Dr. UFRRJ

Glória Regina Botelho. Dra. UFSC

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, aos amigos e colegas de laboratório por todo carinho, paciência e companheirismo nessa jornada.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que mais um degrau da minha caminhada fosse alcançado.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), especialmente a Embrapa Agrobiologia pela receptividade e por permitir que a minha dissertação fosse realizada na Unidade.

As agências de fomento CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro prestado.

À minha família que sempre me dedicou amor, apoio e incentivo constante. A vocês eu agradeço imensamente e eternamente, amo vocês.

Ao meu grande companheiro Alysson, pelo carinho, paciência e por estar ao meu lado nessa jornada.

Aos amigos que encontrei durante o mestrado, aos de longa data que sempre entenderam a minha ausência para dedicar-me a dissertação. Amigos, muito obrigada.

Aos companheiros do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEMI) por toda ajuda, por todo o conhecimento dividido ou passado e pela agradável convivência e carinho.

Ao meu Orientador Jerri Édson Zilli pelo apoio e pelos ensinamentos que foram muitos durante esses dois anos.

Aos professores da Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo que contribuíram para a transmissão do conhecimento e amadurecimento profissional durante todo o mestrado.

À professora Shana Mattos pela paciência e carinho durante meu estágio à docência.

Muito obrigada! Vocês foram essenciais nessa jornada.

RESUMO

MICHEL, Daniele Cabral. **Caracterização de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de *Centrolobium paraense* Tul.** 2017. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Centrolobium paraense Tul. popularmente conhecido como “pau-rainha”, é uma espécie de leguminosa que ocorre naturalmente no norte do estado de Roraima (Brasil) ao Panamá. Tem importância econômica, social e ambiental para populações locais, sendo uma espécie fixadora de nitrogênio (N) em associação com bactérias do grupo dos rizóbios. Treze bactérias gram-negativas, aeróbicas, com mobilidade através de flagelos polares e em forma de bastonetes previamente isoladas de nódulos de raízes de *Centrolobium paraense* cultivadas em solos do estado de Roraima foram submetidas a caracterização com abordagem polifásica. O estudo envolveu a utilização de fontes de carbono, reações enzimáticas, composição de ácidos graxos das células, antibióticos, pH e tolerância a NaCl, 16S rRNA, análise filogenética dos genes *nodC*, *nifH* e de sequências multilocus (MLSA com *dnaK*, *glnII*, *recA*, *gyrB* e *rpoB*), conteúdo de G+C e identidade média de nucleotídeos (ANI). O crescimento das estirpes foi observado num intervalo de temperatura 20-36°C (ótima 28°C), intervalo de pH de 5-11 (ótimo 6,0-7,0) e 0,1-0,5% NaCl (ótimo 0,1-0,3%). A análise do gene 16S rRNA posicionou as estirpes em dois grupos dentro de *Bradyrhizobium*. A espécie mais próxima (98,8%) para o grupo I foi *B. neotropicale* enquanto para o grupo II foram outras doze espécies com mais de 99% de similaridade. MLSA confirmou *B. neotropicale* BR 10247^T como a estirpe tipo mais próxima do grupo I e *B. elkanii* USDA 76^T e *B. pachyrhizi* PAC 48^T do grupo II. O ANI diferenciou o grupo I da *B. neotropicale* BR 10247^T (79,6%) e o grupo II da *B. elkanii* USDA 76^T e *B. pachyrhizi* PAC 48^T (88,1 e 87,9 respectivamente). O perfil de ácidos graxos (predominância de C16:0 e característica somada 8 (18:1ω6c/18:1ω7c) para ambos os grupos, ANI, o conteúdo de G+C e a utilização de compostos de carbono deram suporte ao posicionamento das novas estirpes no gênero *Bradyrhizobium*. Os genes *nodC* e *nifH* têm em geral baixa similaridade com outras espécies de *Bradyrhizobium*. Ambos os grupos nodularam plantas de diferentes tribos.

Palavras-chave: FBN. Taxonomia. Filogenia

ABSTRACT

MICHEL, Daniele Cabral. **Characterization of strains isolated from *Centrolobium paraense* Tul.** 2017. 67p Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro., Seropédica, RJ, 2017.

Centrolobium paraense Tul. popularly known as "pau-rainha", is a naturally occurring legume species from the northern state of Roraima (Brazil) to Panama. It has economic, social and environmental importance for local populations, being a nitrogen fixing species in association with bacteria of the rhizobia group. Thirteen Gram-negative, aerobic, motile with polar flagella, rods shaped bacteria previously isolated from root nodules of *C. paraense* grown in soils from the Roraima State were submitted to a polyphasic approach characterization. The study involved the carbon source utilization, enzymatic reaction, antibody, pH and NaCl tolerance, 16S rRNA, *nodC*, *nifH* and multi locus sequence phylogenetic analysis (MLSA with *dnaK*, *glnII*, *recA*, *gyrB* and *rpoB*), G+C content and Average Nucleotide Identity (ANI). Growth of strains was observed at temperature range 20-36°C (optimal 28°C), pH ranges 5-11 (optimal 6.0-7.0) and 0.1-0.5%NaCl (optimal 0.1-0.3%). Analysis of 16S rRNA gene placed the strains into two groups within *Bradyrhizobium*. Closest neighbouring species (98.8%) for group I was *B. neotropicale* while for group II were twelve species with more than 99% of similarity. MLSA confirmed *B. neotropicale* BR 10247^T as the closest type strain for the group I and *B. elkanii* USDA 76^T and *B. pachyrhizi* PAC 48^T for group II. ANI differentiated group I from the *B. neotropicale* BR 10247^T (79.6%), and group II from *B. elkanii* USDA 76^T and *B. pachyrhizi* PAC 48^T (88.1% and 87.9%, respectively). Fatty acid profiles (majority C16:0 and Summed feature 8 (18:1 ω 6c/18:1 ω 7c) for both groups), DNA G+C content and carbon compound utilization supported the placement of the novel strains in the genus *Bradyrhizobium*. Gene *nodC* and *nifH* of the new strains have in general low similarity with other *Bradyrhizobium* species. Both groups nodulated plants from the tribes Crotalariaeae, Dalbergiae, Genisteae and Phaseoleae. Based on the result obtained, two novel species which the names *Bradyrhizobium centrolobii* and *Bradyrhizobium macuxiense* are proposed.

Key-words BNF. Taxonomy. Phylogeny.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies descritas dentro do gênero <i>Bradyrhizobium</i>	8
Tabela 2. Relação de iniciadores, suas respectivas sequências e ciclos utilizados como referência.....	14
Tabela 3. Plantas hospedeiras e estirpes testadas na inoculação cruzada.....	19
Tabela 4. Similaridade entre as estirpes tipo BR 10245 ^T , BR 10303 ^T e as outras estirpes de espécies do gênero <i>Bradyrhizobium</i> dos genes 16S r RNA, genes <i>housekeeping</i> e genes simbióticos.....	37
Tabela 5. Resultados obtidos a partir do método de determinação da Média de Identidade de nucleotídeos (%) entre as estirpes tipo BR 10245 ^T e BR 10303 ^T e as espécies mais próximas encontradas.....	39
Tabela 6. Resultados obtidos a partir da determinação do conteúdo de C+G dos genomas das respectivas estirpes do grupo I e II e das espécies mais próximas ao grupo <i>B. elkanni</i> USDA 76 ^T , <i>B. pachyrhizi</i> PAC 48 ^T , <i>B. viridifuturi</i> , <i>B. embrapense</i> , <i>B. tropiciagri</i> , <i>B. neotropicale</i> , <i>B. stylosanthis</i>	40
Tabela 7. Resultados referentes a análise de ácido graxos das estirpes BR 10245 ^T e mais uma representante do grupo BR 10290, BR 10303 ^T e outra representante do grupo BR 10348 e as estirpes tipo das espécies mais próximas aos grupos em estudo.....	40
Tabela 8. Resultados do teste API 20 NE. As estirpes testadas, pertencentes ao grupo I foram: 1- BR 10245 ^T , 2-BR 10290, 3-BR 10351, 4-BR 10346. Já as do grupo II foram: 5-BR 10303 ^T , 6-BR 10362,7-BR 10365,8- BR 10355,9- BR10363, 10- BR10356,11- BR-10358,12-10348, 13- BR10359.....	42
Tabela 9. Resultados do teste Biolog GN2 microplates, considerando as respostas diferenciadas dos grupos em estudo. O grupo I foi representado pelas estirpes 1- BR 10245 ^T , 2- BR 10290, 3- BR 10351, 4- BR10346. E o grupo II por : 5- BR 10303 ^T , 6- BR 10362, 7- BBR 10365,8- 10355 ,9-BR10363,10- BR10356,11-BR 10358,12-BR-10348,13- BR 10359.....	44
Tabela 10. Resultados diferenciados entre as estirpes em estudo e estirpes tipo de <i>B. elkanii</i> e <i>B. neotropicale</i> quanto a resistência a antibióticos. (+) indica crescimento normal e (-) crescimento inibido. 1- BR 10245 ^T , 2- BR 10290, 3- BR 10303 ^T , 4- BR 10348, 5- <i>B. elkanii</i> , 6- <i>B. neotropicale</i>	45
Tabela 11. Resultado do crescimento nas diferentes temperaturas, pH e concentrações de NaCl (%p/v). Foram avaliadas as estirpes BR 10245 ^T , BR 10290, BR 10303 ^T e BR 10348.....	46
Tabela 12. Resultados do testes de inoculação cruzada com espécies de leguminosas pertencentes a diferentes tribos.....	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de distribuição de espécies de *Centrolobium*. *C. yavizanum* =círculos cheios; *C. paraense* = quadrados cheios; *C. ochroxylum* = triângulos cheios (ápice para cima); *C. microchaete* = pentágonos; *C. tomentosum* = quadrados abertos; *C. sclerophyllum* = triângulos cheios (ápice para baixo); *C. robustum* = estrelas. Fonte: Pirie *et al.*,2009. Revision and Biogeography of *Centrolobium* (Leguminosae-Papilionoideae), Systematic Botany,34(2); pp345-35910
- Figura 2.** Resultados de testes API 20NE. A coloração evidencia a reação das bactérias com relação ao substrato fornecido. O sinal de + representa reações positivas e o sinal de - reações negativas.....18
- Figura 3.** Dendograma obtido a partir da técnica BOX-PCR fingerprinting das estirpes BR 10245^T, BR 10290, BR 10346, BR 10351, BR 10303^T, BR 10362, BR 10359, BR 10356, BR 10358, BR 10365, BR 10363, BR 10348, *B. elkanii*, *B. neotropicale*, *B. pachyrhizi*. Os agrupamentos foram obtidos através do programa Bionumerics 7.0. O algoritmo utilizado foi o UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard com a tolerância já estabelecida no programa.....20
- Figura 4.** Árvore filogenética das 13 estirpes em análise baseada no gene 16S rRNA. Foi utilizado o programa Mega 5.1. O método estatístico aplicado foi o Maximum Likelihood. Para atestar os resultados encontrados na estatística, foi utilizado um bootstrap com 1000 repetições. Nos nós estão o valor em porcentagem do quão agrupadas estão as estirpes. A espécie *Microvirga vignae* é o outgroup.....22
- Figura 5.** Análise filogenética das 13 estirpes referente ao gene *housekeeping recA*. A árvore foi construída no programa Mega 5.1. O método estatístico aplicado foi o Maximum likelihood. Para atestar os resultados encontrados na estatística, essa foi analisada a partir de bootstrap com 1000 repetições. Nos nós estão o valor em porcentagem do quão agrupadas estão as estirpes.....24
- Figura 6.** Dendograma baseado no gene *glnII*. Foi construído a partir do programa Mega 7.0. Utilizou-se o método Maximum Likelihood para as análises estatísticas com um bootstrap de 1000 repetições. Os valores presentes nos nós representam a porcentagem de agrupamento entre as estirpes. A barra indica uma substituição pela posição de 100 nucleotídeos.....25
- Figura 7.** Árvore filogenética do gene *housekeeping rpoB*. Utilizou-se o programa Mega 7.0 para a construção da mesma. Maximum likelihood foi o método estatístico utilizado com um bootstrap de 1000 repetições. Os valores acima de 50% presentes nos nós representam a porcentagem de agrupamento entre as estirpes. A barra indica duas substituições para cada 100 nucleotídeos.....28
- Figura 8.** Árvore filogenética do gene *housekeeping dnaK*. A estatística foi realizada utilizando-se o método Maximum Likelihood com um bootstrap de 1000 repetições, utilizando o programa Mega 7.0. Os valores dos nós representam o percentual de agrupamento entre as estirpes. A barra na margem inferior da árvore indica duas substituições para cada 100 nucleotídeos.....29

- Figura 9.** Árvore filogenética concatenada com o gene *gyrB*. O método estatístico utilizado foi o ML com um bootstrap de 1000 repetições. Os valores nos nós referem-se ao agrupamento das espécies (%). A barra indica uma substituição a cada 100 nucleotídeos.....30
- Figura 10.** Árvore filogenética concatenada com os genes *dnak*, *glnII*, *recA*, *rpoB* e *gyrB*. O método estatístico utilizado foi o ML com um bootstrap de 1000 repetições. Os valores nos nós referem-se ao agrupamento das espécies (%). A barra indica duas substituições a cada 100 nucleotídeos.....32
- Figura 11.** Árvore filogenética concatenada com o gene *nodC*. O método estatístico utilizado foi o ML com um bootstrap de 1000 repetições. Os valores nos nós referem-se ao agrupamento das espécies (%). A barra indica duas substituições a cada 100 nucleotídeos.....35
- Figura 12.** Árvore filogenética concatenada com o gene *nifH*. O método estatístico utilizado foi o ML com um bootstrap de 1000 repetições. Os valores nos nós referem-se ao agrupamento das espécies (%). A barra indica duas substituições a cada 100 nucleotídeos.....36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Taxonomia Bacteriana	3
2.2 Gênero <i>Bradyrhizobium</i>	7
2.3 <i>Centrolobium</i> spp.....	9
2.4 Estudos Recentes nas Espécies de <i>Centrolobium paraense</i>	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Caracterização Genotípica	12
3.1.1 Extração do DNA e amplificação de genes	12
3.1.2 “ <i>Fingerprint</i> ” box-PCR	13
3.1.3 Média da identidade de nucleotídeos (ANI, do inglês “Average nucleotide identity”)	16
3.1.4 Conteúdo de G+C	16
3.2 Sequenciamento e filogenia	16
3.3.1 Perfil de ácidos graxos	17
3.3.2 Testes API 20 NE e Biolog GN2	17
3.3.3 Resistência a antibióticos.....	18
3.3.4 Teste de inoculação cruzada	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Caracterização Genotípica	20
4.1.1 Box PCR	20
4.1.2 Análise filogenética do gene 16S rRNA.....	21
4.1.3 Análises filogenéticas dos genes <i>housekeeping</i>	23
4.1.4 Filogenia a partir de MLSA (“ <i>Multilocus sequence analysis</i> ”)).....	31
4.2.1 Perfil de ácidos graxos	40
4.2.2 Análises enzimáticas e testes de assimilação de sais e açúcares	40
4.2.3 Utilização de fontes de carbono.....	43
4.2.4 Resistência a antibióticos.....	44
4.3 Teste de Inoculação Cruzada	46
4.4 Descrição das Espécies	47
4.4.1 Descrição da espécie <i>Bradyrhizobium centrolobii</i>	47
4.4.2 Descrição da espécie <i>Bradyrhizobium macuxiense</i>	48
5. CONCLUSÕES.....	49
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
8. ANEXOS.....	61

1. INTRODUÇÃO

Dentre os processos que ocorrem naturalmente no meio ambiente, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) apresenta grande destaque. Grande parte deste processo ocorre pela associação de bactérias fixadoras de N_2 atmosférico e plantas da família *Fabaceae* (*Leguminosae*), culminando com a transformação do N atmosférico, mediado pelo complexo enzimático da nitrogenase, à NH_3 (TAIZ e ZEIGER, 2010). A partir dessa associação simbiótica, as plantas obtêm N, em uma forma assimilável, convertido por organismos fixadores de N e esses se beneficiam através da absorção de nutrientes e carboidratos produzidos pelas plantas (TAIZ e ZEIGER, 2010).

A FBN é a forma mais sustentável e econômica de ingresso de (N) na agricultura. Sabe-se que através de processos sintéticos para a conversão do N_2 à forma assimilável pelas plantas, são onerosos para uma tonelada de NH_3 são necessários seis barris de petróleo (HUNGRIA et al., 2001). Além disso apesar de todo esse gasto energético, apenas 50% do N fornecido é assimilado pelas plantas (DELAMUTA, 2015). Ademais, o uso excessivo de produtos nitrogenados pode levar a lixiviação do N ao longo dos perfis de solo, atingir os lençóis freáticos, contaminando rios, lagos etc. como também a emissão de gases de efeito estufa (notadamente o N_2O) (COSTA et al., 2009). Em contrapartida, a FBN fornece o N a baixo custo e oferece menor impacto ambiental, favorecendo uma agricultura mais sustentável (MELO et al., 2009). Acredita-se que o processo de fixação contribua com aproximadamente 65% de todas as entradas de N sendo o grande fornecedor do elemento para que a vida seja mantida na Terra (HUNGRIA et al., 2007).

Várias espécies de leguminosas florestais brasileiras são de grande importância para a sustentabilidade do meio ambiente, pois garantem sua manutenção, diminuindo processos erosivos e permitindo a reposição de nutrientes aos solos. Dentre essas está o *Centrolobium paraense* que é conhecida popularmente como “pau-rainha” e ocorre naturalmente do norte do Brasil ao Panamá, sendo mais restrita ao estado de Roraima. Sua importância vai além das razões ambientais, pois contribui social e economicamente para as populações nativas das regiões onde ocorrem, uma vez que apresenta alto potencial madeireiro, é utilizado como combustível e até para fins medicinais (DAHMER et al., 2009).

Da mesma forma que diversas outras leguminosas tropicais, *C. paraense* forma com mais frequência simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, gênero este também com alta eficiência no processo de FBN. Baraúna et al. (2014) observaram que 90% dos isolados obtidos de nódulos de planta desta espécie eram de crescimento lento e apresentavam fenótipos que apresentavam características similares ao gênero *Bradyrhizobium*. Além disso, a análise parcial do gene 16S rRNA confirmaram os resultados anteriores e posicionaram os isolados em ramos diferentes das espécies já descritas.

Sendo assim, dentre os isolados obtidos por Baraúna et al. (2014) este trabalho selecionou 13 deles para um estudo mais aprofundado, a nível taxonômico de espécie. Dessa forma, foram feitas análises fenotípicas, genotípicas e filogenéticas a fim de definir as espécies que esses isolados poderiam pertencer. Essa identificação e caracterização dos organismos foram feitas através da taxonomia polifásica.

A taxonomia polifásica criada por Colwell em 1970 tem como objetivo integrar diferentes informações genotípicas, filogenéticas e fenotípicas de micro-organismos, indicando certo consenso na taxonomia (VANDAMME et al., 1994). As características genotípicas consideradas neste trabalho englobaram a extração do DNA e amplificação do gene 16S rRNA, de genes *housekeeping* e genes simbióticos (*nodC* e *nifH*). Esses genes

amplificados e sequenciados foram avaliados através de árvores filogenéticas. As análises fenotípicas consistiram de inúmeros testes como API 20NE, Biolog GN2, entre outros.

Dessa forma, a partir da análise polifásica buscou-se entender se as estirpes isoladas de nódulos de *Centrolobium paraense* apresentavam alta diversidade genética e se eram novas espécies dentro do gênero *Bradyrhizobium*.

O objetivo geral desse trabalho foi caracterizar taxonomicamente bactérias do gênero *Bradyrhizobium* isoladas de *Centrolobium paraense*. Os objetivos específicos foram definir o posicionamento taxonômico de dois grupos de bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* que foram isoladas de *C. paraense* e comparar a diversidade genética, genes 16S rRNA, genes *housekeeping* e genes simbióticos entre os isolados oriundos de *C. paraense*.

A caracterização taxonômica dessas espécies isoladas dos nódulos da espécie *Centrolobium paraense* se faz importante porque permite entender alguns dos possíveis organismos envolvidos em um dos processos de extrema importância para leguminosas de modo geral pois apresenta grande contribuição para o suprimento de um dos nutrientes mais importantes às plantas, o nitrogênio. Além disso, o posicionamento taxonômico de espécies bacterianas fornece uma estrutura para a comunidade científica, permitindo a troca de conhecimento e facilitando o entendimento (ROSSELÓ-MORÁ, 2005). Por último, estudos tem mostrado que a espécie *C. paraense* nas próximas décadas terá sua população diminuída devido a exploração atual e potencial nos próximos anos, tornando essencial o entendimento dos mecanismos que essenciais a sua sobrevivência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O gás N_2 é presente abundantemente na atmosfera, porém, devido a sua tripla ligação entre seus átomos, não pode ser naturalmente convertido a N assimilável pelas plantas e consequentemente aos animais. Para que esse N possa ser utilizado por plantas, procariotos, conhecidos como diazotróficos realizam a quebra da molécula de N_2 . Esses organismos podem ser simbióticos ou associativos. No caso das bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, objeto do presente trabalho, tende a formar relações simbióticas evoluídas e organizadas com espécies de leguminosas (HELENE, 2015). De um modo geral, essa associação envolve substâncias químicas atrativas. A planta libera compostos genericamente conhecidos como flavonóides que atuam como quimioatraentes e ativam a expressão dos genes *nod* presente no grupo dos rizóbios que são responsáveis pela síntese de fatores *nod* que recebem os sinais que as plantas emitem (PEIX et al., 2015). A associação é benéfica para ambos os parceiros pois a planta na ausência de N no solo, precisa do processo de fixação para a obtenção do mesmo, uma vez que é um dos elementos essenciais para seu desenvolvimento e os microssimbiontes se beneficiam, pois, sua nutrição é garantida através da fosforilação oxidativa da glicose, possivelmente, proveniente da fotossíntese (HUNGRIA et al., 2007).

2.1 Taxonomia Bacteriana

O grupo dos rizóbios (nome coletivamente atribuído para as bactérias capazes de estabelecer nodulação com leguminosas e fixar N) tem sido alvo de muitos estudos uma vez que compreende microorganismos de grande importância em processos essenciais à vida como conversão do N_2 , proporcionando aumento na produtividade agrícola e a manutenção e restauração da fertilidade dos solos (BERRADA e BENBRAHIM, 2014)

Devido ao saldo extremamente positivo que esses simbioses proporcionam, o estudo da taxonomia desse grupo de procariontes é crescente. Através destes estudos pode-se entender as relações entre organismos vivos de diferentes ecossistemas e a biodiversidade dos mesmos (GEVERS et al., 2005). Quase todos os conceitos taxonômicos tentam retratar toda a ordem evolutiva desses organismos, indo a origem da vida onde as células são unidades básicas (KÄMPFER e GLEASER, 2012) e têm por objetivo classificar, posicionar organismos em diferentes táxons a fim de entender suas histórias evolutivas.

Atualmente a taxonomia pode ser dividida em três partes. A primeira seria a classificação que com base na similaridade, promove o arranjo ordenado de organismos em grupos taxonômicos. A segunda parte, a nomenclatura, consiste em “rotular” aquela unidade definida e a terceira, se refere a identificação de organismos desconhecidos; determina se os organismos apresentam uma classificação definida e uma denominação já estabelecida (VANDAMME et al., 1996; MOORE et al., 2010).

A classificação de microrganismos procariotos é bastante dinâmico e a mais jovem das classificações feitas a respeito de seres vivos e até poucos séculos atrás não se sabia que existiam (ROSSELO-MORA et al., 2001). Durante os séculos XVII e XVIII a classificação de procariontes baseava-se apenas em características morfológicas (ROSSELO-MORA et al., 2001). No final do século XIX, outros critérios foram adotados para classificar bactérias como quais substratos eram necessários ao crescimento das mesmas e o potencial patogênico (LEHMANN e NEUMANN, 1896) e organismos fixadores de N capazes de estabelecer simbiose com leguminosas eram descobertos (RIVAS et al., 2009).

Na primeira metade do século XX, propriedades bioquímicas e fisiológicas eram então incorporadas ao sistema de classificação de microrganismos (ORLA-JENSEN, 1909; BUCHANAN, 1955). A demonstração da grande diversidade metabólica dos procariontes,

com grande contribuição de grandes estudiosos como Beijerinck e Winogradsky, passou-se a dar importância a fisiologia desses organismos (PALLERONI et al., 2003). Conforme aumentava o número de características fenotípicas avaliadas, tornava-se cada vez mais difícil armazenar a quantidade expressiva de dados. Dessa forma, no final da década de 1950, desenvolveu-se a taxonomia numérica (ROSSELO-MORÁ et al., 2001).

Caracterizada por métodos numéricos, utilizando matrizes numéricas, onde as medições são precisas e exatas, a taxonomia numérica tinha como objetivo agrupar organismos de acordo com informações fisiológicas, bioquímicas, metabólicas e enzimáticas, utilizando métodos estatísticos, levando a medições quantitativas de similaridade entre estirpes com maior rigor e objetividade (DELAMUTA, 2015). Os métodos eram objetivos, repetíveis e explícitos na avaliação da ascensão de um táxon e na avaliação das relações filogenéticas (SNEATH E SOKAL, 1973). Porém, embora parecesse ser uma revolução e uma resolução para o processamento da enorme quantidade de dados que eram gerados, tornou-se insuficiente para a classificação devido as tecnologias que posteriormente surgiram.

A partir da década de 1960, diversas inovações técnicas levaram a transformações que resultaram em ciência a taxonomia bacteriana. A análise do DNA passou a ser fonte de estudo (STALEY, 2006; WILLEMS, 2006). Em 1961, Schildkraut et al. foram os primeiros a classificar microrganismos baseados numa única fita de DNA (SCHILDKRAUT e DOTY, 1961). Com o avanço da biologia molecular, passou-se a também a utilizar outras técnicas como Box PCR “fingerprint”, o conteúdo de G+C (conteúdo de Guanina e Citosina, em % mol no DNA) e a hibridização do DNA-DNA (de LEY et al., 1970). A primeira delas é capaz de fornecer características genéticas através de um perfil de identidade do genoma de estirpes em estudo (HELENE, 2015). A técnica utilizada é chamada de “fingerprinting” pois o perfil de bandas gerado por essa análise é a impressão digital do genoma que apresenta sequências distribuídas por toda a molécula do DNA e que se repetem diversas vezes. No entanto, o número de vezes e a localização dessas sequências no genoma são característicos de cada espécie (VERSALOVIC et al., 1994) o que permite que uma avaliação prévia do perfil de bandas de cada organismo seja identificado. Dentre as duas últimas técnicas, a primeira permite a distinção de estirpes semelhantes fenotipicamente embora não sejam relacionadas geneticamente (BULL et al., 1992). A segunda consiste na determinação da similaridade genética global entre os genomas de estirpes isoladas sob condições padronizadas (GEVERS et al., 2005).

Ao longo dos anos a reassociação ou hibridização do DNA-DNA (HDD) tem sido utilizada para determinar o grau de similaridade entre bactérias. Esta foi uma das poucas técnicas que foram universalmente aplicadas, disponíveis e que fornece comparações verdadeiras entre os genomas de microrganismos (GORIS et al., 2007). Trata-se da comparação, em par, de dois genomas completos, refletindo a semelhança global entre eles (MARTENS et al., 2008). De acordo com ad hoc de 1987 e 2002 (WAYNE et al., 1987; STACKEBRANDT., 2002) as espécies de procariotos devem utilizar esse critério para o delineamento de espécies na taxonomia e características fenotípicas devem ir de acordo com esse critério.

Para a delimitação de espécies, estabeleceu-se que estirpes com 70% ou mais de hibridização do DNA-DNA e com 5°C ou menos de ΔT_m (diferença entre a temperatura de desnaturação entre o DNA homoduplex e o DNA heteroduplex) (WAYNE et al., 1987) seriam consideradas de mesma espécie. Porém, embora pareça uma ferramenta bastante enriquecedora no ponto de vista da classificação taxonomia de espécies apresenta algumas limitações que tornam a técnica ineficaz e obsoleta diante do avanço da era genômica que atualmente predomina. A primeira limitação dessa metodologia é o valor de corte de 70% que não é aplicável a todos os gêneros de procariotos. Outro entrave para a realização da HDD é a

necessidade de infraestrutura apropriada que não são presentes em muitos laboratórios (RAMASAMY et al., 2014) além de apresentar elevado erro experimental (KÄMPFER e GLAESER 2012).

Concomitantemente à técnica de HDD e outras técnicas fenotípicas e quimiotaxonômicas que vinham sendo utilizadas, surgiu a “ taxonomia polifásica”. Essa, sugerida por Colwell (COLWELL, 1970) tinha como objetivo integrar características fenotípicas, genotípicas e filogenéticas de microrganismos a fim de se chegar um consenso na taxonomia (VANDAMME et al., 1996). Tem sido bastante útil uma vez que tem levado a descrição de diversas espécies microbianas. É uma abordagem recente na taxonomia microbiana que fornece um sistema de classificação autêntico e natural de microrganismos (PRAKASH et al., 2007) e vem sendo bastante utilizada na descrição de novas espécies de procariontes (MOORE et al., 2010).

Na década de 80, a introdução de técnicas de amplificação do DNA e seu sequenciamento, principalmente do gene 16S rRNA, revolucionou e facilitou a classificação de bactérias (RAMASAMY et al., 2014). Análises filogenéticas a partir do gene 16S rRNA tem levado a uma grande revolução no curso dos estudos taxonômicos de procariontes. Nos dias de hoje, esse gene é um critério primário na designação de novos posicionamentos taxonômicos onde os agrupamentos gerados por ele é um suporte para essas novas designações (KONSTANTINIDIS e TIEDJE, 2007). Embora amplamente eleito como a espinha dorsal da filogenia e taxonomia procarionta (LAPAGE et al., 1992) tem sido considerado como limitante na designação de espécies devido a algumas dificuldades de resolução.

Dentre as restrições que o gene ribossomal 16S rRNA apresenta está a quantidade insuficiente de informação presente nas sequencias desse gene para mostrar relações a níveis taxonômicos de espécies e subespécies (STACKEBRANDT et al., 2002). Particularmente no grupo dos rizóbios existem evidências de que filogenias distorcidas podem ser obtidas devido a recombinação genética e a transferência horizontal de genes (VAN BERKUM et al., 2003). No gênero *Bradyrhizobium* a alta similaridade entre as sequencias e o alto grau de conservação entre as espécies torna as informações obtidas a partir desse gene taxonomicamente limitada (WILLEMS et al., 2001). Dessa forma, buscou-se ao longo dos anos seguintes alternativas que pudessem incorporar mais informações para que novos táxons pudessem ser definidos de forma acurada.

Os novos desafios da taxonomia a partir de então era encontrar alternativas que rompessem as limitações da técnica de hibridização DNA-DNA e do gene 16S rRNA. A primeira abordagem que surgiu para contribuir com a melhor definição das relações filogenéticas em procariontes foi a utilização de marcadores moleculares que tivessem uma taxa de evolução mais rápida que o gene 16S rRNA, mas suficientemente conservado para reter informações genéticas (MARTENS et al., 2007). Esses genes que codificam proteínas/enzimas que participam do metabolismo básico da célula chamados de *genes housekeeping*, devem estar em diversos locus cromossomiais e ser amplamente distribuídos entre os táxons (STACKEBRANDT et al., 2002). Existem diversos desses genes que são utilizados de acordo com o gênero que se está trabalhando. Para estudar grupos isolados dentro do gênero *Bradyrhizobium* os genes *housekeeping recA*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *rpoB* e *atpD* têm sido utilizados (VINUESA et al., 2005; ORMEÑO-ORILLO et al., 2006; ISLAM et al., 2008). Eles têm importantes funções nas células procariontas. O gene *recA* codifica a recombinase A que é envolvida na recombinação de sequências de DNA complementares. O *dnaK* codifica a proteína conservada Hsp70, o *glnII* codifica glutamina sintetase II, *gyrB* codifica a topoisomerase II, o produto do gene *rpoB* é essencial para a transcrição do DNA a

mRNA e o *atpD* codifica a subunidade beta da ATP sintase da membrana (MENNA et al., 2009; RIVAS et al., 2009).

A análise das sequências de diversos genes *housekeeping* conservados é conhecida como a técnica de MLSA (Multilocus Sequence Analysis). Ela foi sugerida por Gevers et al. (2005) e consiste na análise de diversos desses genes dispersos em pelo menos 100 kb do genoma (GODOY et al., 2003 COOPER e FEIL, 2004). Pelas informações obtidas a partir da comparação e a combinação deles gera uma visão global e confiável das relações entre organismos (MARTENS et al., 2008). Através dessa técnica de alta resolução, estudos tem mostrado que é possível a discriminação de isolados a nível de espécie (ZEIGLER, 2003; DELAMUTA et al., 2013). Definições de grupos filogenéticos de rizóbios tem sido bem-sucedida quando obtidas através de MLSA (MENNA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009). Sendo assim a MLSA é uma valiosa alternativa a análise da hibridização DNA-DNA e a sequência do 16S rRNA para elucidar a taxonomia de rizóbios (RIBEIRO et al., 2009).

Além dos genes *housekeeping*, outros chamados de genes auxiliares, também são utilizados como complemento as informações genéticas e filogenéticas para descrição de espécies. Dentre eles, os mais estudados são *NodA*, *NodC* e *NifH* entre outros. Os genes *Nod*, presente nas bactérias do grupo dos rizóbios, são ativados pelos flavonoides liberados pelas raízes das leguminosas (PEIX et al., 2015). Esses quimioatrativos determinam a síntese de fatores *Nod* que são as principais moléculas de sinal para a nodulação (PERRET et al., 2000). Tanto a quantidade quanto o tipo de fator *Nod* são importantes na determinação da especificidade do microrganismo quanto ao hospedeiro, embora alguns simbioses apresentem diferentes fatores *Nod* que permitem que as mesmas plantas hospedeiras sejam noduladas efetivamente (LAGUERRE et al., 2001). O gene *NifH* também é muito utilizado na caracterização de espécies de rizóbios. Este gene está relacionado a síntese da nitrogenase; é responsável pela codificação de duas subunidades idênticas da dinitrogenase redutase (MEYER et al., 2011) e tem sido útil nas análises filogenéticas.

A identidade média de nucleotídeos de genes compartilhados entre duas estirpes (do inglês, ANI Average Nucleotide Identity) tem sido proposta como uma possível alternativa a reassociação DNA:DNA (KONSTANTINIDIS e TIEDJE, 2005). Pesquisas recentes têm mostrado que essa metodologia representa uma análise robusta de distância evolucionária e genética entre as cepas avaliadas (GORIS et al., 2007). De acordo com as avaliações realizadas por Konstantinidis e Tiedje (2005), ANI mostrou forte correlação entre a reassociação do DNA-DNA. Considerando para a hibridização o valor de 70%, a média de identidade de nucleotídeos correspondeu a um padrão de 93-94%. Atualmente, como sugerido por Richter e Rosselló-Morá (2009) os valores de ANI adotados são 95-96%, correspondente ao valor padrão de HDD para circunscrever espécies.

O sequenciamento de genomas está em grande expansão, porém não tem sido bem aceito como fonte de informações taxonômicas (RAMASAMY et al., 2014). Muitos autores têm encontrado alguns pontos negativos na genômica. Um deles seria que o número cada vez maior de genomas sequenciados de procariontes é majoritariamente de interesse biotecnológico e médico (ZHI et al., 2012). Outro ponto relevante é que as sequências disponíveis nem sempre são de estirpes tipo (descendentes dos isolados originais), são depositadas qualquer uma outra correspondente a um grupo, a qualidade das mesmas no banco de dados se encontram em diferentes formas, ora completas, ora em forma de contigs entre outras (TINDALL et al., 2010; RICKER et al., 2012). Sendo assim, é importante salientar que para que as sequências genômicas sejam utilizadas uma padronização de depósito das mesmas é necessária e a aplicação da tecnologia deve ser mais amplamente aplicada.

O panorama atual em que se encontra a taxonomia polifásica para a descrição de espécies de procariontes é caracterizada pela reunião de características fenotípicas, genotípicas e filogenéticas. De uma forma geral Tindall et al (2010) recomendaram quais seriam os métodos que devem ser implementados e melhor usados. O fenótipo dos organismos procariotos geralmente são caracterizados pela forma das células, morfologia, temperatura, pH e testes bioquímicos. No gênero *Bradyrhizobium* é muito comum a determinação dos ácidos graxos presentes nas células (SILVA et al., 2014; DELAMUTA et al., 2015; YAO et al., 2015). Já para os estudos genotípicos utiliza-se o gene 16S rRNA como uma ferramenta primária a fim de indicar qual gênero as estirpes podem pertencer e fornece indícios de que podem pertencer a uma nova espécie. Além desse, usa-se o conteúdo de G+C mol%, a HDD embora apresente diversas limitações. Alguns trabalhos já vêm substituindo essa técnica pela ANI (DELAMUTA et al., 2015; BARAÚNA et al., 2016). E para análises genotípicas e posterior filogenia, utiliza-se o gene 16S rRNA e genes conservados, genes *housekeeping*. Esses últimos ao serem sequenciados e avaliados isoladamente e concatenados (MLSA) oferecem informações mais robustas e acuradas na definição do táxon de supostas novas espécies.

2.2 Gênero *Bradyrhizobium*

Alphaproteobactérias com capacidade de estabelecer nodulação radicular e fixar N em simbiose com plantas da família *Fabaceae* foram inicialmente classificadas como *Bacillus radiicola* e posteriormente acomodadas dentro do gênero *Rhizobium* (FRANK, 1889). Durante praticamente um século (entre o final dos anos de 1880 a 1980) todas as bactérias com capacidade de estabelecer nodulação e fixar N eram consideradas pertencentes a apenas este gênero (FRANK 1889; ZAKHIA e DE LAJUDIE 2001). Dentro dele, estavam acomodadas as tradicionais espécies *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium trifolii* e *Rhizobium phaseoli* (JORDAN, 1982, 1984).

Com a crescente caracterização desse gênero, observou-se que alguns organismos apresentavam características diferentes do gênero *Rhizobium* como o crescimento lento e a não produção ácida das bactérias foi proposto o estabelecimento de um novo gênero para abriga-las. Esse gênero foi mais tarde denominado de *Bradyrhizobium*. Nesse mesmo período, através da técnica de hibridização DNA-DNA Hollis et al (1981) descreveu três grupos homólogos entre estirpes da espécie *Rhizobium japonicum*. Dois grupos, I e Ia correspondem a espécie atual chamada de *Bradyrhizobium japonicum*.

Portanto, todas as bactérias nodulíferas e com crescimento lento eram classificadas como *Bradyrhizobium japonicum* inicialmente e permaneceu assim até o início da década de 1990. Era notório, no entanto, já naquela época uma grande heterogeneidade entre as bactérias que compunham o recém-criado gênero, sendo sugerido que estirpes que não se enquadrassem dentro da espécie *B. japonicum*, deveriam ser indicadas como *Bradyrhizobium* sp. seguido do nome do gênero da leguminosa que havia sido isolada; ex. *Bradyrhizobium* sp. (caupi) (JORDAN, 1982). Em 1992, Kuykendal et al. estudou um grupo de bactérias dentro do gênero *Bradyrhizobium* isoladas de soja (*Glycine max*) e propôs a espécie *B. elkanii*. Em termos de morfologia, as principais diferenças entre *B. japonicum* e *B. elkanii* é o fato das colônias desta última, quando em meio YMA coalescerem, enquanto as de *B. japonicum* mantêm o formato convexo (KUYKENDAL et al. 1992). Mais tarde, foi demonstrado diferenças marcantes no genoma destas espécies, tendo sido sugerido a divisão em grupos I e II do gênero *Bradyrhizobium* com base na sequência do 16S rRNA e também homologia DNA:DNA (WILLEMS et al., 2001).

Com o advento das técnicas moleculares, pela sua abundância e devido sua importância em termos econômicos, este gênero tem sido objeto de vários estudos e hoje estão descritas 33 espécies dentro do gênero (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies descritas dentro do gênero *Bradyrhizobium*

Espécies	Autores
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	(Kirchner 1896) Jordan 1982, comb.
<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i>	(Ohta and Hattori 1985) Ramírez-Bahena et al. 2013, comb. nov.
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Kuykendall et al. 1993, sp. Nov
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	Xu et al. 1995, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium yuanningense</i>	Yao et al. 2002, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium betae</i>	Rivas et al. 2004, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	Vinuesa et al. 2005, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	Ramírez-Bahena et al. 2009, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	Ramírez-Bahena et al. 2009, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	Islam et al. 2008, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium denitrificans</i> (Hirsch and Müller 1986)	van Berkum et al. 2011, comb. nov.
<i>Bradyrhizobium lablabi</i>	Chang et al. 2011, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	Chahbourne et al. 2011, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i>	Zhang et al. 2012, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium daqingense</i>	Wang et al. 2013, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium ganzhouense</i>	Lu et al. 2014, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium icense</i>	Durán et al. 2014, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium ingae</i>	Da Silva et al. 2014, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium paxllaeri</i>	Durán et al. 2014, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium retamae</i>	Guerrouj et al. 2014, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium rifense</i>	Chahboune et al. 2012, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium lupini</i>	Peix et al. 2015, comb. nov.
<i>Bradyrhizobium manausense</i>	Silva et al. 2014, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium neotropiale</i>	Zilli et al., 2014, sp.nov.
<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	Yu et al. 2014, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium subterraneum</i>	Gronemeyer et al. 2015, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	Delamuta et al. 2015, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i>	Helene et al. 2015, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium guangdongense</i>	Li et al. 2015, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium embraense</i>	Delamuta et al. 2015, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i>	Yao et al. 2015, sp. nov
<i>Bradyrhizobium kavangense</i>	Lasse gronemeyer et al. 2015, sp. nov. Ramírez-Bahena et al. 2009, sp. nov.
<i>Bradyrhizobium ferriligni</i>	Yao et al. 2015, sp. nov.

* As espécies foram obtidas através do site: <http://www.bacterio.net/bradyrhizobium.html>.

De forma geral, bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são capazes de se adaptar muito bem a ambientes diversos e contrastantes, podendo se desenvolver em ambientes aquáticos,

de forma endofítica (ISLAM et al., 2008; ROUWS et al., 2014) e também de forma simbiótica. Apresentam também versatilidade nas associações simbióticas e fisiológicas, ampla distribuição geográfica (MENNA et al., 2009) e alta variabilidade genética (DELAMUTA et al., 2012).

Estirpes de *Bradyrhizobium* têm sido encontradas em nódulos de leguminosas de tribos muito divergentes, indo de plantas herbáceas a espécies arbóreas (MENNA et al., 2009). É provável que este grupo tenha se originado de regiões tropicais (LLORET e MARTÍNEZ-ROMERO, 2005) e representa a maior parte dos simbiossomas nas condições brasileiras (MOREIRA, 1991). Nodula amplamente leguminosas tropicais (MOREIRA et al., 1993) e predomina como organismo isolado em maior número de nódulos de leguminosas da Amazônia (MOREIRA et al., 1998).

Diversos trabalhos têm demonstrado que organismos desse gênero apresentam altas taxas de FBN e com isso associações muito bem-sucedidas (GILLER et al., 2001). O principal exemplo é a soja (onde a fixação dispensa a aplicação de fertilizante nitrogenado e a economia com a substituição de fertilizantes nitrogenados é estimada em US\$ 10 bilhões ao ano (HUNGRIA et al., 2000). Outro exemplo é o amendoim (*Arachis hypogaea*) onde a FBN contribui com o suprimento de N acima de 80% (URQUIAGA et al., 2006).

2.3 *Centrolobium* spp.

Nos biomas brasileiros, encontram-se inúmeras espécies de leguminosas importantes para a sociedade como um todo uma vez que a alimentação humana é altamente dependente de plantas da família *Fabaceae*. Dentre elas estão leguminosas arbóreas que representam significativamente a Floresta Atlântica brasileira (PAGANO et al., 2008). Entre essas está o gênero *Centrolobium*. Esse se distribui ao longo da América do Sul, inclusive no Brasil (DAHMER et al., 2009) está presente em diversos estados, embora cada espécie predomine em regiões mais específicas (Figura 1). As espécies pertencentes a esse gênero são bastante valiosas devido a madeira que produzem pois são bem coloridas e bem duráveis (PIRIE et al., 2009), são utilizadas para móveis, carpintaria de forma geral e para construção de barcos (DAHMER et al., 2009). Das sete espécies já descritas, cinco estão presentes no território brasileiro como o *Centrolobium microchaete*, *C. robustum*; *C. sclerophyllum*; *C. tomentosum*, *C. paraense* (Figura 1).

O *C. paraense* é uma espécie de grande importância social, econômica e ecológica. Social e econômica porque sua madeira é usada pelas comunidades nativas e pela indústria onde a espécie ocorre (DAHMER et al., 2009). Ecológica devido aos diversos benefícios gerados como proteção a erosão dos solos e o aumento da disponibilidade de N através da FBN (BARAÚNA et al., 2014). Porém, mesmo diante de tantos benefícios a espécie se encontra cada vez mais vulnerável. Com o desmatamento da Floresta tropical da Amazônia pela extração indiscriminada de madeira e desmatamento a espécie está ameaçada (DAHMER et al., 2009)). A redução da sua população nos próximos dez anos pode ser acima de 30% (PIRIE et al., 2009).

Sendo assim, torna-se interessante entender mecanismos essenciais que ocorrem nessa espécie como fertilidade dos solos, acesso a eficiência simbiótica de bactérias fixadoras através do isolamento e caracterização dos mesmos, inclusive a avaliação da viabilidade de simbiossomas para produção de inoculantes, uma vez que a espécie desempenha um forte papel em parte da região Norte do Brasil, além de outras funções essenciais ao equilíbrio e manutenção do meio ambiente.

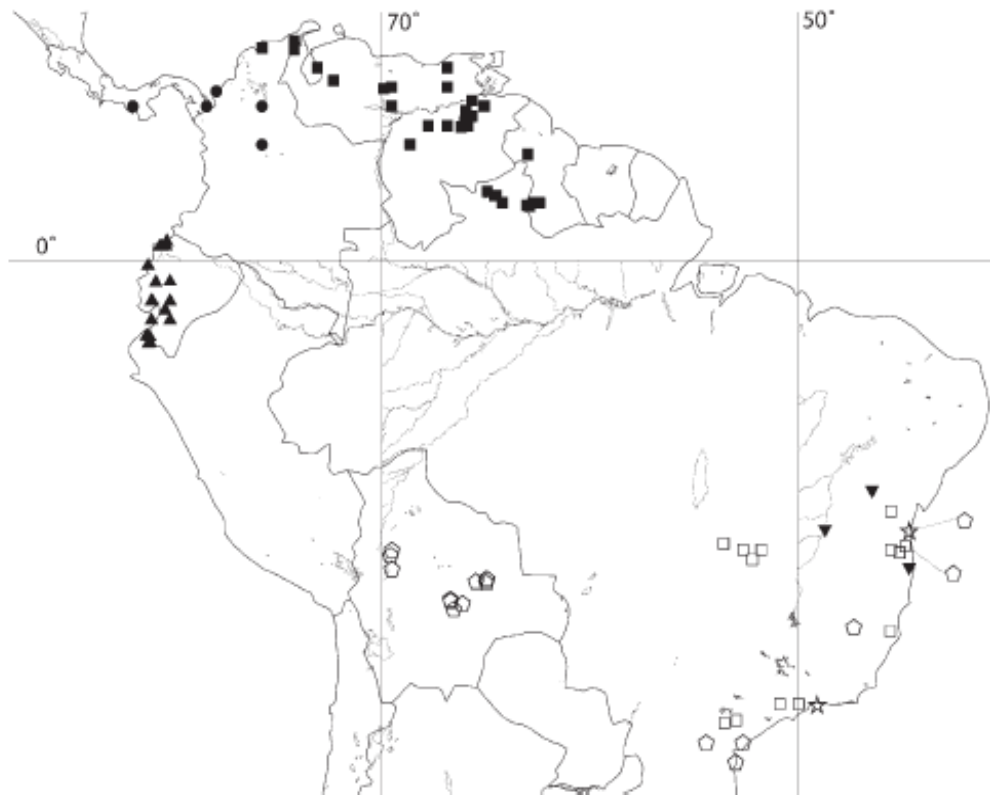


Figura 1. Mapa de distribuição de espécies de *Centrolobium*. *C. yavizanum* = círculos cheios; *C. paraense* = quadrados cheios; *C. ochroxylum* = triângulos cheios (ápice para cima); *C. microchaete* = pentágonos; *C. tomentosum* = quadrados abertos; *C. sclerophyllum* = triângulos cheios (ápice para baixo); *C. robustum* = estrelas. Fonte: Pirie *et al.*, 2009. Revision and Biogeography of *Centrolobium* (Leguminosae- Papilionoideae), Systematic Botany, 34(2); pp345-359.

2.4 Estudos Recentes nas Espécies de *Centrolobium paraense*

Comumente conhecido como “pau-rainha”, o *C. paraense* ocorre na região amazônica sendo predominante no estado de Roraima (PIRIE *et al.*, 2009). Se desenvolve em florestas de galeria, semi-decíduas e de transição (BARAÚNA *et al.*, 2014; ZILLI *et al.*, 2014). Mesmo com grande importância ecológica, social e econômica sua exploração tem sido de forma não sustentável, levando a diminuição dessa planta como recurso. Estima-se que nos próximos anos, essa espécie sofra um declínio de sua população natural de mais de 20% (BARAÚNA *et al.*, 2014; PIRIE *et al.*, 2009).

Para que os dados preocupantes citados anteriormente sejam combatidos ou minorizados, são necessários maiores estudos e o entendimento dos diversos mecanismos que a espécie utiliza para sobreviver no ambiente natural. Dentre eles está a FBN, através da qual leguminosas como *C. paraense* mantêm o balanço de N nos trópicos, sendo ainda uma alternativa valiosa e econômica para a adição de N no sistema solo-planta-animal (SOUZA *et al.*, 1994).

Pouco se sabe sobre o processo de FBN no que se refere a habilidade de nodulação e fixação de N (MARQUES et al., 2001), como quais simbioses são capazes de estabelecer tal processo. Alguns trabalhos preliminares afirmam que bactérias fixadoras em plantas leguminosas tropicais pertencem, majoritariamente ao gênero *Bradyrhizobium* (MOREIRA et al., 1998). Outros afirmam que o *C. paraense* é capaz de nodular com micro-organismos do grupo dos rizóbios nativos dos solos amazônicos (SOUZA et al., 1994; BARAÚNA et al., 2014) e que os principais gêneros simbioses com espécies de *Centrolobium* são *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Baraúna et al. (2014) apontaram que 90% das suas 178 estirpes de bactérias isoladas apresentavam características fenotípicas de *Bradyrhizobium*, e a predominância desse gênero foi confirmada pelo sequenciamento do 16S rRNA. Além disso, também foi observado que os diferentes grupos formados parecem pertencer a espécies distintas das já descritas, o que leva a conclusão de que o *C. paraense* é capaz de nodular com diferentes espécies de *Bradyrhizobium*. Nesse mesmo ano, algumas estirpes isoladas nesse trabalho foram caracterizadas através da taxonomia polifásica. A partir desses resultados concluiu-se que formavam uma nova espécie chamada de *B. neotropicalis* (ZILLI et al., 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do trabalho foram selecionadas estirpes isoladas da espécie *Centrolobium paraense*. No total, foram selecionadas 13 estirpes pertencentes a dois possíveis diferentes grupos de isolados: BR10245^T, BR 10290, BR 10346, BR 10351, pertencentes ao grupo I e BR 10303^T, BR 10365, BR 10362, BR 10356, BR 10355, BR 10363, BR 10358, BR 10348, BR 10359, pertencentes ao grupo II. Todas estirpes encontram-se depositadas no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD).

As análises genéticas, fenotípicas e de filogenia foram realizadas no Laboratório de Ecologia Microbiana e Laboratório Multiusuário da Embrapa Agrobiologia, no município de Seropédica, cidade do Rio de Janeiro. As análises da composição de ácidos graxos foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. O sequenciamento dos genes amplificados 16S rRNA, dos genes *housekeeping* (*recA*, *glnII*, *gyrB*, *dnaK*, *rpoB*) e dos genes simbióticos (*nodC* e *nifH*) das treze estirpes também foi realizado no Laboratório de Genoma também da Embrapa Agrobiologia.

3.1 Caracterização Genotípica

3.1.1 Extração do DNA e amplificação de genes

Para a extração total do DNA, as bactérias foram cultivadas em meio YMA (abreviação dos compostos extrato de levedura, manitol e ágar (VINCENT, 1970) em placas de Petri por aproximadamente sete dias e, posteriormente, inoculadas em Erlenmeyers com o mesmo meio líquido onde foram mantidas por 4 a 5 dias em shaker a 28°C a uma rotação de 130 rpm para o crescimento celular. Posteriormente, 1 mL das culturas crescidas foi transferido para microtubos e centrifugadas a 1200 a 1400 rpm. O “pellet” formado foi estocado a -20°C até a extração do DNA. A extração realizada através do kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

Para a determinação da concentração e qualidade do DNA, 1µL do DNA extraído de cada uma das 13 estirpes foi aplicado no equipamento Nanodrop 200C Thermo Scientific acoplado ao computador onde o software Thermo Scientific NanoDrop 2000/2000c se encontra instalado.

Com os resultados satisfatórios da medição citada acima, as amostras foram submetidas a diferentes condições de PCR (Polymerase Chain Reaction) para o gene ribossomal 16S rRNA, para os genes *housekeeping* *recA*, *rpoB*, *dnaK*, *glnII* e *gyrB* e para os genes simbióticos *nodC* e *nifH*. Para cada gene o mix da PCR foi diferenciado. O mix consistiu nos seguintes reagentes com as respectivas concentrações estoque: H₂O ultrapura esterilizada (µL); Tampão (5X); MgCl₂ (25 mM); dNTP (10 mM); iniciadores (10 µM); Taq DNA polimerase (500U). Nas reações, as concentrações finais dos reagentes foram: Tampão (1X), MgCl₂ (2,50-3,0 mM), dNTP (0,25 mM), iniciadores (0,5 µM) e Taq DNA polimerase (2,5U). O volume total de cada mix de PCR variou entre 25 e 50µL. As condições de amplificação e as sequências dos iniciadores utilizados estão na Tabela 2.

De um modo geral, utilizou-se 35 ciclos durante o processo da PCR. Ao longo desses ciclos ocorreram as etapas de desnaturação, anelamento e alongação. A temperatura e o tempo com que essas etapas aconteceram variaram pois iniciadores específicos para cada gene exigiam diferentes temperaturas de anelamento e tempo para a desnaturação do DNA. As sequências de nucleotídeos de cada iniciador e os ciclos usados para cada um dos genes estão na Tabela 2. Após a realização da PCR, os perfis de bandas foram visualizados em gel de

agarose com concentrações variando de 1,4 a 2,0%. Para identificação das bandas utilizou-se o brometo de etídeo a $10\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.1.2 “*Fingerprint*” box-PCR

As estirpes bacterianas para a realização dessa técnica foram crescidas em placas de Petri contendo meio YMA. Ao atingirem, aproximadamente 5 dias de crescimento, a 28°C , as colônias isoladas foram colocadas em microtubos contendo $100\mu\text{L}$ de água ultrapura esterilizada e estocadas para que pudesse ser feito o Box PCR. Para a realização dessa técnica, entre 1- 2 μL eram retirados desses $100\mu\text{L}$ para a realização do Box PCR. Todas estirpes dos dois grupos formados nesse trabalho foram avaliadas e as espécies *B. neotropicale* BR 10247^T, *B. elkanii* USDA 76^T e *B. pachyrhizi* PAC 48^T.

O programa no termociclador consistiu das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 94°C por 1 min, anelamento a 53°C por 1 min, em seguida 65°C por 8 min e extensão final a 65°C por 16 min. O iniciador usado foi o Box A1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3') (VERSALOVIC et al., 1994) (Tabela 2). Após a realização da PCR, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%.

Tabela 2. Relação de iniciadores, suas respectivas sequências e ciclos utilizados como referência

Genes	Iniciador	Sequência 5'-3'	Ciclos	Referência
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	94°C 5', 30x 94°C 30', 58°C 1', 72°C 1', 72°C 7'.	WEISBURG et al., 1991
	1492 R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		
<i>recA</i>	41 F	TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG	95°C por 3' 30", seguido de 30 ciclos a 93,5°C por 1' 58°C 1' e 72°C por 1' e 72°C por 1'.	VINUESA et al., 2005
	640 R	ACATSACRCCGATCTTCATGC		
<i>rpoB</i>	RpoB 83F	CCTSATCGAGGTTACAGAAGGC	95°C 5', 3x (94°C 2', 58°C 2', 72 °1'), 30 x(94°C 30", 58°C 1', 72°C 1'), 72°C 5'.	MARTENS et al., 2008
	RpoB 1061R	AGCGTGTTGCGGATATAGGCG		
<i>glnII</i>	12 F	YAAGCTCGAGTACATYTTGGCT	95°C por 3' 30", seguido de 30 ciclos a 93,5°C por 1' 58°C 1' e 72°C por 1' e 72°C por 1'.	VINUESTA et al., 2005
	689 R	TGCATGCCSGAGCCGTTCCA		
<i>dnaK</i>	1411 F	TTCGACATCGACGCSAACGG	95°C por 2', 35x (45s 95°C, 30s 58°C, 1.5' 72°C) 72°C por 7'.	MENNA et al., 2009
	1905 R	GCCTGCTGCKTGTACATGGC		
<i>nifH</i>	POL F	TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC	94°C por 5', 30x (94°C 1', 55°C 2', 2' 72°C), 5' 72°C	POLY et al., 2001
	POL R	ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA		

<i>nod C</i>	540 F	TGATYGAYATGGARTAYTGGCT	94°C por 3', 1x96°C 20'', 65°C 30'', 72°C 30'', 2x 96°C 20'', 59°C 30'', 72°C 40'', 4x 96°C a	SARITA et al., 2005
	1160R	CGYGACARCCARTCGCTRRTTG	20'', 96°C 30'', 72°C 4'', 5x 96°C 20'', 53°C 30'', 72°C 50'', 25x 94°C 20'', 50°C 30'', 72°C 60'' e 72°C 5''.	
<i>gyrB</i>	343 F	YAAGCTCGAGTACATYTGGCT	95°C por 3' 30'', seguido de 30 ciclos a 93,5°C por 1' 58°C 1' e 72°C por 1'	MARTENS et al., 2008
	1043R	TGCATGCCSGAGCCGTTCCA	e 72°C por 1'.	
Box-PCR	Box A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	95°C por 5 min, 94°C por 1 min, 53°C por 1 min, em seguida 65°C 8 min e 65°C 16 min	VERSALOVIC et al., 1994

3.1.3 Média da identidade de nucleotídeos (ANI, do inglês “Average nucleotide identity”)

Os cálculos do ANI foram realizados através do programa JSpecies v1.2.1 (RICHTER e ROSSELLÓ-MORA, 2009), baseado no alinhamento par a par de todo o genoma, usando os programas Blast e Mummer. Os genomas das estirpes BR 10245^T (LUUB00000000), BR 10303^T (LNCU00000000), *Bradyrhizobium neotropale* BR 10247^T (NZ_LSEF00000000) foram sequenciados no Laboratório de Genoma da Embrapa Agrobiologia e os das espécies *B. elkanii* USDA 76^T (NZ_ARAG00000000), *B. pachyrhizi* PAC 48^T (NZ_LFIQ00000000), *B. viridifuturi* SEMIA 690^T (NZ_LGTB00000000), *B. embrapense* SEMIA 6208^T (NZ_LFIP00000000), *B. tropiciagri* SEMIA 6148^T (NZ_LFLZ00000000) e *B. stylosanthis* BR 446^T (NZ_LVEM00000000) foram obtidos do banco de dados genéticos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os valores considerados para que estirpes sejam consideradas da mesma espécie é acima de 95-96% (RICHTER e ROSSELLÓ-MORÁ, 2009).

3.1.4 Conteúdo de G+C

Foi determinado através do programa JSpecies v1.2.1 (RICHTER e ROSSELLÓ-MORÁ, 2009). Os genomas das estirpes BR 10245^T, BR 10303^T, *B. elkanii* USDA 76^T, *B. pachyrhizi* PAC 48^T, *B. viridifuturi* SEMIA 690^T, *B. embrapense* SEMI 6208^T, *Bradyrhizobium tropiciagri* SEMIA 6148^T e *B. stylosanthis* BR 446^T foram utilizados para determinar a proporção de guaninas e citosinas dentro do número total de nucleotídeos dentro do genoma de cada uma das estirpes avaliadas (KOLTHOFF et al., 2014).

3.2 Sequenciamento e filogenia

Inicialmente, a concentração de DNA de cada uma das amostras que foram amplificadas através da técnica do PCR para os genes 16S rRNA, *recA*, *rpoB*, *dnak*, *glnII* e *gyrB*, *nodC* e *nifH* foram quantificadas através do equipamento Qubit (o volume de amostra utilizado para tal medição é de 2µL de DNA/amostra). Após atingir os 15ng/µL mínimos para o sequenciamento, na etapa seguinte realizou-se a purificação enzimática das alíquotas do produto de PCR com volume total de 10µL de cada gene mais as enzimas EXO I 20U/µL (Thermo EM 581) e 0,7 µL de FastAP 1U/µL (Thermo EF 0651). Esse “mix” foi submetido ao Termociclador com as seguintes condições: 37°C por 15 minutos e em seguida, 85°C por 20 minutos. O objetivo da purificação foi remover restos de iniciadores e de dntps das reações de PCR para os genes citados acima.

A última etapa consistiu nas reações de marcação de sequenciamento, ou seja, as reações de controle e das amostras em análise. A reação de controle consistiu dos seguintes reagentes: 2µL de Pgem (200 ng/µL), 4 µL de M13 - primer (0,8 pmoles/ µL), 1,5 µL de água de PCR, 1,5 µL de tampão da reação 1,5x e 1,0 µL de Big Dye. Essa reação funcionou como referência para se saber se as reações estavam ocorrendo. As reações das amostras foram realizadas pelo DNA de cada um dos genes das estirpes testadas mais a água de PCR num volume de 6,5 µL, os iniciadores de cada um dos genes avaliados (1µL), tampão da reação (1,5µL), Big Dye (1µL), num total de reação de 10µL. As reações de controle e das amostras foram conduzidas ao Termociclador nas condições: Desnaturação a 96°C (1X) por 1 min, 96°C por 15s e anelamento a 50°C por 15s e 60°C por 4 min, repetidas por 35-40 ciclos. O kit de sequenciamento utilizado para ambas as reações foi o Big Dye terminator v. 3.1 cycle sequencing Life 4337455.

A purificação após a reação foi feita com EDTA, etanol e acetato de sódio e as amostras foram ressuspensas em formamida bidestilada. O sequenciamento foi realizado no

equipamento Applied Biosystem (ABI) 3500 no laboratório de genômica da Embrapa Agrobiologia.

A qualidade e a montagem das sequências foram avaliadas através do programa Bionumerics versão 7.0. Em seguida, as sequências foram comparadas de acordo com sequências já existentes no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology information). Subsequentemente, foram cortadas e alinhadas através do programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão 7.0 (KUMAR et al., 2016). Com o mesmo programa, com o auxílio do algoritmo Maximum likelihood (FELSENSTEIN, 1981) e utilizando o modelo de distância evolutiva Jukes e Cantor (JUKES e CANTOR, 1969) foi realizada a análise filogenética das estirpes.

As árvores filogenéticas foram montadas de forma individual para os genes 16S rRNA, genes *housekeeping* (*recA*, *rpoB*, *dnaK*, *glnII* e *gyrB*) e para os genes simbióticos *nodC* e *nifH*. As árvores concatenadas foram construídas para os genes *housekeeping*, utilizando o programa Seaview 3.2. A confiabilidade das análises filogenéticas foi inferida através do cálculo de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), com 1.000 repetições (HEDGES, 1992). Como “outgroup” foi utilizada a espécie *Microvirga vignae*.

3.3 Caracterização fenotípica

3.3.1 Perfil de ácidos graxos

O teste de ácidos graxos foi realizado com as estirpes representantes de cada grupo em estudo mais outra estirpe de cada um destes grupos (BR 10303^T, BR 10290, BR 10245^T e BR 10348). Essas foram previamente crescidas em placas de Petri com meio YMA por sete dias a 28°C. Os ácidos graxos foram extraídos das estirpes BR 10245^T, BR 10290, BR 10303^T e BR 10348 e das espécies *B. neotropicale* BR 10247^T, *B. elkanii* USDA 76^T e *B. pachyrhizi* PAC 48^T de acordo com o protocolo MIDI (http://www.microbialid.com/PDF/Technote_101.pdf) (DELAMUTA et al., 2013).

3.3.2 Testes API 20 NE e Biolog GN2

Para outros testes fenotípicos utilizou-se também o kit API 20 NE (bioMérieux) e Biolog (GNII microplates) (TINDALL et al., 2010). O primeiro teste consistiu na determinação das propriedades bioquímicas das bactérias. Através desse, foi possível observar a conversão do substrato fornecido para a utilização em processos enzimáticos além da assimilação de sais e açúcares pelas bactérias. Para tal determinação, foram seguidas as instruções fornecidas no kit. Todas as estirpes treze isoladas de *Centrolobium paraense* foram analisadas. Após a realização do teste as bactérias permaneceram sob temperatura de 28°C por sete a oito dias. Os resultados foram avaliados como positivos ou negativos conforme a coloração dos poços (Figura 2).

Já o segundo identifica e caracteriza grande número de bactérias gram negativas como as do gênero *Bradyrhizobium*, através da resposta de reações metabólicas das bactérias com relação as 95 diferentes fontes de carbono existentes. As interpretações dos testes podem ser feitas manualmente ou através do semi-automático MicrostationTM e o Omnilog automático.



Figura 2. Resultados de testes API 20NE. A coloração evidencia a reação das bactérias com relação ao substrato fornecido. O sinal de + representa reações positivas e o sinal de – reações negativas.

Para o teste as bactérias foram crescidas em meio YMA. Após esse procedimento, através de uma alça de platina, as bactérias foram retiradas das placas onde foram crescidas e suspensas em um fluido inoculante proveniente do kit Biolog GN II microplates. Após atingir a turbidez adequada, essa suspensão foi aplicada nos poços das placas também provenientes do kit num volume de 150 μL para cada poço onde havia uma fonte de carbono para ser avaliada. Posteriormente, essas placas ficaram encubadas por 7 a 10 dias a 28°C.

Outras avaliações foram feitas, como o crescimento das estirpes em diferentes concentrações salinas (NaCl), diferentes temperaturas e valores de pH (VANDAMME et al., 1996). O crescimento das estirpes foi avaliado em concentrações de NaCl (%p/v) que variaram de 0,1 a 2,5 (%p/v). Para a temperatura, o intervalo utilizado para crescimento foi de 15°C a 38°C e para pH foi de 4,0 a 11,0. Para esses três testes fenotípicos, o meio de cultura mais utilizado foi o YMA (VINCENT, 1970). Porém, para testes de pH abaixo de 7,0 utilizou-se o meio YM.

3.3.3 Resistência a antibióticos

Primeiramente, as bactérias foram crescidas em placas de Petri contendo meio YMA por sete a oito dias. Em seguida, as estirpes foram transferidas para erlenmeyer com meio YM onde permaneceram incubados sob 100 rpm a 28°C por quatro a cinco dias. Após esse procedimento, as bactérias tornaram-se aptas a serem inoculadas nas placas de Petri novamente onde ocorreram os testes. O volume aplicado foi de 100 μL de cada amostra e o espalhamento se deu pela alça de Drigalski por toda a superfície do meio YMA (HELENE, 2015). Os discos de antibióticos se localizaram no centro de cada placa com a concentração de cada antibiótico que se desejou testar. Através do halo de inibição, determinou-se a sensibilidade ou resistência aos antibióticos.

O kit utilizado para testar a sensibilidade das bactérias foi o Sistema Sensidisc dispenser (Oxoid) com bio-discos (Oxoid). As concentrações de antibiótico testadas são correspondentes a cada disco. São eles: Ampicilina (10 e 25 μg), eritromicina (30 μg), gentamicina (10 μg), canamicina (30 μg), estreptomomicina (10 e 25 μg), tetraciclina (30 μg), clorofenicol (30 e 50 μg) e rifampicina (5 e 30 μg). As placas foram incubadas a 28°C e as leituras foram feitas após 10 dias.

3.3.4 Teste de inoculação cruzada

No grupo dos rizóbios, a denominação simbiovar pode ser definida se baseando na capacidade das bactérias nodularem determinadas leguminosas, além das análises do gene *nodC* (ROGEL et al., 2011). Dessa forma, para se determinar o comportamento de nodulação das estirpes tipos dos grupos 1 e 2 e de uma estirpe de cada um desses grupos foi realizado um experimento em câmara de crescimento utilizando garrafas Long neck com 300 mL de solução de Norris (GRUZMAN e DOBEREINER, 1968) para cada leguminosa testada. Foram feitas três repetições para cada uma das 23 plantas para cada uma das quatro estirpes inoculadas. As bactérias foram inoculadas num volume de 1 mL após terem sido crescidas em meio YM por 5 dias.

Após passados 30 dias foi avaliada a presença ou ausência de nódulos, caso houvessem nódulos, avaliou-se se eram efetivos ou não e por fim, qual a diversidade de plantas que eram capazes de nodular com microrganismos pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. As diferentes leguminosas testadas se encontram na Tabela 3.

Tabela 3. Plantas hospedeiras e as estirpes BR 10245^T, BR 10290, BR 10303^T e BR 10348 testadas.

Plantas hospedeiras		
Nome comum	Nome científico	Tribo
Crotalária	<i>Crotalaria juncea</i>	Crotalariaeae
Estilosantes	<i>Srylosanthes guianensis</i>	
Pau rainha	<i>Centrolobium paraense</i>	Dalbeigiae
Amendoim comum	<i>Arachis hypogaea</i>	
Ervilha comum	<i>Pisum sativum</i>	Fabeae
Fava	<i>Vicia fava</i>	
Tremoço comum	<i>Lupinus angustifolius</i>	Genisteae
Tremoço branco	<i>Lupinus albus</i>	
Serradela amarela	<i>Ornithopus compressus</i>	Loteae
Acácia	<i>Acacia ligulata</i>	Mimoseae
Leucena	<i>Leucaena leucocephala</i>	
Kudzu tropical	<i>Pueraria phaseoloides</i>	
Calopogônio	<i>Calopogonium mucunoides</i>	
Feijão comum	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
Soja	<i>Glycine max</i>	
Centrosema	<i>Centrosema pubescens</i>	
Guandu	<i>Cajanus cajan</i>	Phaseoleae
Mucuna cinza	<i>Mucuna pruriens</i>	
Feijão bravo	<i>Canavalia brasiliensis</i>	
Feijão-caupi	<i>Vigna unguiculata</i>	
Feijão azuki	<i>Vigna angularis</i>	
Feijão mungo	<i>Vigna radiata</i>	
Siratô	<i>Macroptilum atropurpureum</i>	

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Genotípica

4.1.1 Box PCR

Ao analisar o dendograma obtido a partir da “impressão digital” de cada uma das 16 estirpes avaliadas, é possível notar que as pertencentes ao grupo I apresentaram um perfil similar, atingindo um percentual de 70%, sendo as estirpes BR 10351 e BR10346 100% similares. A espécie mais próxima ao grupo foi *B. pachyrhizi*, embora o percentual de similaridade seja abaixo de 60% (Figura 3) e muito distante da espécie *B. neotropicale* BR 10247^T. Já o segundo grupo também mostrou uma similaridade de aproximadamente 70%, tendo intraespecificamente estirpes com similaridade de 100% entre si, BR 10303^T e BR 10365. As espécies mais próximas desse grupo foram *B. neotropicale* BR 10247^T e *B. elkanii* USDA 76^T com similaridade em torno de 61%. Vale destacar também que a BR 10355 e *B. elkanii* USDA 76^T apresentaram similaridade de 65%, estando esta um pouco afastada das estirpes do seu grupo.

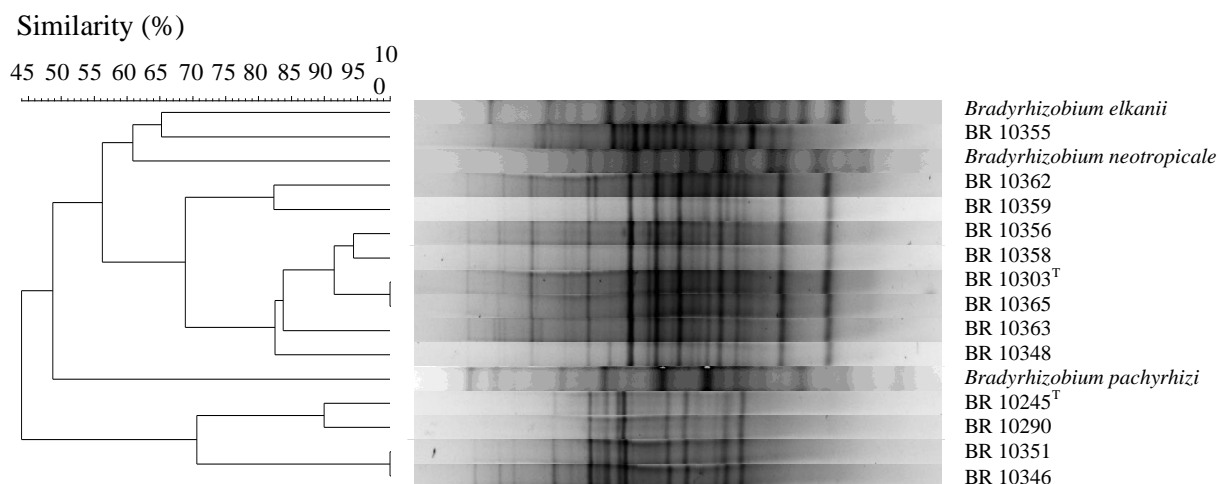


Figura 3. Dendograma obtido a partir da técnica BOX-PCR fingerprinting das estirpes BR 10245^T, BR 10290, BR 10346, BR 10351, BR 10303^T, BR 10362, BR 10359, BR 10356, BR 10358, BR 10365, BR 10363, BR 10348, *B. elkanii*, *B. neotropicale*, *B. pachyrhizi*. Os agrupamentos foram obtidos através do programa Bionumerics 7.0. O algoritmo utilizado foi o UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard com a tolerância já estabelecida no programa.

Essa técnica de “impressão digital” (Box- PCR) é uma avaliação preliminar utilizada para mostrar a diversidade num determinado grupo de procariotos. Os resultados encontrados apenas contribuem para um entendimento mais geral de como o DNA das estirpes se aproxima uma das outras. Dessa forma, são necessárias outras análises filogenéticas mais robustas como a do gene 16S rRNA e dos genes *housekeeping*.

Ainda é interessante destacar que os resultados encontrados através dessa técnica foram diferentes dos resultados filogenéticos que estão citados nos resultados posteriores. O que corrobora para o entendimento que tal técnica é bastante preliminar, não dando resultados

conclusivos. Esses são apenas encontrados pela filogenia dos genes 16S e codificadores de proteínas.

4.1.2 Análise filogenética do gene 16S rRNA

A partir dos resultados gerados pela análise filogenética do gene 16S (1239 nt) foi possível observar que as estirpes em estudo formaram dois grupos distintos dentro do gênero *Bradyrhizobium* (Figura 4). O primeiro grupo (grupo I) foi formado pelas estirpes BR 10245^T, BR 10290, BR 10346 e BR 10351. Esse agrupamento se deu com elevado valor de “bootstrap” (99%) e teve como sua espécie mais próxima a *B. neotropicale* BR 10247^T (Figura 4). Além disso, a similaridade entre as estirpes desse grupo foi de 99,3-100% e a similaridade com outras espécies do gênero *Bradyrhizobium* ficou entre 95,7- 98,8% (Tabela 4).

O segundo grupo (grupo II) foi formado pelas seguintes nove estirpes: BR 10303^T, BR 10348, BR 10359, BR 10358, BR 10356, BR 10363, BR 10362, BR 10365 E BR 10355. As espécies mais proximamente relacionadas foram *B. pachyrhizi* PAC 48^T (99,9%) e *B. elkanii* USDA 76^T (99,8%). Embora o bootstrap do grupo na árvore filogenética não tenha sido tão elevado (65%), a similaridade entre essas estirpes foi de 100% (Tabela 4) e a similaridade delas com as espécies do gênero foi de 96,3-99,9%.

O gênero *Bradyrhizobium* que hoje possui 33 espécies validadas, as quais apresentam alta similaridade do 16S rRNA. A primeira espécie acomodada neste gênero foi *Bradyrhizobium japonicum* e, posteriormente *B. elkanii* (HOLLIS et al., 1981; KUYKENDALL et al., 1992; WILLEMS et al., 2001). Estas duas espécies foram originalmente separadas por características fenotípicas e confirmadas pela análise do 16S rRNA (KUYKENDALL et al., 1992). Com base na sequência do 16S e corroborado pela análise da homologia DNA:DNA foi indicado que as duas espécies de fato compreendem dois sub-clados principais, dos quais as novas espécies foram sendo acomodadas em um ou outro destes clados (WILLEMS et al., 2001; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2009; MENNA et al., 2009). Neste caso, *B. japonicum* representa o sub-clado I e *B. elkanii* o sub-clado II. O grupo I das novas estirpes aqui em estudo posicionaram-se no sub-clado I e as do segundo grupo no sub-clado II. Dessa forma pode-se dizer que o primeiro grupo se posicionou dentro do sub-clado I e o segundo grupo dentro do sub-clado II.

Embora o gene 16S rRNA seja uma ferramenta bastante aplicada na filogenia de bactérias, para alguns gêneros, como o *Bradyrhizobium*, alguns trabalhos têm sugerido que através da análise dele, se é difícil distinguir espécies estreitamente relacionadas, devido ao alto grau de conservação (WILLEMS et al., 2001; DELAMUTA et al., 2012; LARANJO et al., 2012). Este é o caso das estirpes tipo de *B. pachyrhizi* PAC 48^T e *B. elkanii* USDA 76^T que compartilham cerca de 100% de homologia DNA:DNA e são espécies diferentes. Em virtude disso, é necessário a análise de genes com maior taxa de evolução e menos conservados (RIBEIRO et al., 2015) para que tais grupos sejam posicionados de forma correta na taxonomia.

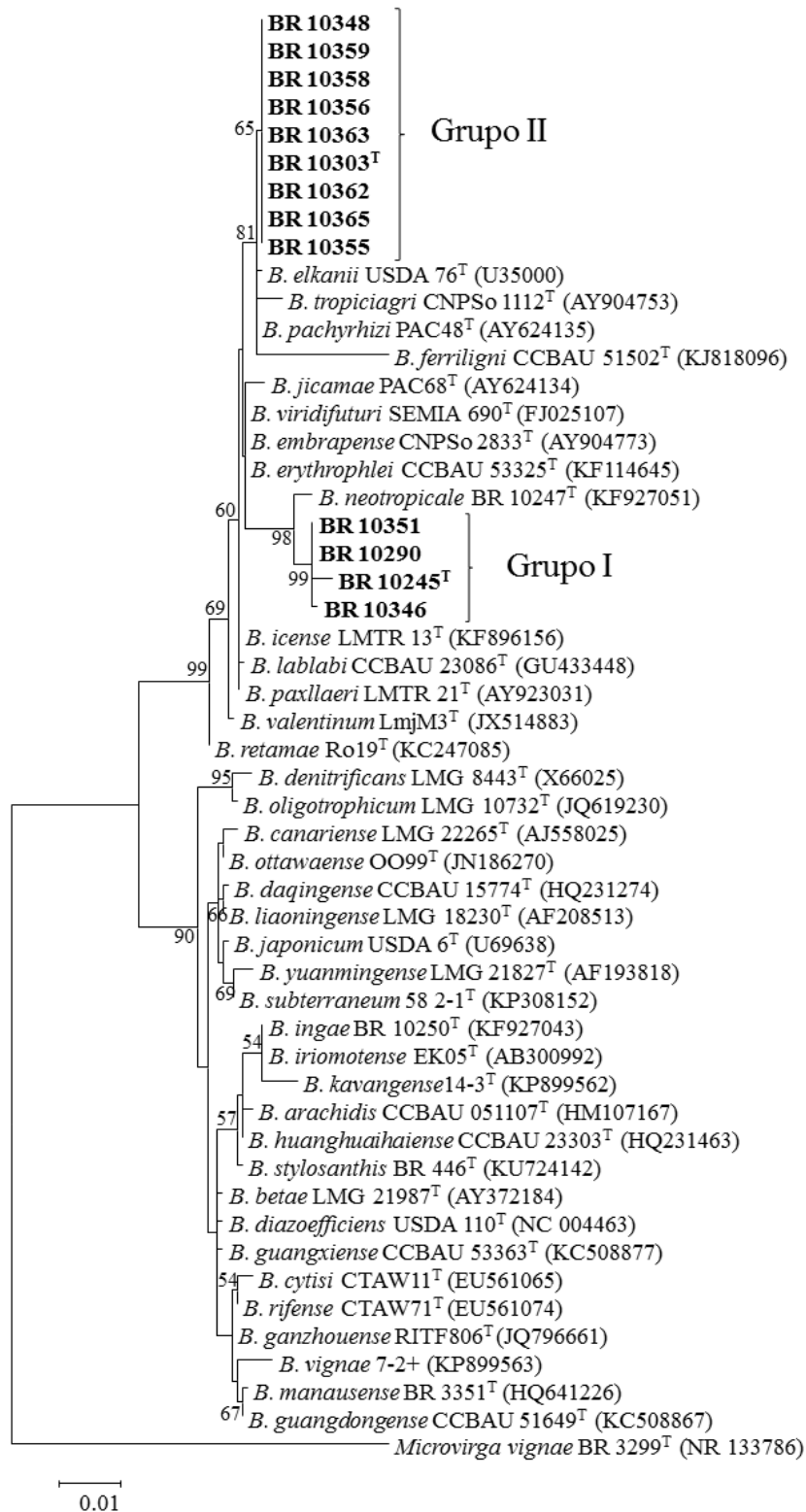


Figura 4. Árvore filogenética das 13 estirpes em análise baseada no gene 16S rRNA. Foi utilizado o programa Mega 7.0. O método estatístico aplicado foi o Maximum Likelihood. Para atestar os resultados encontrados na estatística, foi utilizado um bootstrap com 1000 repetições. Nos nós estão o valor em porcentagem do quão agrupadas estão as estirpes. A espécie *Microvirga vignae* é o outgroup.

4.1.3 Análises filogenéticas dos genes *housekeeping*

Cada um dos genes conservados *recA* (377 nt), *glnII* (480 nt), *rpoB* (459 nt), *gyrB* (552 nt) e *dnaK* (320 nt) foram avaliados para verificar se as topologias das árvores formadas eram congruentes entre si, ou seja, se os resultados de cada um dos genes refletiam o posicionamento filogenético das cepas em estudo de forma similar, se os resultados eram coerentes quando comparados entre si.

Com relação à árvore filogenética do gene *recA*, os grupos I e II formaram grupos monofiléticos com um alto bootstrap (99%), a exemplo do que ocorreu para o 16S rRNA. O primeiro grupo se posicionou no Subclado I (dentro do super clado da *B. japonicum*) e o segundo no Subclado II (super clado da *B. elkanii*) (Figura 5).

A espécie mais próxima ao grupo das quatro estirpes foi *B. neotropicale* (94,6%) e dentro do grupo, a similaridade foi de 99,2-100%. Já o outro grupo mostrou-se mais próximo das espécies *B. pachyrhizi* PAC 48^T (95,4%), *B. viridifuturi* SEMIA 690T (94,4%), *B. tropiciagri* CNPSo 1112T (94,4%) e *B. elkanii* USDA 76^T (93,8%) (Figura 5). Dentro do grupo II, a similaridade entre as estirpes foi de 99,7-100%. Esses resultados indicam que duas novas possíveis espécies estão sendo formadas a partir de cada um dos grupos em estudo. Quando ambos são comparados com outras espécies já descritas, mostraram similaridades inferiores a 96%, demonstrando serem distintas das espécies já descritas (Tabela 4).

Na análise do gene *glnII*, ambos os grupos se distribuíram de forma semelhante ao gene anterior, estando nos mesmos superclado e formando dois grupos distintos como no 16S rRNA e *recA*. As estirpes do primeiro grupo se posicionaram separadamente das espécies já existentes. A similaridade dentro do grupo foi de 100% com um bootstrap de 94%, representando esse mesmo posicionamento das mesmas em todas as repetições da análise estatística (Figura 6). A espécie mais próxima ao grupo foi *B. neotropicale* BR 10247^T com 97,2% de similaridade, sendo o maior valor encontrado de similaridade para com o grupo I. As demais espécies do gênero foram similares com um percentual de no máximo 96% dando indícios que pode ser uma nova espécie dentro do gênero *Bradyrhizobium* (Tabela 4).

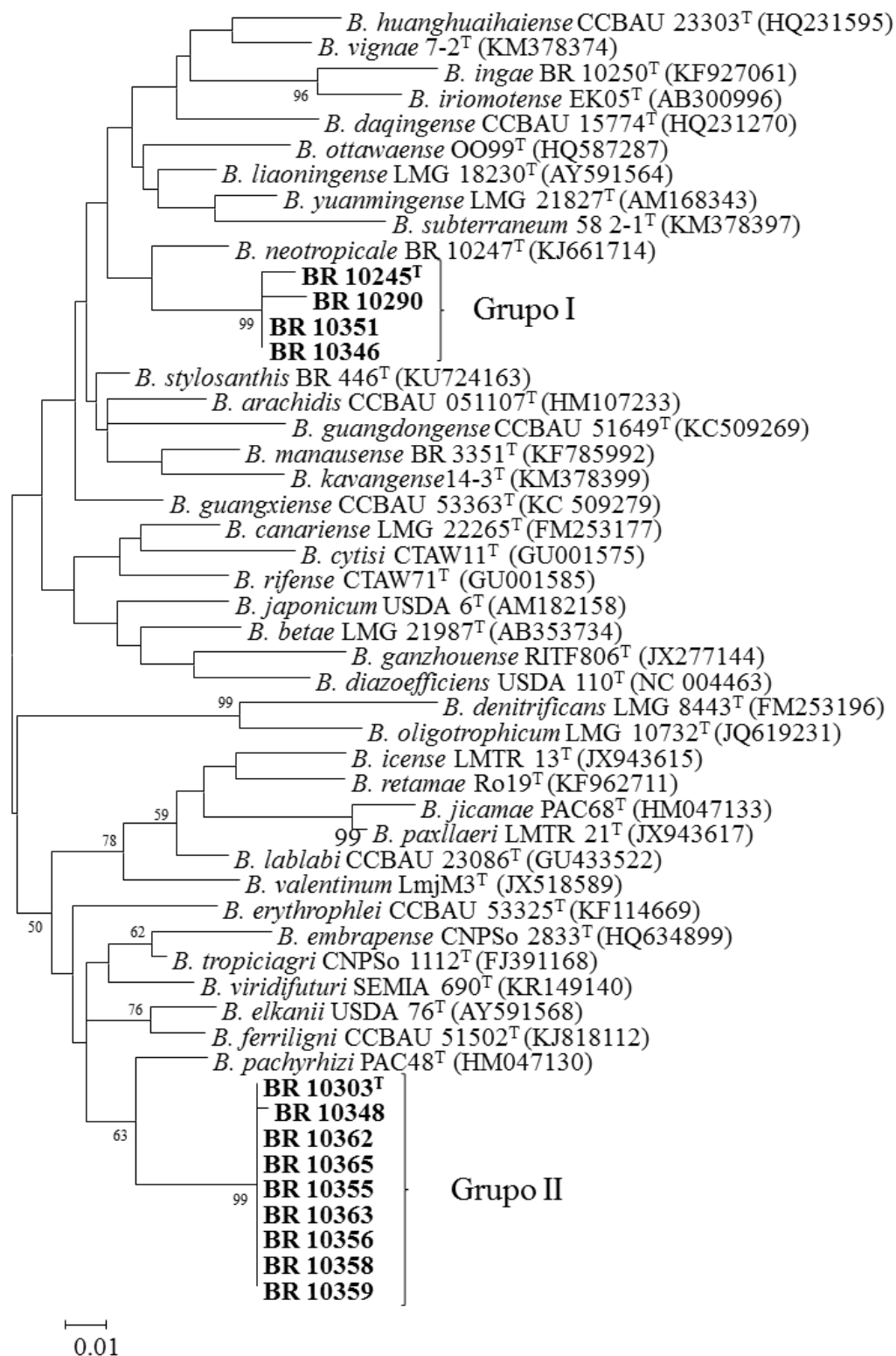


Figura 5. Análise filogenética das 13 estirpes referente ao gene *housekeeping recA*. A árvore foi construída no programa Mega 7.0. O método estatístico aplicado foi o Maximum likelihood. Para atestar os resultados foi utilizado um bootstrap com 1000 repetições. Nos nós estão o valor em porcentagem do quão agrupadas estão as estirpes. A barra indica uma substituição pela posição de 100 nucleotídeos.

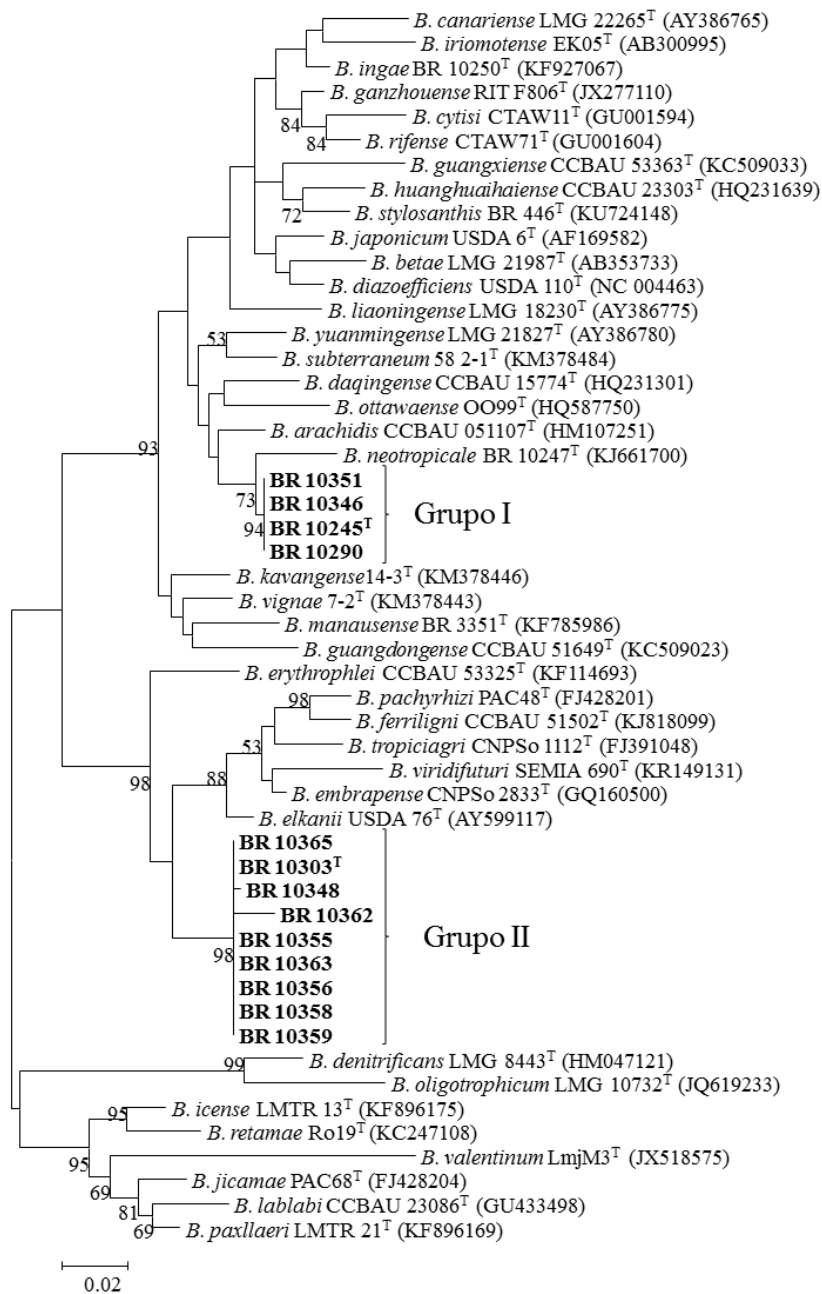


Figura 6. Dendrograma baseado no gene *glnII*. Foi construído a partir do programa Mega 7.0 Utilizou-se o método Maximum Likelihood para as análises estatísticas com um bootstrap de 1000 repetições. Os valores presentes nos nós representam a porcentagem de agrupamento entre as estirpes. A barra indica uma substituição pela posição de 100 nucleotídeos.

O segundo grupo também se posicionou separadamente das outras espécies com um bootstrap de 98% (Figura 6). A similaridade no interior desse agrupamento foi de 98,7-100%. Um pouco diferente do gene anterior, as espécies *B. elkanii* USDA 76^T (96%), *B. tropiciagri* CNPSO 1112^T (94,5%), *B. embrapense* CNPSO 2833^T (94,7%) e por último *B. pachyrhizi* PAC 48^T (94,1%)

Não diferente dos outros genes, os dois grupos em estudo formaram grupos bem distintos das espécies já descritas na análise da sequência do gene *rpoB* (Figura 7) e com bootstrap elevados, mostrando que de todas as 1000 repetições de pareamento entre as sequências através de análise estatística, o agrupamento I se deu por 980 vezes e no agrupamento II por 990 vezes, revelando grupos confiavelmente separados e muito homogêneos.

As estirpes do primeiro grupo se mostraram 100% similares entre si, tendo como espécie mais próxima relacionada *B. neotropicale* BR 10247^T (94,9%) e curiosamente a *B. vignae* 7-2^T (95,4%) que foi recentemente descrita (GRÖNEMEYER et al., 2016). Essa última espécie, em nenhum dos outros genes, se mostrou próxima ao grupo I. Diante desse resultado mostra-se necessário análises mais robustas através de técnicas como a do MLSA.

Dentro do segundo grupo, a similaridade foi de 99,7-100%. As espécies mais próximas ao grupo II foram novamente a *B. pachyrhizi* PAC 48^T (96,7%) e *B. elkanii* USDA 76^T (96,7%) seguidas da *B. viridifuturi* SEMIA 690^T (96,2%) e *B. embrapense* CNPSO 2833^T (95,2%). Esses valores corroboram com os encontrados anteriormente com os outros genes, reforçando a possibilidade dos dois grupos serem novas espécies.

O gene *dnaK* também mostrou dois grupos bem definidos e se posicionaram separadamente das outras espécies do gênero *Bradyrhizobium*. Ambos os grupos foram separados com um elevado bootstrap, 98% (grupo I) e 99% (grupo II), mostrando um agrupamento formado em mais de 95% dos pareamentos realizados pela análise estatística (Figura 8). Foram formados grupos monofiléticos, sendo o grupo I pertencente ao subclado de *B. japonicum* USDA 6^T e o grupo II do subclado da *B. elkanii* USDA 76^T.

O grupo formado pelas quatro estirpes apresentou similaridade de 100%, demonstrando ser um grupo coeso, possivelmente pertencentes a mesma espécie. No entanto, diferentemente dos outros genes, as espécies mais próximas relacionadas foram *B. iriomontense* EK05^T (97,7%), *B. vignae* 7-2^T (96,4%) (Tabela 4).

O grupo formado pelas nove estirpes mostrou uma similaridade com um percentual bastante elevado (100%). As espécies mais próximas a esse grupo foram como nos outros genes *B. elkanii* USDA 76^T (94,6%), *B. pachyrhizi* PAC 48^T (94,6%), *B. viridifuturi* SEMIA 690^T (94,6%) e *B. embrapense* CNPSO 2833^T (92,3%). Nota-se que a diferença de percentual do grupo II em relação as estirpes já descritas indicam que possivelmente esse grupo seja uma nova espécie.

A árvore do gene *gyrB* mostrou características semelhantes aos outros genes no que diz respeito a formação, por exemplo, do grupo I. O grupo se posicionou separadamente das outras espécies (Figura 9). Apresentou também um elevado bootstrap de 100%. As espécies mais próximas foram *B. neotropicale* BR 10247^T (93,4%) e *B. iriomontense* EK05^T (93,4%). A similaridade dentro do grupo foi de 100%, indicando que as estirpes parecem pertencer a mesma espécie.

O segundo grupo mostrou-se bem separado das espécies já descritas, porém com uma variação não vistas nos genes *housekeeping* anteriores. As estirpes BR 10348 e a BR 10359 se posicionaram mais separadamente das outras 7 estirpes (Figura 9), o que não ocorreu em nenhum dos outros genes. A similaridade dentro do grupo, porém, não foi muito baixa, variando de 98 a 100%. As espécies mais próximas ao grupo foram novamente *B. elkanii*

USDA 76^T (95,2%), *B. pachyrhizi* PAC 48^T (94,5%) e *B. viridifuturi* SEMIA 690^T (94%) e *B. embrapense* CNPSo 2833^T (94%) (Tabela 4).

As estirpes de ambos os grupos mostraram um posicionamento bem separado das espécies já descritas a partir dos genes 16S rRNA e dos genes *housekeeping*. As estirpes do grupo I em todos os genes mantiveram-se no super clado de *B. japonicum* e as do grupo II, dentro do super clado de *B. elkanii*. Os genes *recA*, *rpoB* e *gyrB* mostraram como espécie mais próxima relacionadas *B. neotropicales* BR 10247^T, para o primeiro grupo e *B. elkanii* e *B. pachyrhizi* para o segundo. Para os outros genes, como o *dnaK*, as estirpes do primeiro grupo foram mais próximas a *B. iriomotense* EK05^T e para o gene *glnII*, as espécies mais próximas foram *B. elkanii* USDA 76^T e *B. erythrophlei* CCBAU 53325^T, diferente de resultados anteriores, em que uma das espécies mais próximas foi a *B. pachyrhizi* PAC 48^T.

De modo geral, todos os genes avaliados mostraram bastante congruência a partir de seus resultados. Dois grupos bastante coesos e isolados das espécies já existentes se formaram. Esses resultados indicam que as bactérias tiveram um mesmo padrão evolutivo, mas com características genéticas suficientes para serem diferenciadas das espécies descritas. Dessa forma, a utilização de cada um dos genes *housekeeping* foi essencial para o entendimento do posicionamento taxonômico das cepas, no universo de espécies existentes e dentro do gênero *Bradyrhizobium*, promovendo resultados robustos e mais confiáveis que a análise somente do gene 16S rRNA.

Vale ressaltar ainda que resultados como o do gene *gyrB* em que duas estirpes (BR 10348 e BR 10359) se posicionaram mais separadamente (Figura 9). A hipótese é que esse gene evoluiu de forma diferenciada em relação aos demais genes das outras sete cepas estudadas. Supõe-se que esse gene pode ter passado por eventos de recombinação, rearranjos intragenômicos e por transferência horizontal (ROKAS et al., 2003; CHARLES et al., 2005) levando a uma diferenciação dos demais genes das demais cepas avaliadas.

Porém, essa diferença não comprometeu o entendimento de que dois novos grupos foram formados, que são, de um modo geral, coesos e que possivelmente representam duas novas espécies fixadoras de nitrogênio dentro do gênero *Bradyrhizobium*. Para se obter melhor entendimento do posicionamento taxonômico das estirpes em estudo, os cinco genes *housekeeping* selecionados foram concatenados.

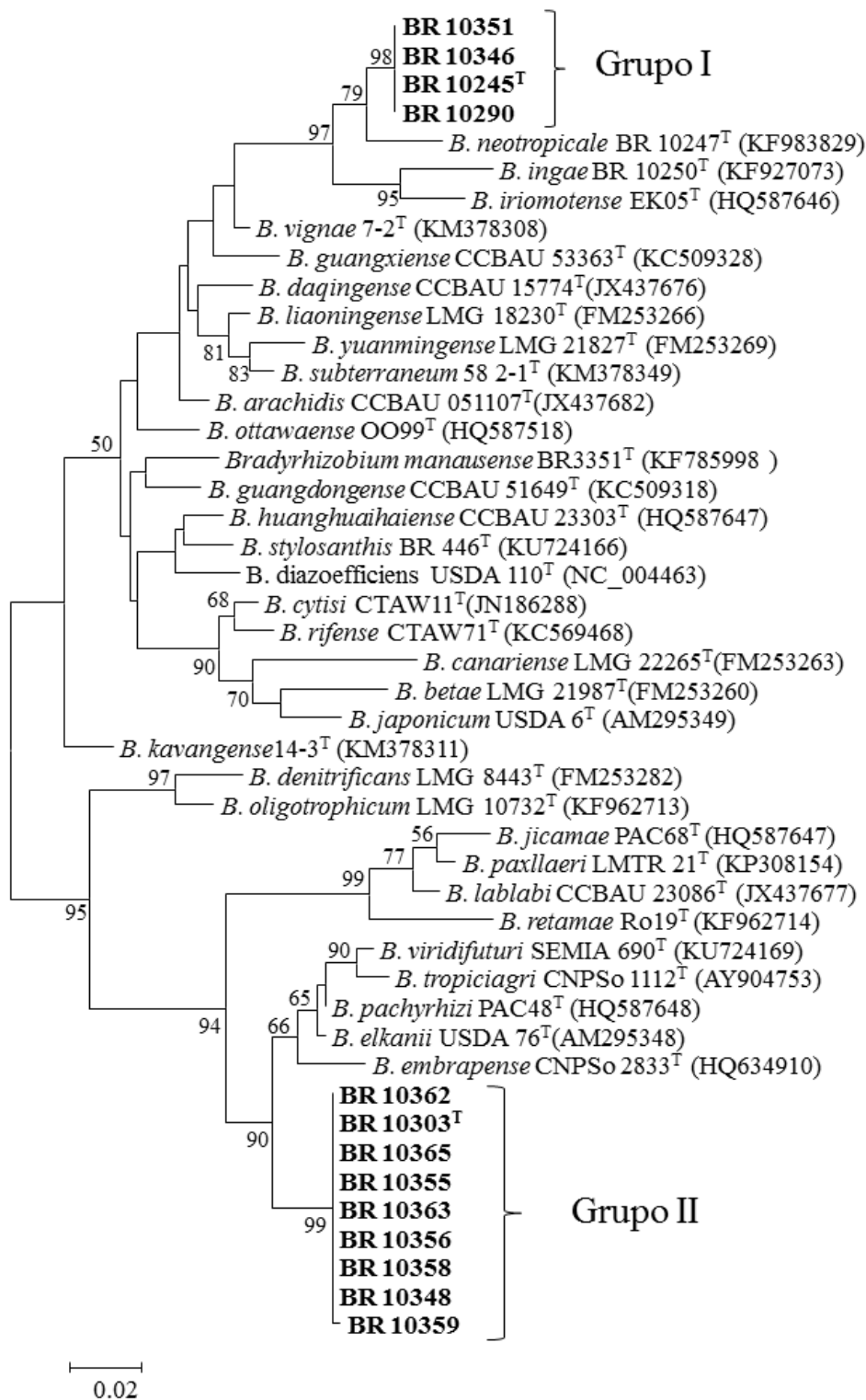


Figura 7. Árvore filogenética do gene *housekeeping rpoB*. Utilizou-se o programa Mega 7.0 para a construção da mesma. Maximum likelihood foi o método estatístico utilizado com um bootstrap de 1000 repetições. Os valores acima de 50% presentes nos nós representam a porcentagem de agrupamento entre as estirpes. A barra indica duas substituições para cada 100 nucleotídeos.

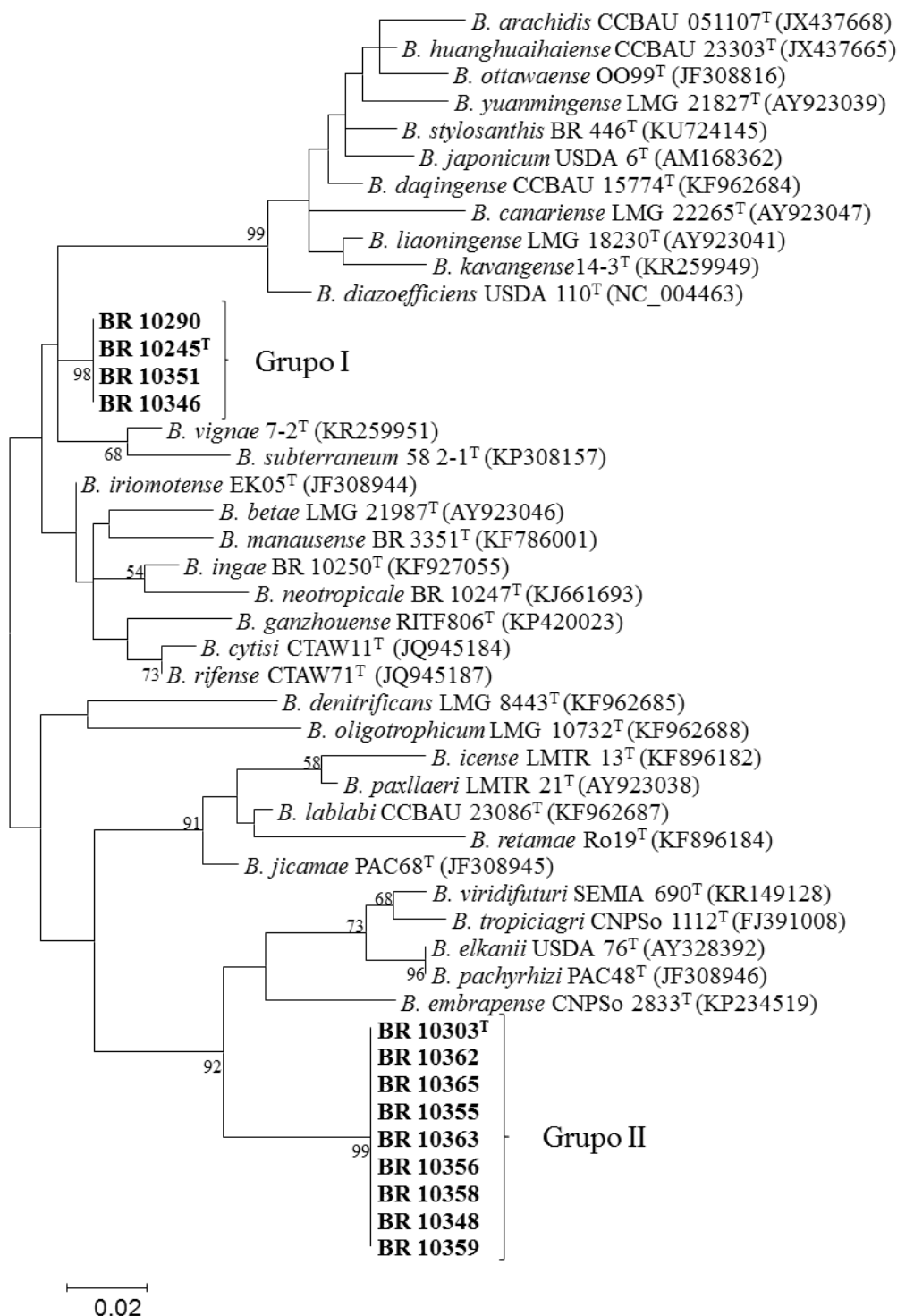


Figura 8. Árvore filogenética do gene *housekeeping dnaK*. O método estatístico utilizado foi o Maximum Likelihood com um bootstrap de 1000 repetições. O programa utilizado para a construção da árvore foi o Mega 7.0. Nos nós estão valores que representam a agrupamento das estirpes (%). A barra na parte inferior a esquerda indica duas substituições para cada 100 nucleotídeos.

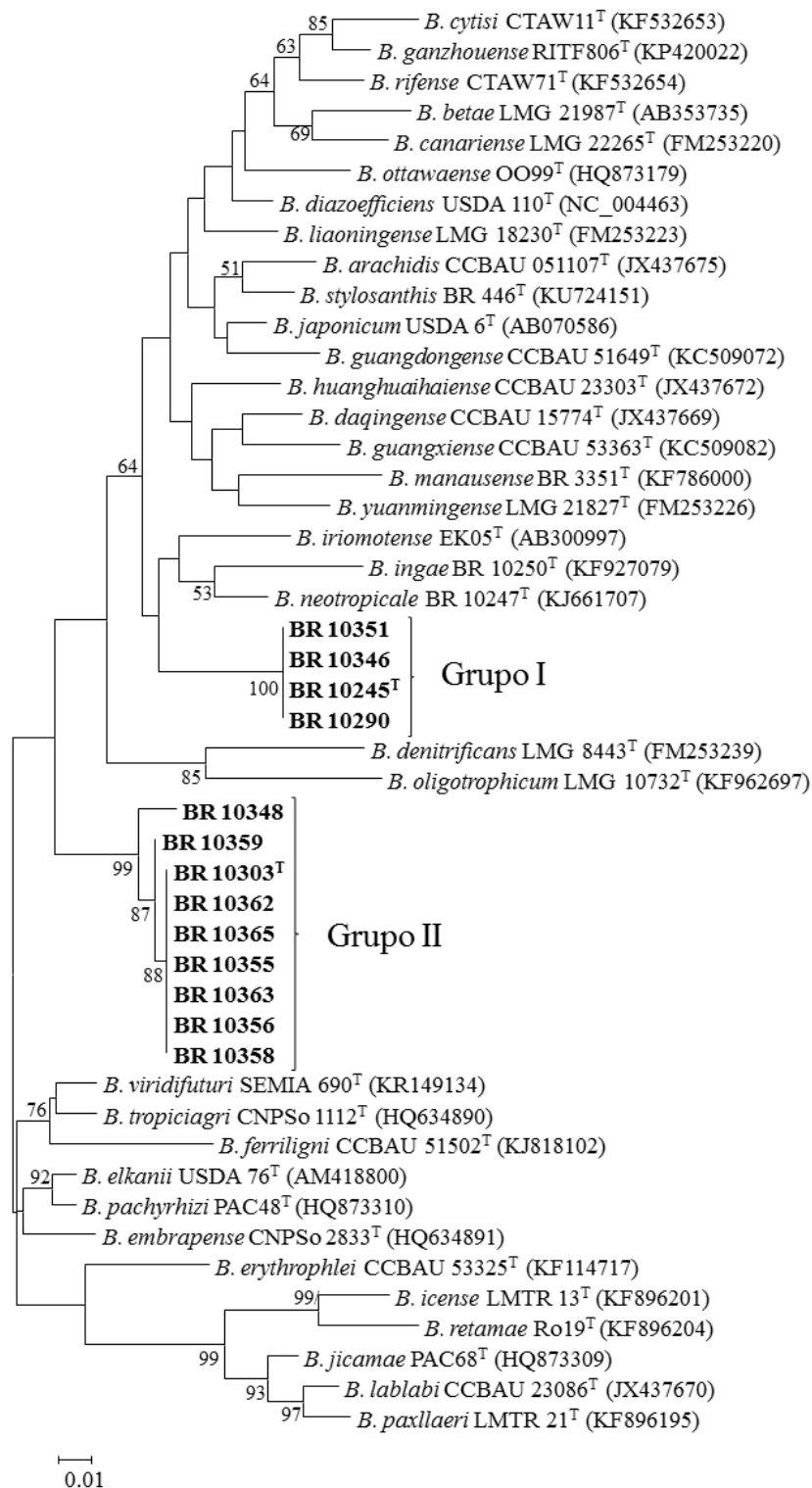


Figura 9. Árvore filogenética do gene *housekeeping gyrB*. A estatística foi realizada utilizando-se o método Maximum Likelihood com um bootstrap de 1000 repetições a partir do programa Mega 7.0. Os valores dos nós representam o percentual de agrupamento entre as estirpes. A barra na margem inferior da árvore indica uma substituição para cada 100 nucleotídeos.

4.1.4 Filogenia a partir de MLSA (“*Multilocus sequence analysis*”)

A fim de obter uma análise mais acurada e consistente, realizou-se o MLSA. Essa abordagem é efetiva e uma importante estratégia para se conhecer a diversidade de *Bradyrhizobium* (DELAMUTA et al., 2012). Combina dados genômicos congruentes, fornecendo uma caracterização genotípica confiável (BULL et al., 1993). Tem sido cada vez mais utilizada pois trata-se de uma ferramenta adequada para separação de espécies e para a revelação de relações taxonômica entre elas (AZEVEDO et al., 2015)

A árvore obtida a partir da concatenação dos genes *housekeeping* (*dnaK*, *glnII*, *recA*, *rpoB* e *gyrB*) mostrou resultados muito similares aos encontrados nas árvores, a partir dos genes isolados. Novamente, os dois grupos estudados nesse trabalho posicionaram-se de forma independente e separada das demais espécies presentes na árvore. Além disso, as cepas do grupo I posicionaram-se no superclado de *B. japonicum* e as bactérias do grupo II no de *B. elkanii* (Figura 10).

Como na maioria das árvores anteriores, o grupo I mostrou-se bastante coeso, apresentando um bootstrap de 100%, ou seja, quando as quatro estirpes representantes desse grupo foram submetidas as 1000 repetições das combinações das suas sequências através da análise estatística, foram similares em todas elas (Figura 10). Dessa forma, é possível afirmar que as quatro estirpes são pertencentes a uma possível nova espécie, dentro do gênero *Bradyrhizobium*.

O segundo grupo teve sua formação com um elevado bootstrap, porém entre as estirpes esse suporte chegou até 80%. Baseado nesse resultado de bootstrap e nas árvores construídas anteriormente, observa-se que dentro desse grupo de nove estirpes de bactérias, duas delas se posicionaram mais separadamente das demais, BR 10348 e BR 10359, o que pode ser explicado pela filogenia de genes individuais que foram utilizados para essa técnica de MLSA.

O posicionamento mais distante ou muito próximo entre cepas de um grupo pode ser explicado pela história evolutiva desses microrganismos. Filogenias congruentes refletem uma história evolutiva comum de cada um dos genes avaliados, ou seja, cada gene evoluiu de forma semelhante ao longo da história, porém quando alguma incongruência é encontrada, há indícios de uma possível transferência horizontal de um gene que provoca filogenias diferenciadas de bactérias de um mesmo grupo (MARTENS et al., 2008). Sendo assim, é possível que as bactérias BR 10348 e BR 10359 tenham passado por transferência horizontal do gene *gyrB*, apresentando uma sequência diferenciada de seus nucleotídeos.

Dentre as árvores geradas de cada um dos cinco genes *housekeeping*, é possível notar que apenas um deles apresentou resultado semelhante ao encontrado pela filogenia, a partir de MLSA. O gene *gyrB* mostrou as estirpes BR 10348 e BR 10359 posicionadas mais afastadas das demais e a BR 10348 ainda formou um ramo independente das outras 10 estirpes. Esse resultado indica que, possivelmente, na filogenia a partir dos genes concatenados, o *gyrB* foi responsável pela dissimilaridade das estirpes citadas acima.

No entanto, embora tenha ocorrido essa diferenciação, é possível afirmar que a partir das análises filogenéticas, a partir das dos genes isolados e concatenados, as nove cepas representam um grupo separado e possivelmente, formador de uma nova espécie dentro do gênero *Bradyrhizobium*.

Também é interessante ressaltar que a especificidade de hospedeiro não tem relação com o agrupamento genético, como encontrado em trabalhos anteriores (GERMANO et al., 2006; MENNA et al., 2006; DELAMUTA et al., 2012). No presente trabalho, as treze estirpes isoladas de *Centrolobium paraense* formaram agrupamentos genéticos completamente diferentes e também em sub-clados diferentes. Isso indica que para entender melhor como se deu a evolução da simbiose, o estudo de genes simbióticos deve ser realizado.

A técnica do MLSA foi bastante conclusiva e contribuiu significativamente para a definição das estirpes avaliadas e consequentemente, permitiu a designação de dois grupos formadores de duas novas espécies. Essa metodologia tem sido considerada como um método eficaz para as análises filogenéticas do gênero *Bradyrhizobium* (STEPKOWSKI et al., 2005; MARTENS et al., 2007).

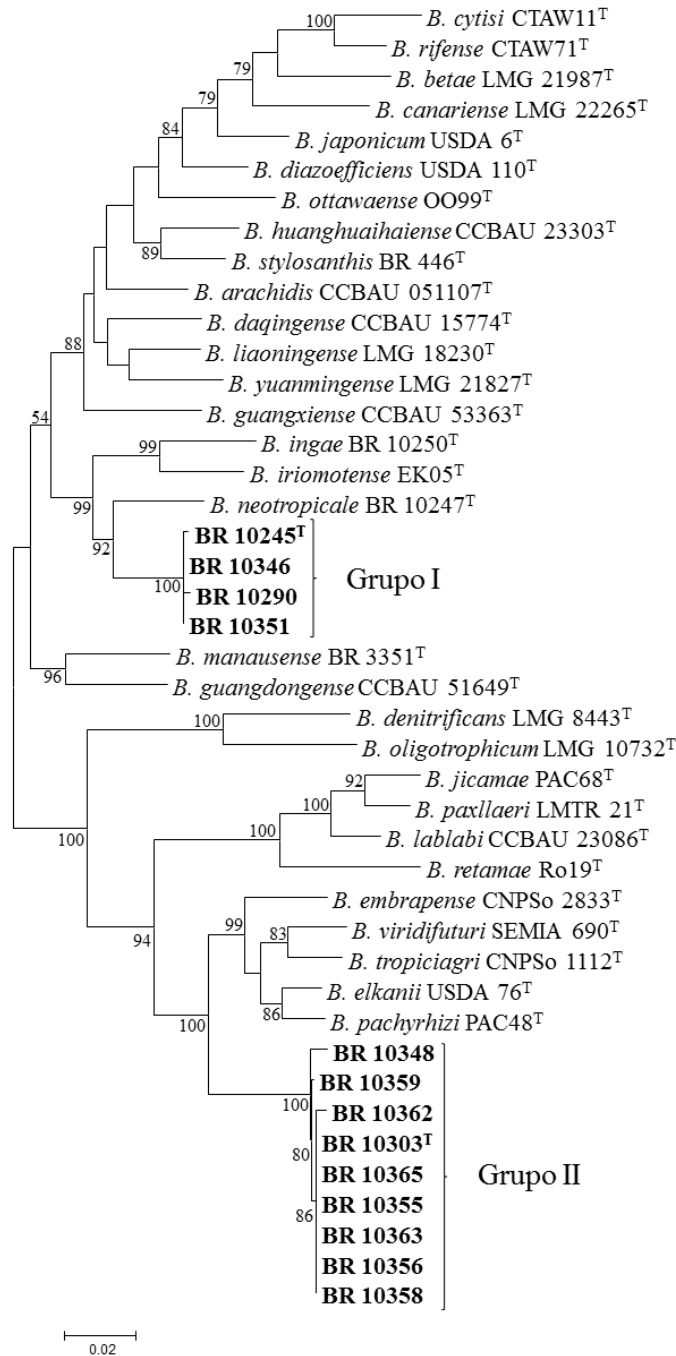


Figura 10. Árvore filogenética concatenada com os genes *dnaK*, *glnII*, *recA*, *rpoB*, *gyrB*. O programa utilizado foi o Mega 7.0 para a construção da árvore e o método estatístico utilizado foi o ML com um bootstrap de 1000 repetições. Os valores nos nós referem-se ao agrupamento das espécies (%). A barra indica duas substituições a cada 100 nucleotídeos.

4.1.5 Análise filogenética dos genes simbióticos

Importantes no processo de FBN, os genes *nod* e *nif* estão envolvidos na nodulação e na fixação de nitrogênio. O primeiro gene está envolvido na síntese de fatores nod que são receptores dos flavonoides liberados pelas plantas. O segundo codifica a subunidade da enzima nitrogenase que está envolvida na fixação do N (RIVAS et al., 2009). Porém, há um limitado volume de informações a respeito da diversidade de genes de nodulação e fixação de nitrogênio dentro do gênero *Bradyrhizobium* para regiões de clima tropical (MENNA e HUNGRIA, 2011) o que leva a grande interesse na avaliação dos mesmos.

Os resultados obtidos através da filogenia de ambos os genes foram bastante diferenciados das árvores filogenéticas construídas a partir do gene 16S rRNA e dos genes *housekeeping* (Figura 11). O *nodC* por exemplo, mostrou resultados ao contrário do esperado, ou seja, o grupo I sempre próximo a espécie *B. neotropicale* BR 10247^T em outras análises nesse gene foi mais próximo a *B. retamae* Ro 19^T (78,8%), *B. jicamae* PAC 68^T (78,6%) e *B. lablabi* CCBAU 23086^T (78,6%) (Tabela 4). Das quatro estirpes pertencentes a este grupo, uma delas a BR 10290 se posicionou próxima a espécie *B. pachyrhizi* PAC 48^T que nas outras árvores filogenéticas aproximava-se do grupo II (Figura 11). As três outras estirpes, embora se mostrando separada das outras bactérias descritas, não apresentaram 100% similares entre elas (Figura 11)

De forma interessante, o grupo II também se posicionou de maneira distinta das análises anteriores (Figura 11). As cepas se mostraram mais próximas a *B. neotropicale* BR 10247^T com uma similaridade de 88,8%. Essa espécie na maioria das árvores individuais dos genes *housekeeping*, era mais próxima ao grupo I. Além disso, o que torna o resultado desse gene ainda mais intrigante é que a estirpe BR 10355 teve um suporte bastante elevado (bootstrap de 100%) posicionando-se separadamente das demais estirpes (Figura 11). A similaridade entre os organismos pertencentes a este grupo foi um pouco maior que o primeiro com valores de 88,8-100%

O gene *nifH* mostrou resultados mais próximos aos genes não simbióticos. As estirpes do grupo I posicionaram juntas, novamente, porém separadamente das outras espécies com um elevado suporte estatístico (99%). Novamente, a espécie mais próxima relacionada foi *B. neotropicale* BR 10247^T com uma similaridade de 96,4%. A similaridade dentro do grupo foi de 100%. Por outro lado, o segundo grupo não se mostrou homogêneo. A estirpe BR 10355 se posicionou separadamente como observado para o gene *nodC* (Figura 12). Em contrapartida, os outros 8 organismos mostraram um agrupamento com elevado suporte estatístico (100%). As espécies mais próximas relacionadas foram *B. erythrophlei* CCBAU 53325^T, *B. elkanii* USDA 76^T, *B. pachyrhizi* PAC 48^T (Tabela 4), semelhante a resultados prévios. A similaridade dentro do grupo variou de 95,2-100.

Em função dos resultados encontrados, vale destacar alguns pontos importantes. O primeiro deles é o posicionamento das estirpes do grupo I e II na árvore filogenética do gene *nodC*. Uma possível explicação para a incongruência entre esse gene e a filogenia a partir dos genes *housekeeping* é a transferência horizontal de genes simbióticos, o que parece ser uma hipótese bastante plausível (YOUNG e HAUKKA, 1996). Isto implica em dizer que pode ter ocorrido alguma modificação na sequência de nucleotídeos do gene simbiótico através da obtenção de bases nitrogenadas de outro organismo o que pode ter levado aos posicionamentos diferentes dos anteriores encontrados, como o da cepa BR 10355.

De acordo com resultados encontrados por LAGUERRE et al. (2001) a espécie fonte de seus estudos, *Rhizobium giardinii* forneceu evidências da incongruência entre o gene *nodC* e o 16S rRNA. Além disso, alguns estudos têm mostrado que, de modo geral, a filogenia inferida a partir de genes centrais (genes *housekeeping*) foram incongruentes com genes

simbióticos, sugerindo que a transferência horizontal de genes influencia de forma significativa na evolução dessas bactérias nodulíferas (STEENKAMP et al., 2008).

Os resultados indicam que possivelmente eventos de transferência horizontal dos genes *nod* tenham ocorrido em altas taxas no ambiente onde estas bactérias foram isoladas. Aquisição de genes relacionados a nodulação por transferência horizontal representa uma forma de adaptação das bactérias, adquirindo capacidade de nodulação com uma faixa de hospedeiros maior (BARCELLOS et al., 2007). Estes autores no cerrado brasileiro demonstraram que estirpes localmente adaptadas adquiriram genes de estirpes introduzidas, passando a ter habilidade de nodular e fixar nitrogênio na cultura da soja.

Em relação ao gene *nifH*, somente o grupo II mostrou resultados diferentes das filogenias anteriores. O primeiro deles foi a proximidade de todo o grupo de espécies não vistas próximas nas filogenias construídas anteriormente. O segundo seria o posicionamento isolado da cepa BR 10355. Esses resultados trazem duas possíveis inferências. A primeira, novamente, seria a transferência horizontal de genes, como no gene *nodC*. Alguns trabalhos indicam que o gene *nifH* por estar presente em plasmídeos simbióticos podem se mover através de cromossomos e serem passados entre organismos (EARDLY et al., 1992). A segunda seria que alguns organismos, por esse fato anteriormente apresentado, podem apresentar dois genes *nifH*. Resultado similar foi encontrado por BARCELLOS et al (2007), onde uma das estirpes estudadas apresentou dois genes *nifH*, sendo um deles obtidos, provavelmente por transferência horizontal de genes.

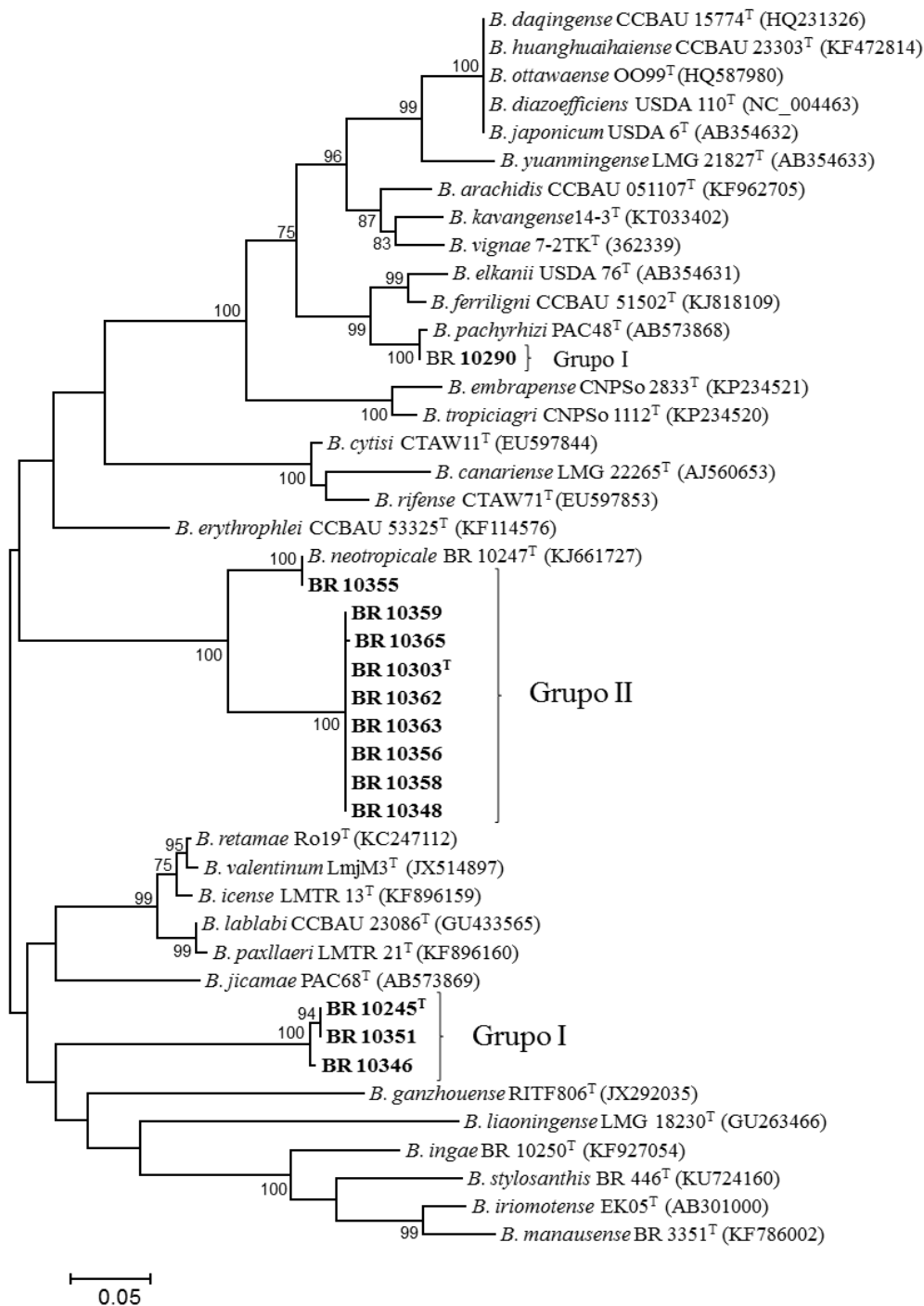


Figura 11. Filogenia do gene simbiótico *nodC*. O método estatístico utilizado foi o Maximum likelihood, considerando um bootstrap de 1000 repetições. O programa utilizado foi o Mega versão 7.0. Os valores nos nós representam o agrupamento das estirpes em porcentagem. A barra indica cinco substituições para cada 100 nucleotídeos.

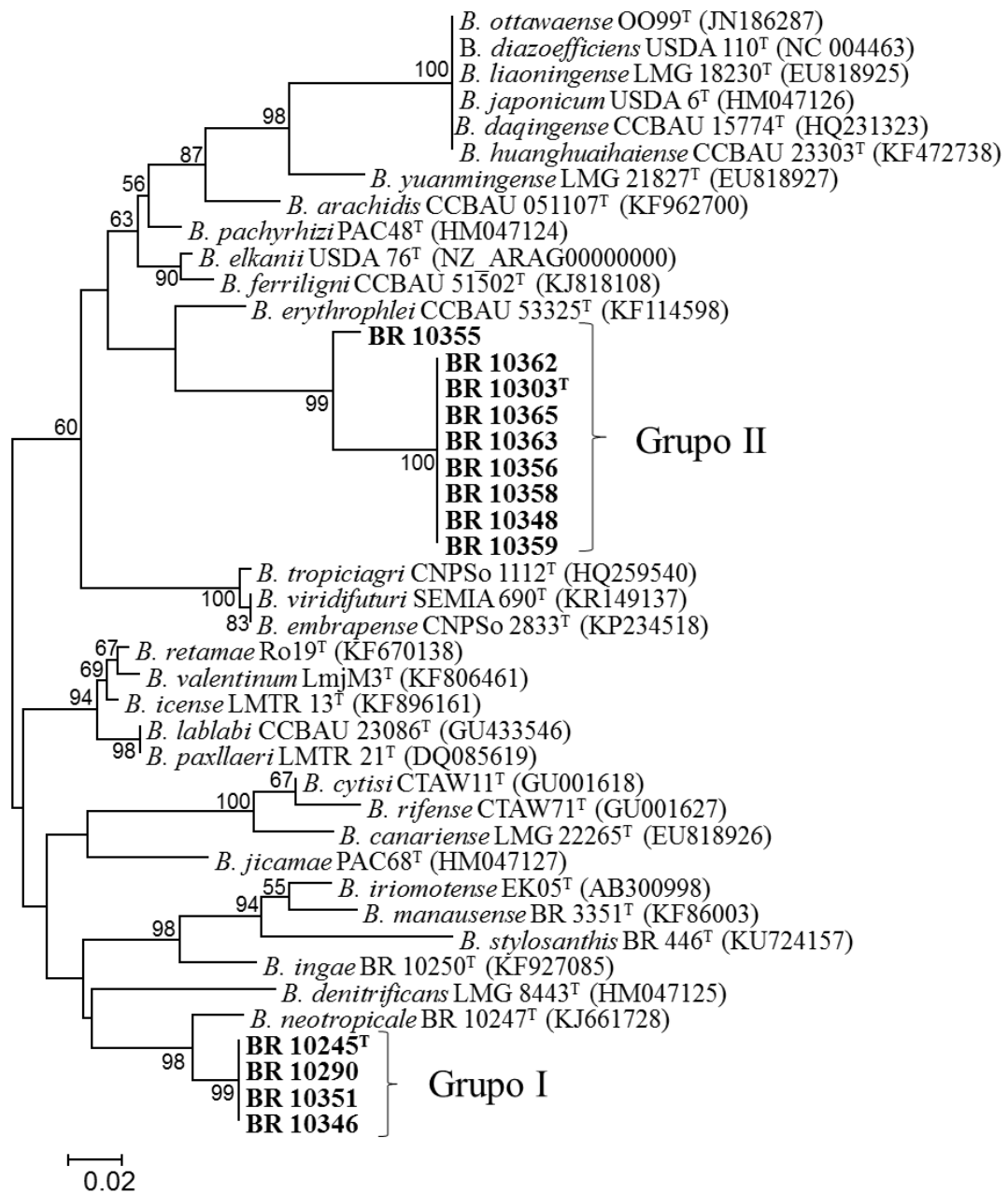


Figura 12. Árvore filogenética do gene simbiótico *nifH*. A estatística foi feita através do método Maximum Likelihood o qual teve o suporte de um bootstrap de 1000 repetições. O programa utilizado foi o Mega 7.0 Os valores nos nós referem-se ao agrupamento das espécies em porcentagem. A barra na parte inferior a esquerda indica duas substituições a cada 100 nucleotídeos.

Tabela 4: Similaridade entre as estirpes tipo BR 10245^T, BR 10303^T e as outras estirpes de espécies do gênero *Bradyrhizobium* dos genes 16S rRNA, genes *housekeeping* e genes simbióticos

Estirpes	Similaridades com as estirpes BR 10245 ^T e BR 10303 ^T (%)															
	16S rRNA		<i>recA</i>		<i>glnII</i>		<i>rpoB</i>		<i>dnaK</i>		<i>gyrB</i>		<i>nodC</i>		<i>nifH</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
BR 10245 ^T	99,3-100	98,1-98,6	99,2-100	89,8-90,6	100	98,7-100	100	88,4	100	90,1	100	92,7	73,8-100	72-73,8	100	87
BR 10303 ^T	98,1	100	89,8-90,1	99,7-100	90,8-91,6	91,6	88,2-88,4	99,7-100	90,1	100	92,7-93,2	98-100	71,8-74,3	88,8-100	87-88,2	95,2-100
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	98,4	99,7	91,4	94,4	88,7	93,3	88,4	96,2	90,1	94,6	91,6	94	-	-	86,2	85
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	96,5	96,6	92,8	91,7	97,2	91,4	94,3	88,8	91,4	88,3	92,2	92	74,7	72,2	85	86,2
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T	95,9	96,9	91,7	90,4	94,1	89,7	90,8	88,2	95,5	88,3	90,7	91,8	-	-	-	-
<i>B. canariense</i> LMG 22265 ^T	96,2	97,2	91,7	92,2	93,7	87,9	91,9	87,3	90,5	87,8	91,6	92,5	73,4	74,3	86,6	82,3
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	96,3	96,6	90,9	89,8	93,9	88,3	93	89,1	95,0	90,1	91,1	90,7	75,9	75,4	87	83,9
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	96,2	97,2	91,7	90,4	96,0	90,4	93,6	88,6	92,8	89,6	92,9	92,2	72,2	69,5	83,5	81,9
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T	95,8	96,8	85,3	87,7	89,1	87,0	89,1	91,5	91,4	89,2	89,3	89,1	-	-	88,6	83,1
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	98,1	99,8	90,6	93,8	89,7	96,0	88,6	96,7	89,6	94,6	92,7	95,2	73,8	73,1	90,1	88,6
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 ^T	96,3	96,8	91,4	89,0	95,4	88,7	-	-	94,1	89,2	92	92	72,5	70,2	-	-
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	96,3	96,8	91,4	90,4	93,1	88,9	92,5	88,6	92,3	89,2	92,9	92,2	72,2	69,5	83,5	81,9
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	98,3	99,7	89,0	90,6	91,0	90,2	-	-	91,9	90,1	88	88	78,6	77,2	89,8	86,6
<i>B. ingae</i> BR 10250 ^T	96,7	96,4	90,9	89,6	95,2	89,5	94,1	87,5	96,4	90,1	92,5	91,4	73,1	72	89,8	85,8
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T	96,6	96,3	92,8	89,3	93,1	88,3	94,9	86,2	97,7	91,4	93,4	91,8	72,7	72,5	86,6	83,5
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	96,3	97,5	91,7	90,1	95,2	89,1	91,9	89,5	91,9	88,7	93,2	92,5	72,2	69,5	83,5	81,9
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	98,1	99,4	87,7	89,6	89,7	90,2	87,7	91,5	93,2	91	90,3	89,8	78,6	77,9	89	86,2
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	98,2	99,6	89,8	92,2	90,0	91,6	87,5	91	93,7	90,1	89,8	89,4	78,6	76,3	89,8	87,4
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	96,3	97,2	93,3	92,8	94,3	90,6			92,3							
							94,5	88,6		88,3	94	93,2	72	72,9	83,5	81,9
<i>B. manausense</i> BR_3351 ^T	96,1	96,6	92,5	90,9	95,0	91,4	92,1	89,3	94,6	88,3	90,3	91,6	71,5	72,9	87,4	83,5
<i>B. neotropiale</i> BR_10247 ^T	98,8	98,6	94,6	90,6	97,2	89,7			94,6							
							97,1	87,3		87,8	93,4	92,5	74,3	88,8	96,4	87
<i>B. oligotrophicum</i> LMG_10732 ^T	95,9	96,8	87,7	88,5	86,2	86,0			91,4							
							90,1	91,2		88,3	88,5	88,5	-	-	-	-

<i>B. ottawaense</i> _OO99 ^T	96,3	97,2	92,0	91,2	94,7	89,5	93,8	89,3	91,0	88,7	91,1	91,3	72,2	69,5	83,5	81,9
<i>B. pachyrhizi</i> _PAC48 ^T	98,2	97,2	90,4	95,4	88,9	94,1	88,2	96,7	89,6	94,6	92,5	94,5	74,3	73,8	87,4	88,2
<i>B. paxllaeri</i> _LMTR_21 ^T	98,3	99,7	87,7	90,4	90,2	90,6	87,7	91	93,7	90,1	89,6	89,8	78,4	76,1	89,8	87,4
<i>B. retamae</i> _Ro19 ^T	97,8	99,2	88,0	91,4	89,7	89,7	86,2	88,8	89,2	87,8	87,6	87,8	78,8	76,8	89	87
<i>B. rifense</i> _CTAW71 ^T	96,2	96,7	91,4	91,2	94,5	88,3	92,5	88,8	95,9	91	91,1	91,4	76,3	74,5	85,4	83,9
<i>B. yuanmingense</i> _LMG_21 827 ^T	96,3	96,9	93,0	92,0	95,8	91,2	93,6	88,4	91,4	88,7	92,7	92,3	72,7	70	86,2	86,2
<i>B. embrapense</i> _CNPSo_28 33 ^T	98,4	99,7	89,3	92,5	89,7	94,7	86,9	95,2	89,2	92,3	92,3	94	72,5	72,7	86,2	85
<i>B. guangdongense</i> _CCBAU 51649 ^T	96,2	96,7	92,0	90,1	95,0	88,9	92,8	90,6	93,7	87,4	92,5	92,5	-	-	-	-
<i>B. guangxiense</i> _CCBAU_5 3363 ^T	95,9	96,9	93,0	92,2	93,5	88,5	94,3	88,2	92,3	89,2	92,7	92,5	-	-	-	-
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T	97,2	96,7	92,0	91,4	96,2	91,0	91,7	89,5	91,9	87,8	-	-	74	71,5	-	-
<i>B. valentinum</i> _LmjM3 ^T	98,1	99,5	89,0	91,4	85,8	85,8	-	-	-	-	-	-	78,4	77	89	87
<i>B. vignae</i> _7-2 ^T	95,7	96,8	92,2	91,2	95,6	91,4	95,4	89,9	96,4	89,6	-	-	74,3	72,7	-	-
<i>B. subterraneum</i> _58_2-1 ^T	96,6	97,2	90,9	89,6	96,2	91,0	93,6	88,4	94,6	89,6	-	-	-	-	-	-
<i>B. erythrophlei</i> _CCBAU_53 325 ^T	98,4	99,7	91,2	93,0	90,8	95,0	-	-	-	-	91,1	91,3	77,5	77,2	87,8	89,4
<i>B. ferriligni</i> _CCBAU_5150 2 ^T	96,1	97,7	90,6	93,3	89,1	93,7	-	-	-	-	88,5	90,7	73,6	73,4	88,6	89
<i>B. diazoefficiens</i> _USDA_11 0 ^{T(*)}	95,9	96,9	91,4	88,8	95,2	90,0	94,3	88,6	92,8	89,2	93,6	93,2	72,2	69,5	83,5	81,9
<i>B. tropiciagri</i> _CNPSo_1112 ^T	97,5	99,1	91,2	94,4	89,7	94,5	87,3	95,6	88,7	91,4	91,1	93,6	73,1	73,8	85,8	85
<i>B. stylosanthis</i> _BR_446 ^T	98,4	99,7	93,8	93,0	93,9	89,3	93,2	88,2	91,4	88,3	93,6	91,3	74,5	70,9	85	80

4.1.6 Identidade média de nucleotídeos (ANI, do inglês “Average nucleotide identity”)

Os valores foram obtidos a partir da comparação dos genomas de cada uma das estirpes tipo do grupo I (BR 10245^T) e do grupo II (BR 10303^T), com cada uma das espécies próximas já descritas. Todos os valores de ANI encontrados entre as estirpes tipo do primeiro grupo e do segundo grupo, quando comparadas com as espécies já existentes foram inferiores a 92%, independentemente do programa utilizado (Tabela 5). Valores de ANI superiores a 94% correspondem a uma hibridização DNA-DNA de 70%, considerado o limite de similaridade para que espécies sejam separadas (KONSTANTINIDIS et al., 2005; GORIS et al., 2007). Os resultados encontrados através do ANI confirmam que ambos os grupos formam duas novas espécies dentro do gênero dos *Bradyrhizobium*. No caso, o grupo I diferenciou-se da espécie mais próxima *B. neotropicale* BR 10247^T e o grupo II diferenciou-se das espécies *B. elkanii* USDA 76^T e *B. pachyrhizi* PAC 48^T.

Tabela 5. Média de Identidade de Nucleotídeos (ANI) entre as estirpes tipo BR 10245^T e BR 10303^T e as espécies mais próximas encontradas por análises filogenéticas

Espécies	BR 10245 ^T		BR 10303 ^T	
	ANIb (%)	ANIm (%)	ANIb (%)	ANIm (%)
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	79,2	85,6	85,4	88,1
<i>B. pachyrhizi</i> PAC 48 ^T	79,5	85,5	85,6	87,9
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	79,0	85,3	85,1	87,9
<i>B. embrapense</i> SEMIA 6208 ^T	79,1	85,3	85,4	87,7
<i>B. tropiciagri</i> SEMIA 6148 ^T	79,0	85,5	85,0	87,9
<i>B. neotropicale</i> BR 10247 ^T	90,2	91,3	79,6	85,2
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T	85,5	87,8	79,2	85,2

Obs.: O alinhamento do genoma foi feito utilizando o Programa Blast (ANIb) e o programa Mummer (ANIm).

4.1.7 Conteúdo de G+C

Os resultados encontrados foram semelhantes a trabalhos realizados com estirpes do gênero *Bradyrhizobium* onde, em média, os valores encontrados são de aproximadamente 60% (RAMÍREZ-BAHENA et al 2009; ZILLI et al 2014). Os valores encontrados para as estirpes tipo em estudo BR 10245^T (62,2%) e BR 10303^T (62,4%) estão dentro da gama encontrada reportada para bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. (XU et al., 1995) (Tabela 6).

Tabela 6. Conteúdo de G+C dos genomas das respectivas estirpes do grupo I e II e das espécies mais próximas ao grupo *B. elkanni* USDA 76^T, *B. pachyrhizi* PAC 48^T, *B. viridifuturi*, *B. embrapense*, *B. tropiciagri*, *B. neotropicale*, *B. stylosanthis*

Estirpes	Número de acesso no NCBI	Comprimento total (Mb)	Conteúdo de C+G (%)
BR 10245 ^T	LUUB00000000.1	10,1	62,2
BR 10303 ^T	LNCU00000000.1	8,7	62,4
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	NZ_ARAG00000000.1	9,48	63,7
<i>B. pachyrhizi</i> PAC 48 ^T	NZ_LFIQ00000000.1	8,70	63,8
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	NZ_LGTB00000000.1	8,81	64,0
<i>B. embrapense</i> SEMIA	NZ_LFIP00000000.2	8,27	64,0

Tabela 6. Conteúdo de G+C dos genomas das respectivas estirpes do grupo I e II e das espécies mais próximas ao grupo *B. elkanni* USDA 76^T, *B. pachyrhizi* PAC 48^T, *B. viridifuturi*, *B. embrapense*, *B. tropiciagri*, *B. neotropicale*, *B. stylosanthis*

Estirpes	Número de acesso no NCBI	Comprimento total (Mb)	Conteúdo de C+G (%)
6208 ^T			
<i>B. tropiciagri</i> SEMIA	NZ_LFLZ00000000.1	9,77	63,5
6148 ^T			
<i>B. neotropicale</i> BR	NZ_LSEF00000000.1	8,68	63,6
10247 ^T			
<i>B. stylosanthis</i> BR 446 ^T	NZ_LVEM00000000.1	8,8	64,6

4.2 Caracterização Fenotípica

4.2.1 Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos das estirpes pertencentes ao grupo I analisadas (BR 10245^T e BR 10290) e do grupo II (BR 10303^T e BR 10348) apresentaram como ácido graxo predominante o Summed feature 8 (18:1w6c/18:1w7c) e o C:16 (Tabela 7). O primeiro grupo apresentou C18:1 w7c11-methyl, enquanto o segundo grupo não apresentou este ácido em sua constituição. O grupo I diferiu de sua espécie filogeneticamente mais próxima, *B. neotropicale* pois esta apresentou valores de C:16 inferior as demais estirpes do grupo. Já o grupo II, quando comparado às estirpes tipo mais próxima através da filogenia, mostrou-se diferente a *B. elkanni* (USDA 76^T), por exemplo, no que diz respeito ao Summed feature 8 (18:1w6c/18:1w7c), pois esta apresentou valores maiores do que as estirpes do grupo. Com relação à estirpe tipo *B. pachyrhizi* (PAC 48^T) e as BR 10303^T e a BR 10348^T, a primeira diferiu das outras devido ao valor mais elevado no ácido graxo C19:0 ciclo ω8c.

Tabela 7. Análise de ácido graxos das estirpes BR 10245^T e mais uma representante do grupo (BR 10290). BR 10303^T e outra representante do grupo BR 10348 e as estirpes tipo das espécies mais próximas aos grupos em estudo

Perfil	BR 10245 ^T	BR 10290	BR 10303 ^T	BR 10348	BR 10247 ^T	USDA 76 ^T	PAC 48 ^T
16:00	18,45	20,54	13,84	17,39	14,49	11,07	13,43
Sum In Feature 8 (18:1 ω7c)	68,80	65,11	66,60	55,89	68,64	75,26	58,96
18:1 ω7c 11- methyl	8,66	8,93	-	-	11,21	-	-
19:0 cyclo ω 8c	4,09	5,42	19,56	26,72	5,66	13,67	27,61

4.2.2 Análises enzimáticas e testes de assimilação de sais e açúcares

A avaliação das estirpes no que diz respeito a assimilação de sais, açúcares e reações enzimáticas foram realizadas através do teste API 20NE. Dentre os vinte testes pelos quais as estirpes foram submetidas, os resultados diferenciados foram encontrados na reação da enzima L- arginina onde o grupo II reagiu, predominantemente, de forma negativa e o grupo I

de forma positiva (Tabela 8). De modo geral, no grupo II, as estirpes responderam positivamente à redução do $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ enquanto que no grupo I, ambas as reduções, $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ e $\text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2$ apresentaram resultados negativos. Com relação aos açúcares, houve diferentes resultados na maltose e no derivado de glicose N-acetil-glicosamina (Tabela 8). O grupo I reagiu positivamente aos respectivos testes e o grupo II reagiu negativamente. Nos testes subsequentes, resultados diferenciados entre os dois grupos foram encontrados na assimilação do sal citrato de sódio onde o grupo I apresentou resultados negativos, enquanto o segundo grupo apresentou resultados positivos. Já a assimilação dos ácidos adipato e malato o grupo I não os assimilou e o grupo II respondeu positivamente a tais reações. Em todas as outras reações existentes no teste ambos os grupos apresentaram resultados iguais.

Nos outros 13 testes presentes no kit API 20NE, em ambos os grupos, os resultados foram similares. Ora todas as 13 estirpes apresentaram resultados positivos, ora apresentaram resultados negativos. Os substratos os quais tiveram esses resultados foram: L- triptofano, D- glucose, ureia, esculina citrato de ferro, gelatina, 4-nitrofenil- β D-galactopiranosido, D- glucose, L-arabinose, D-manose, D-manitol, gluconato de potássio, ácido caprato e ácido fenil-acetato.

Tabela 8. Resultados do teste API 20 NE. As estirpes testadas foram as dos grupos I e II e as espécies mais próximas dentro do gênero *Bradyrhizobium*. 1- BR 10245^T, 2-BR 10290, 3-BR 10351, 4-BR 10346 e 5-BR 10247^T *B. neotropicale*, 6-BR 10303^T, 7-BR 10362, 8-BR 10365,9- BR 10355,10- BR10363, 11- BR10356,12- BR-10358,13-10348, 14- BR10359, 15- USDA 76^T *B. elkanii*,16- PAC 48^T *B. pachyrhizi*.

Características	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
NO ₃ → NO ₂	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
L-arginina	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
N-acetil-glucosamina	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
D-maltose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
ácido adipato	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ácido málico	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
citrato de trisódio	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Ao comparar os resultados encontrados pelas estirpes do grupo I e a espécie mais próxima *B. neotropicale* BR 10247^T, respostas diferentes foram encontradas para N-acetil-glucosamina, D- maltose e ácido adipato. Já o grupo II, mostrou-se diferente nas reações da L- N-acetil-glucosamina e D-maltose onde as cepas reagiram, predominantemente, de forma negativa enquanto as espécies mais próximas, *B. elkanii* USDA 76^T e *B. pachyrhizi* PAC 48^T responderam positivamente. A espécie mais próxima *B. pachyrhizi* PAC 48^T no teste da L-Arginina apresentou resultado positivo enquanto as estirpes do grupo II e a *B. elkanii* USDA 76^T apresentaram resultados positivos. Para o ácido málico e citrato de trisódio, o segundo grupo respondeu majoritariamente de forma positiva enquanto a espécie *B. elkanii* apresentou resultado negativo para ambos os testes.

Nota-se assim que o testes API 20 NE pode ser uma ferramenta fenotípica capaz de diferenciar organismos. Através do teste foi possível diferenciar as estirpes de cada grupo e as espécies mais próximas em função de suas capacidades de utilizar ou metabolizar os substratos fornecidos.

4.2.3 Utilização de fontes de carbono

Esse teste consistiu na avaliação das respostas metabólicas das estirpes em estudo com relação as 95 diferentes fontes de carbono. Observou-se que dentro do primeiro grupo, das 95 fontes de carbono, 38 tiveram resultados diferenciados entre as quatro estirpes. Dentre os carboidratos estão D- cellobiose, i- erythriol, gentiobiose, sacarose, turanose, entre outros. Das 24 fontes de ácidos carboxílicos, o grupo respondeu diferentemente nas seguintes fontes: ácido acético, ácido cis- aconítico, ácido α -Hidroxi-butírico, ácido α - cetobutírico, ácido α -cetovalérico, ácido malônico. Para os aminoácidos testados, o grupo I apresentou respostas diferentes entre si em nove dos 24 aminoácidos testados. Entre eles estão: L-alanina, ácido glicil-L aspártico, L- histidina, L-leucina, L- prolina, L-serina, inosina etc. Todas as fontes químicas fosforiladas, os polímeros Dextrina e Glicogênio e a amida L-Alaninamida apresentaram resultados diferentes entre as estirpes. Ao comparar os resultados diferenciados entre o grupo e a espécie mais próxima *B. neotropicale* BR 10247^T, observou-se que a esta apresentou resultados negativos para o aminoácido L-Leucina e a amida Glucoronamida enquanto o grupo se mostrou positivo para ambos os testes (Tabela 9).

Com relação ao segundo grupo, das 95 fontes de carbono disponíveis, apenas 22 apresentaram resultados diferenciados dentro do grupo. Dentre as fontes de carboidratos testadas apenas quatro apresentaram resultados diferentes, D- arabitol, D- cellobiose, i- erythriol, maltose e xylitol. Já nos ácidos carboxílicos, os resultados do ácido acético, ácido cis-aconítico, ácido D- glucônico, ácido D- glucurônico, ácido α - hidroxibutírico. Outros resultados diferenciados foram encontrados no polímero dextrina, nas fontes químicas fosforiladas fosfato D-L- α -glicerol e glucose-6 fosfato e nos aminoácidos ácido aspártico glicil-L, prolina hidroxil-L, L-fenilalanina, L- prolina, D- serina, L-serina, L- threonina, ácido γ -aminobutírico e ácido urocânico. Quando comparado, o segundo grupo com as espécies mais próximas, observou-se que dentro dos ácidos carboxílicos a espécie *B. pachyrhizi* PAC 48^T mostrou respostas negativas para o ácido lactone D- galactônico e para o ácido p-hidroxifenilacético enquanto o grupo II se mostrou positivo para esses dois testes (Tabela 9). As espécies mais próximas *B. elkanii* USDA 76^T e *B. pachyrhizi* PAC 48^T se mostraram diferentes das cepas do grupo II pois responderam positivamente ao ácido malônico, enquanto as estirpes do grupo responderam negativamente (Tabela 9). As espécies mais próximas ao responderam positivamente para o álcool 2,3 butanodiol e o grupo II, negativamente. Nas fontes químicas fosforiladas, glucose- 1 fosfato foi positivo apenas para a espécie *B. elkanii* USDA 76^T (Tabela 9).

Ao analisar o resultado de ambos os grupos e compará-los, observou-se que diferiram, de um modo geral, na resposta de 4 das 95 fontes de carbono (Tabela 9). Sendo assim, o teste Biolog GN 2 é também uma ferramenta capaz de mostrar como organismos próximos ou dentro de um mesmo grupo são capazes de metabolizar diversas e diferentes fontes de carbono, permitindo entender quais dessas fontes seriam importantes para a sobrevivência dessas bactérias testadas.

Tabela 9. Resultados do teste Biolog GN2 microplates, considerando as respostas diferenciadas dos grupos em estudo e as espécies mais próximas. 1- BR 10245^T, 2- BR 10290, 3- BR 10351, 4- BR10346 5- *B. neotropicale* BR 10247^T, 6- BR 10303^T, 7- BR 10362, 8- BR 10365, 9- 10355 ,10-BR10363,11- BR10356,12-BR 10358, 13- BR- 10348,14- BR 10359, 15- USDA 76^T *B. elkanii*,16- PAC 48^T *B. pachyrhizi*

Fontes de carbono	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
L- Leucina	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucoranamida	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acido Lactone D-galactônico	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-
Ácido p-Hidroxifenilacético	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ácido malônico	+	+	-	+	+	W	-	-	-	-	-	-	W	-	+	+
2,3- Butanediol	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
i-Erythriol	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Xylitol	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Feniletilamina	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.2.4 Resistência a antibióticos

Dentre as estirpes que foram avaliadas neste trabalho, foram selecionadas, para o teste de sensibilidade a antibióticos apenas as estirpes tipo dos grupos I e II mais uma representante dos respectivos grupos. Além disso, para fins comparativos, também foram avaliadas as espécies *B. elkanii* e *B. neotropicale*. Todas as bactérias avaliadas apresentaram resistência aos antibióticos Cloranfenicol, Tetraciclina, Eritromicina e Ampicilina e apresentaram diferenças como consta na Tabela 10.

Com relação ao primeiro grupo e a espécie mais próxima *B. neotropicale* BR 10247^T não houve diferença nas reações quanto a todos os antibióticos testados. Já o grupo II mostrou resultados diferenciados das espécies mais próximas *B. elkanii* USDA 76^T e *B. pachyrhizi* PAC 48^T. Onde as estirpes do grupo II responderam negativamente para os antibióticos Gentamicina 10 µg, Rifampicina 30 µg, Estreptomicina 10 e 25 µg e Canamicina 30 µg, a espécie *B. elkanii* reagiu positivamente nos antibióticos Gentamicina 10 µg, Rifampicina 30 µg e na Estreptomicina nas duas concentrações. Já com relação a *B. pachyrhizi* as reações

positivas se deram nos antibióticos Gentamicina 10 µg e Estreptomicina nas duas concentrações.

Nos testes de antibiose onde o grupo II mostrou resultados positivos, apenas a espécie *B. pachyrhizi* mostrou resultado diferenciado do grupo no antibiótico Rifampicina 5 µg.

Tabela 10. Resultados diferenciados entre as estirpes em estudo e estirpes tipo de *B. elkanii* e *B. neotropicale* quanto a resistência a antibióticos. (+) indica crescimento normal e (-) crescimento inibido. 1- BR 10245^T, 2- BR 10290, 3- BR 10247^T *B. neotropicale*, 4-BR 10303^T, 5- BR 10348, 6- USDA 76^T *B. elkanii*, 7- PAC48^T *B. pachyrhizi*

Sensibilidade a (µg.mL ⁻¹)	1	2	3	4	5	6	7
Gentamicina (10 µg)	-	-	-	-	-	+	+
Rifampicina (5 µg)	+	+	+	+	+	+	-
Rifampicina (30 µg)	+	+	+	-	-	+	-
Estreptomicina (10 µg)	-	-	-	-	-	+	+
Estreptomicina (25µg)	-	-	-	-	-	+	+
Ampicilina (10 µg)	+	+	+	+	+	+	+
Ampicilina (25 µg)	+	+	+	+	+	+	+
Clorofenicol (30 µg)	+	+	+	+	+	+	+
Clorofenicol (50 µg)	+	+	+	+	+	+	+
Eritromicina (30 µg)	+	+	+	+	+	+	+
Canamicina (30 µg)	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina (30 µg)	+	+	+	+	+	+	+

4.2.5 Crescimento em condições diferenciadas de temperatura, pH e salinidade

De acordo com os resultados encontrados pode-se observar que as estirpes em estudo e as estirpes mais próximas a elas, apresentaram resultados muito semelhantes nas diferentes concentrações de NaCl e pH. No primeiro, o crescimento de todos os organismos só foi possível até a concentração de 0,5%. De modo semelhante, a grande maioria das bactérias avaliadas cresceram em pH entre 5,0 a 11,0, porém a estirpe BR 10247^T de acordo com Zilli et al., (2014) é capaz de crescer em pH menor como mostrado na Tabela 11. Uma característica que diferenciou as estirpes candidatas a uma nova espécie e as mais próximas já descritas foi a temperatura. As quatro estirpes em estudo apresentaram crescimento entre 20 e 36°C, enquanto as espécies já existentes cresceram entre 15-36°C (Tabela 11).

Tabela 11. Resultado do crescimento nas diferentes temperaturas, pH e concentrações de NaCl (%p/v). Foram avaliadas as estirpes BR 10245^T, BR 10290, BR 10303^T e BR 10348, BR 10247^T *B. neotropicale*, USDA 76^T *B. elkanii* e PAC 48^T *B. pachyrhizi*.

Estirpes	Temperatura (°C)	pH	NaCl (%p/v)
BR 10245 ^T	20-36	5-11	0,1-0,5
BR 10290	20-36	5-11	0,1-0,5
BR 10303 ^T	20-36	5-11	0,1-0,5
BR 10348	20-36	5-11	0,1-0,5
<i>B. neotropicale</i>	15-36	4-11*	0,1-0,5
<i>B. pachyrhizi</i>	15-36	5-11	0,1-0,5
<i>B. elkanii</i>	15-36	5-11	0,1-0,5

*De acordo com Zilli et al. (2014)

4.3 Teste de Inoculação Cruzada

O teste de inoculação cruzada mostrou que as estirpes do grupo I, BR 10245^T e a BR 10290 foram capazes de induzir nódulos efetivos em *Arachis hypogaea*, *Cajanus cajan*, *Calopogonium mucunoides*, *Canavalia brasiliensis*, *Centrolobium paraense*, *Crotalaria juncea*, *Pueraria phaseoloides* and *Vigna unguiculata* (Tabela 12). As espécies *Glycine max* e *Lupinus albus* foram noduladas apenas pela estirpe BR 10290 e a espécie *Stylosanthes guianensis* pela cepa BR 10245^T. No entanto, essas duas estirpes induziram nódulos inefectivos em *Phaseolus vulgaris*, *Centrosema pubescens* e *Macroptilium atropurpureum*. A estirpe BR 10290 induziu nódulos inefectivos em *Mucuna pruriens*, enquanto a cepa BR 10245^T não nodulou essa planta hospedeira.

A leguminosa *Leucaena leucocephala* não foi nodulada por nenhuma das estirpes dos grupos I e II. As estirpes do grupo II mostraram poucas diferenças na capacidade simbiótica entre elas, mas quando comparadas com o grupo I, a BR 10303^T e a BR 10348 formaram nódulos em *Centrosema pubescens*, *Glycine max* and *Lupinus albus* (Tabela 12). Nenhuma das pertencentes ao grupo II nodularam com *Macroptilium atropurpureum*. As estirpes tipo BR 10245^T e BR 10303^T formaram nódulos em *Vigna unguiculata*, *Vigna angularis* e *Vigna radiata*. Apenas a estirpe BR 10245^T nodulou a *Acacia ligulata*.

Tabela 12. Resultados do testes de inoculação cruzada com espécies de leguminosas pertencentes a diferentes tribos

Leguminosas	BR 10245 ^T	BR 10290	BR 10303 ^T	BR 10348
Tribo Crotalarieae				
<i>Crotalaria juncea</i>	+	+	+	+
Tribo Dalbeigiaceae				
<i>Arachis hypogaea</i>	+	+	NI	NI
<i>Centrolobium paraense</i>	+	+	+	+
<i>Stylosanthes guianensis</i>	+	-	-	-
Tribo Fabeae				
<i>Pisum sativum</i>	-	NT	-	NT
<i>Vicia fava</i>	-	NT	NT	NT
Tribo Genisteae				
<i>Lupinus albus</i>	-	+	+	+
<i>Lupinus angustifolius</i>	-	NT	-	NT
Tribo Loteae				
<i>Ornithopus compressus</i>	-	NT	-	NT
Tribo Mimoseae				
<i>Leucaena leucocephala</i>	-	-	-	-
<i>Acacia ligulata</i>	+	NT	NT	NT
Tribo Phaseoleae				
<i>Cajanus cajan</i>	+	+	+	+
<i>Calopogonium mucunoides</i>	+	+	+	+
<i>Canavalia brasiliensis</i>	+	+	+	+
<i>Centrosema pubescens</i>	NI	NI	+	+
<i>Glycine max</i>	-	+	+	+
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	NI	NI	-	-
<i>Mucuna pruriens</i>	-	NI	NI	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Pueraria phaseoloides</i>	+	+	+	-
<i>Vigna unguiculata</i>	+	NT	+	NT
<i>Vigna angularis</i>	+	NT	+	NT
<i>Vigna radiata</i>	+	NT	+	NT

** O sinal (+) indica nodulação ativa, (-) não houve nodulação e a sigla NI significa presença de nódulos, mas inativos e NT estirpes não testadas.

4.4 Descrição das Espécies

4.4.1 Descrição da espécie *Bradyrhizobium centrolobii*

Células móveis com flagelo polar, bastonetes gram-negativos (aproximadamente 1,77x0,5 µm), aeróbicas, não formadoras de esporos. Colônias em meio YMA são circulares e translúcidas. Têm o diâmetro de 3-4 mm com 4-5 dias de incubação a 28°C. O crescimento ocorre entre 20°C a 36°C com um ótimo crescimento a 28-30°C, a uma variação de pH de 5,0-11,0 em meio YMA, com crescimento ótimo na faixa de pH 6,0-7,0. O crescimento não ocorre em concentrações de NaCl maiores que 0,5% (p/v). Apresentou reações positivas para os carboidratos L-arabionse, D-arabitol, D-cellobiose-erythriol, D-fructose, L-fucose, D-galactose, α-D-glucose, α-D-lactose, lactulose, maltose, D-mannitol, D-mannose, D-melibiose, β-methyl-D-glucosidase, D-psicose, raffinose, L-rhamnose, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose, turanose and xylitol. Catalase, oxidase, urease e hidrólise da esculina são também

positivas, mas triptofano, fermentação da deaminase, β -galactosidase e a redução do nitrato são negativos. Os ácidos graxos predominantes foram C16:0 and Summed feature 8 (C18:1w6c/C18:1w7c). O conteúdo de G+C do DNA da estirpe tipo é 62,4 mol %. A estirpe tipo proposta BR 10245^T (=HAMBI 3597T) foi isolada de nódulos de *Centrolobium paraense* crescido em solos da Amazônia.

4.4.2 Descrição da espécie *Bradyrhizobium macuxiense*

As células são móveis com flagelo polar, bastonetes gram-negativos (aproximadamente 2,1x0,5 μ m), aeróbicas, não formadoras de esporos. As colônias são circulares e translúcidas com diâmetro de 3-4mm com 4-5 dias de incubação a 28°C. O crescimento ocorre entre 20°C a 36°C, com temperatura ótima de crescimento de 28-30°C. Em meio YMA, o crescimento se dá em pH que varia de 5,0-11,0, com um pH ótimo de 6,0-7,0. O crescimento não ocorre em concentrações de NaCl superior a 0,5% (p/v). Apresentou reações positivas para os carboidratos carbohydrates adonitol, L-arabinose, D-arabitol, i-erythriol, fructose, L-fucose, D-galactose, α -D-glucose, D-mannitol, D-mannose, L-rhamnose, D-sorbitol e xylitol. Resultados positivos foram para catalase, oxidase, urease, hidrólise da esculina e redução do nitrato. A deaminase do triptofano, a fermentação da glucose e a β -galactosidase foram negativos. Os ácidos graxos predominantes detectados foram C16:0 and Summed feature 8 (C18:1 w6c/C18:1 267 w7c). O conteúdo de G+C do DNA da estirpe tipo proposta BR 10303^T foi 62,5 mol%. A estirpe tipo proposta é BR 10303^T (=HAMBI 3602T) foi isolada de nódulos de *Centrolobium paraense* crescido em solos da Amazônia.

5. CONCLUSÕES

A partir das 13 estirpes de bactérias isoladas de nódulos da espécie *Centrolobium paraense* e da caracterização polifásica realizada sobre as mesmas, identificou-se e descreveu-se duas novas espécies de bactérias dentro do gênero *Bradyrhizobium*. Os respectivos nomes propostos para estas espécies foram ***Bradyrhizobium centrolobii*** e ***Bradyrhizobium macuxiense***.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises realizadas a partir da taxonomia polifásica, foram obtidos resultados conclusivos para que se determinasse o posicionamento das treze estirpes de bactérias, descrevendo-se duas novas espécies. As análises genotípicas e posterior filogenia a partir do gene 16S e dos genes *housekeeping* a partir da metodologia MLSA corroboraram para o posicionamento das bactérias no gênero *Bradyrhizobium* e em um clado separado das demais espécies já existentes. Além dessas, as técnicas de ANI e o conteúdo de G+C mostraram resultados concordantes com os encontrados pela filogenia.

As avaliações fenotípicas também mostraram resultados coerentes dentro de cada grupo estudado e de acordo com padrões de respostas de espécies do gênero *Bradyrhizobium*. Além dessas, os estudos quimiotaxonômicos também foram correspondentes aos resultados genotípicos, filogenéticos e aos outros testes fenotípicos.

Como última consideração, vale ressaltar que atualmente há restrições legais para atender as exigências internacionais de taxonomia de procariotos. Isto porque para que um grupo de estirpes seja aceito como espécie nova, a estirpe tipo precisa ser disponibilizada de forma irrestrita para a comunidade científica, procedimento este que é, ao menos em parte, restringido pela legislação brasileira. Estas restrições têm ocasionado o desinteresse de pesquisadores brasileiros atuarem na área de taxonomia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARAÚNA, A.C; SILVA, DA K.; PEREIRA, G.M.D; KAMINSKI, P.E.; PERIN, L.; ZILLI, J.E. Diversity and nitrogen fixation efficiency of rhizobia isolated from nodules of *Centrolobium paraense*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.49, n.4,2014.

BARAÚNA, A.C.; ROUWS, L.F.M.; SIMOES-ARAÚJO, J.L.; JUNIOR, F.B.R.; IANNETTA, P.P.M., MALUK., M.M.; GOI, S.R.; REIS, V.M.; JAMES, E.K.; ZILLI, J.E. *Rhizobium altiplanii* sp. nov. isolated from effective nodules on *Mimosa pudica* growing in untypically alkaline soil in Central Brazil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology v.66, p. 4118-4124, 2016.

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

BERRADA, H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. British Microbiology Research Journal, v. 4, n. 6, p. 616-639, 2014.

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

BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 46, p. 219-252, 1992.

BULL, J. J.; HUELSENBECK, J. P.; CUNNINGHAM, C. W.; SWOFFORD, D. L.; WADDELL, P. J. Partitioning and combining data in phylogenetic analyses. Systematic Biology v.42, p.384–397, 1993.

CHAHBOUNE, R.; CARRO, L.; PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M-H.; BARRIJAL, S.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E.J. *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. Systematic and Applied Microbiology v.35, p.302-305, 2012.

CHAHBOUNE, R.; CARRO, L.; PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M-H.; BARRIJAL, S.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E.J. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology v. 61, p.2922-2927, 2011.

CHANG, Y.L.; WANG, J.Y.; WANG, E.T.; LIU, H.C.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachidis hypogaea*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology v.61, p.2496-2502, 2011.

CHARLES, L.; CARBONE, I.; DAVIES, K. G.; BIRD, D.; BURKE, M.; KERRY, B. R.; OPPERMAN, C. H. Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by use of Multiple Genetic Loci. Journal of Bacteriology v.187, p.5700–5708, 2005.

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

COOPER, J. E.; FEIL, E. J. Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends in Microbiology* v.12, p.373–377, 2004.

COSTA, A.R. da; MADARI, B.E.; CARVALHO, M.T.de M.; MACHADO, P.L.O. de A; BERNARDES, T. G.; da SILVEIRA, P. M da. Uso do nitrogênio na Agricultura e suas Implicações na Emissão do Gás de Efeito Estufa Óxido Nitroso (N₂O). Documento 249, Embrapa Arroz e Feijão, 2009.

DAHMER, N.; WITTMANN, M.T.S.; KAMINSKI, P.E. Chromosome number and karyotype of the endangered Amazonian woody *Centrolobium paraense* Tul. species. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 9, p. 382-385, 2009.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. Multilocus Sequence Analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 698-710, 2012.

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.

DELAMUTA, J.R.M. Análise polifásica de estirpes de *Bradyrhizobium* e descrição de novas espécies. 73f. (Tese de Doutorado em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

DELAMUTA, J.R.M; RIBEIRO, R.A.; ORMEÑO-ORILLO, E. PARMA, M.M.; MELO, I.S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. Nov., nitrogen fixing symbionts of tropical forage legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.65, p.4424-4433, 2015.

DE LEY, J.; CATTOIR, H.; REYNAERTS, A. The Quantitative Measurements of DNA hybridization from Renaturation Rates. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, v. 12, p.133-142, 1970.

DÚRAN, D.; REY, L.; MAYO, J.; ZÚÑIGA-DÁVILA, D.; IMPERIAL, J.; RUIZ-ARGÜESO, T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; ORMEÑO-ORRILLO, E. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v.64, p.2072-2078, 2014.

EARDLY, B. D.; YOUNG, J. P. W.; SELANDER, R. K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Applied Environmental Microbiology* v.58, p.1809–1815, 1992.

FELSENTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* v.17, p.368-376, 1981.

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

GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.56, p.217–229, 2006.

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

GILLER, K.E. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. 2nd ed. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, 2001.

GODOY, D.; RANDLE, G.; SIMPSON, A. J.; AANENSEN, D. M.; PITT, T. L.; KINOSHITA, R.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Journal of Clinical Microbiology* v.41, 2068–2079, 2003.

GRÖNEMEYER, J.L.; CHIMWAMUROMBE, P.; REINHOLD-HUREK, B. *Bradyrhizobium subterraneum* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of groundnuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v.65, p.3241-3247, 2015.

GRÖNEMEYER, J.L; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. *Bradyrhizobium kavangense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of traditional Namibian pulses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v.65, p.4886-4894, 2015.

GRUZMAN, LE; DOBEREINER, J. Anais da IV Reunião Latino Americana sobre inoculantes para leguminosas. Porto Alegre, p.84, 1968.

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

HELENE, L.C.F. Diversidade entre estirpes do gênero *Bradyrhizobium* avaliada por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) e Análise Polifásica.74f. (Tese de Mestrado em Microbiologia) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2015.

HELENE, L.C.F.; DELAMUTA, J.R.M.; RIBEIRO, A.R.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov. encompassing nitrogen-fixing symbionts of legume used for green manure and environmental services. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v.65, p.4441-4448, 2015.

HOLLIS, A. B.; KLOOS, W. E.; ELKAN, B. E. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related Rhizobiaceae. *Journal of General Microbiology* v.123, p.215–222, 1981.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Fixação biológica do nitrogênio com a cultura da soja. In: Workshop nitrogênio na sustentabilidade de sistemas intensivos de produção agropecuária. Dourados, MS. Anais... Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 5175. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 26; Embrapa Agrobiologia. Documentos, 128). Editado por Fábio Martins, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Embrapa soja, Londrina, 2001.

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. Documento 283, Embrapa soja, Londrina, 2007.

ISLAM, M.S., KAWASKY, H., MURAMATSU, Y., NAKAGAWA, Y., SEKI, T. *Bradyrhizobium iriomotense* sp nov., Isolated from a Tumor-Like Root of the Legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* v. 72, p.1416-1429,2008.

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

JORDAN, D. C. Family III. Rhizobiaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins Co. v. I, p. 234-242, 1984.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. "Evolution of protein molecules". In Munro, H. N. *Mammalian 300 Protein Metabolism*. New York Academic Press, p.21–123, 1969.

KÄMPFER, P.; GLAESER, P. Prokaryotic taxonomy in the sequencing era – The Polyphasic Approach Revisited Minireview. v.14, p.291-317, 2012.

KONSTANTINIDIS, K.T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v. 102, n.7, p. 2567-2572,2005.

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

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. Mega 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis 302 Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* v.33, p.1870-1874, 2016.

KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, v.38, p. 501-505, 1992.

LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P. E AMARGER, NOËLLE. Classification of rhizobia based on *nodC* e *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*. v. 147, p. 981-993.2001.

LAPAGE, S.P.; SNEATH P.H.A; LESSEL, E.F; SKERMAN, V.B.D; SEELIGER H.P.R, CLARK, W.A. International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990 Revision. ASM Press, Washington (DC), 1992.

LI, Y.H.; WANG, R.; ZHANG, X.X.; YOUNG, J.P.W.; WANG, E.T.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. *Bradyrhizobium guangdongense* sp. nov. and *Bradyrhizobium guangxiense* sp. nov., isolated from effective nodules of peanut. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v.65, p. 4655-4661

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

LU, J.K.; DOU, Y.J.; ZHU, Y.J.; WANG, S.K.; SUI, X.H.; KANG, L.H. *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v.64, p.1900-1905, 2014.

MARQUES, M.S.; PAGANO, M.; SCOTTI, M.R.M.M.L. Dual inoculation of a wood legume (*Centrolobium tomentosum*) with rizobia and mycorrhizal fungi in south-eastern Brazil. *Agroforest Systems* v. 52, p. 107-117. 2001.

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 Evolutionary Microbiology* v. 57, p. 489-503, 2007.

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 *housekeeping* genes in the genus *Ensifer* including former *Sinorhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 58, p. 200-214, 2008.

MELO, S. RIBEIRO DE; ZILLI, J.E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Brasília, v.44, n. 9, p. 1177-1183, 2009.

MENNA, P., HUNGRIA, M., BARCELLOS, F. G., BANGEL, E. V., HESS, P. N. & MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol* v.29, p.315–332,2006.

MENNA, P.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on Multilocus Sequence Analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *gln II*, *rec A*, *atpD* and *dnaK* genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 59, p. 2934-2950, 2009.

MENNA, P.; HUNGRIA, M. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.61, p.3052-3067, 2011.

MOORE, E. R.; MIHAYLOVA, S. A.; VANDAMME, P.; KRICHEVSKY, M. I.; DIJKSHOORN, L. Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Res Microbiol* 161, 430–438, 2010.

MOREIRA, F. M. S. Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazonia e Mata Atlantica. (Tese de Doutorado), UFRRJ, Rio de Janeiro, 1991.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic Applied Microbiology* v.16, p.135–146, 1993.

MOREIRA, F.M.D.; HAUKKA, K.; YOUNG, J.P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of Forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology*. v.7, p. 889-895, 1998.

ORLA-JENSEN S. Die Hauptlinien der natürlichen Bakteriensystems. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II*, v.22, p. 305–46, 1909.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; VINUESA, P.; ZÚÑIGA-DÁVILA, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Systematic Applied Microbiology*, v.29, p.253–262, 2006.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.A.; Lloret, L.; LÓPEZ, A.; MARTINEZ, J.; VINUESA, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Rhizobial diversity in different land use systems in the rain forest of Los Tuxtlas, México. In *Below-Ground Biodiversity in Sierra de Santa Marta, Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico*. Edited by I. Barois, E. J. Huising, P. Okoth, D. Trejo & M. De los Santos. Xalapa, Mexico: Instituto de Ecología p. 65-84, 2009.

PAGANO, M.C. Rhizobia associated with neotropical tree *Centrolobium tomentosum* used in riparian restoration. *Plant soil environment*. v. 54, n. 11, p. 498-508, 2008.

PALLERONI, N.J. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal review v.149, p 1-7, 2003

PEIX, A.; BAHENA-RAMÍREZ, M.H.; FLORES-FÉLIX, J.D.; DE LA VEGA, P.A.; RIVAS, R.; MATEOS, P.F.; IGUAL, J.M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; TRUJILLO, M.E.; VELÁZQUEZ, E. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupine* and reclassification as *Bradyrhizobium lupine* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v.65, p.1213-1219, 2015.

PEIX, A.; BAHENA-RAMÍREZ, M.H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E.J. Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.34, p. 17-42, 2015.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 64, n.1, p. 180-201, 2000.

PIRIE, M.D.; KLITGAARD, B.B.; PENNINGTON, R.T. Revision and Biogeography of *Centrolobium* (Leguminosae- Papilionoideae). *Systematic Botany*. v. 34, n. 2, p. 345- 359, 2009.

POLY, F.; MONROZIER, L.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology* v.152, p. 95-103, 2001.

PRAKASH, O.; VERNA, M; SHARMA, P; KUMAR, M; KUMARI, K.; SINGH, A. KUMARI, H.; JIT, S; GUPTA, K.S; KHANNA, M; LAL, R. Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances. v. 47, p. 98-108. 2007.

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

RAMÍREZ-BAHENA, M-H; CHAHBOUNE, R.; PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E. Reclassification of *Agromonas oligotrophica* into the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.63, p.1013-1016, 2013.

RAMÍREZ-BAHENA, M-H; PEIX, A.; RIVAS, R.; CAMACHO, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; WILLEMS, A.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. v.59, p.1929-1934, 2009.

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

RIBEIRO, R.A.; MARTINS, T.B.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DELAMUTA, J.R.M.; ROGEL, M.A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium ecuadorensis* sp nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v.65, p.3162-3169, 2015.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MORÁ, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition v.106, n°45, p.19126-19131, 2009.

RIVAS, R; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E. Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes. *Microbiology Insights*, v. 2, p. 51-69, 2009.

RIVAS, R.; MARTENS, M.; de LAJUDIE, P.; WILLENS, A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and applied microbiology*, v. 32, p. 101-110, 2009.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PALOMO, J.L.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P.F., MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. v.54, p.1271-1275, 2004.

ROGEL, M. A.; ORMENO-ORRILLO; MARTINEZ ROMERO, E. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legume. Systematic and Applied Microbiology. v.34, p. 96-104, 2011

ROKAS, A.; KING, N.; FINNERTY, J.; CARROLL, S. B. Conflicting phylogenetic signals at the base of the metazoan tree. Evolution & Development, v.5, p.346–359, 2003.

ROUWS, L.F.M.; LEITE, J.; de MATOS, G.F.; ZILLI, J.E.; COELHO, M.R.R.; XAVIER, G.R.; FISCHER, D.; HARTMANN, A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Endophytic *Bradyrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. Environmental microbiology reports, v. 6, p.354-363, 2014.

SARITA, S.; SHARMA, P.K.; PRIEFER, U.B.; PRELL, J. Direct amplification of rhizobia *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. Federation of European Microbiological Societies v. 54, p. 1-11, 2005.

SCHILDKRAUT, C.; DOTY, P.; MARMUR, J. The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. J Mol Biol. v.3, p.595-617, 1961.

SILVA, K.de; MEYER, S.E.de; ROUWS, L.F.M.; FARIAS, E.N.C.; SANTOS, M.A.O.dos; O'HARA, G.; ARDLEY, J.K.; WILLEMS, A.; PITARD, R.M.; ZILLI, J.E. *Bradyrhizobium ingae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Inga lourina* grown in Cerrado soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology v.64, p.3395-3401, 2014.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: F. H. Freeman & Co, p. 573, 1973.

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

STALEY, J.T. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. Philosophical Transactions of the Royal Society Lond B Biol Sci v.361, p.1899-1909, 2006.

STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRZYŻAN 'SKA, A.; MCINNES, A.; LAW, I. J.; HOWIESON, J. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. Appl Environ Microbiol v.71, p.7041–7052, 2005.

TAIZ E ZEIGER. Plant physiology. 5th Edition. Massachusetts,USA: Sinauer Associates 2010, p.351-358

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

URQUIAGA, S.; JANTALIA, C.P.; DE RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R., BODDEY, R.M. Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio na Produtividade dos Sistemas Agrícolas na América Latina. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap7ID-1aDona7p8o.pdf>. Acesso em 5 nov, 2016.

VAN BERKUM, P.; TEREFEFORK, Z.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; LINDSTROM, K.; EARDLY, B. D. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. *Journal of Bacteriology*, v. 185, p. 2988–2998, 2003.

VAN BERKUM, P.; LEIBOLD, J.M.; EARDLY, B.D. Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *lastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium denitrificans* (comb.nov.), v.29, p.207-215,2006.

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

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJIN F.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. *Methods in molecular and cellular biology*. v. 5, p. 25-40, 1994.

VINCENT, J. M. Manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: BlacwFell Scientific. (IBP Handbook, 15), p.164,1970.

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

WANG, J.Y.; WANG, R.; ZHANG, Y.M.; LIU, H.C.; CHEN, W.F.; WANG, E.T.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v.63, p.613-624, 2013.

WAYNE, L. G; BRENNER, D.J.; COLWELL, R. R; GRIMONT, P.A.D.; KANDLER, O; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, L.H.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E; STARR, M.P.; TRÜPER, H.G. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v. 37, p. 463-464, 1987.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* v.173, n°2, p.697-703, 1991.

WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. Phylogenetic and DNA– DNA hybridization analyses of Bradyrhizobium species. International Journal of Systematic of Evolutionary Microbiology, v. 51, p.111–117, 2001.

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

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

YAO, Y.; SUI, X.H.; ZHANG, X.X.; WANG, E.T.; CHEN, W.X. *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology v.65, p. 1831-1837, 2015.

YAO, Z.Y.; KAN, F.L.; WANG, E.T.; WEI, G.H.; CHEN, W.X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus Lespedeza and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology v.52, p. 2219-2230, 2002.

YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E.; Diversity and phylogeny of rhizobia. New Phytologist v.133, p.87-94, 1996.

YU, X.; CLOUTIER, S.; TAMBONG, J.T.; BROMFIELD, E.S.P. *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology v.64, p.3202-3207, 2014.

ZHANG, Y.M.; JR., Y.L.; CHEN, W.F.; WANG, E.T.; SUI, X.H.; LI, Q.Q.; ZHANG, Y.Z.; ZHOU, Y.G.; CHEN, W.X. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology v.62, p.1951-1957, 2012.

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

8. ANEXOS

Anexo A- Resultados do teste API 20NE das treze estirpes avaliadas no trabalho e as espécies mais próximas. 1- BR 10245^T, 2- BR 10290, 3- BR 10346, 4- BR 10351 e 5- BR 10247^T *B. neotropicale*, 6- BR 10303^T, 7- BR 10362, 8- BR 10365, 9- BR 10355, 10- BR 10363, 11- BR 10356, 12- BR 10358, 13- BR 10348, 14- BR 10359, 15- *B. elkanii* USDA 76^T, 16- *B. pachyrhizi* PAC 48^T

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
NO ₃ → NO ₂	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
NO ₂ → N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-triptofano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arginina	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Ureia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina citrato de ferro	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4-nitrofenil- βD-galactopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manose		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil-glucosamina	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
D-maltose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
Potássio gluconato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido caprato	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ácido adipato	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Ácido málico	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Citrato de trisódio	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Ácido fenil-acetato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Anexo B - Resultado do teste Biolog GN2 microplates das estirpes do grupo I mais a espécie mais próxima ao grupo .1- BR 10245^T, 2- BR 10290, 3- BR 10346, 4- BR 10351 e 5- BR 10247^T *B. neotropicale*

Carboidratos	1	2	3	4	5	Ácidos carboxílicos	1	2	3	4	5	Aminoácidos	1	2	3	4	5
N acetil-D-galactosamina	W	-	-	-	+	Ácido acético	+	+	+	-	+	D-Alanina	+	+	+	+	+
N acetil-D-glucosamina	-	-	-	-	-	Ácido cis- aconítico	+	+	+	-	-	L-Alanina	W	W	+	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	Ácido cítrico	+	+	+	+	+	L-Alanil-glicina	+	+	+	+	+
L- Arabinose	+	+	+	+	+	Ácido fórmico	+	+	+	+	+	L- Asparagina	+	+	+	+	+
D-Arabitól	+	+	+	+	+	Ácido lactone D-Galactônico	+	+	+	+	+	L- Ácido aspártico	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	-	-	-	+	Ácido D-Galacturônico	+	+	+	+	+	L- ácido glutâmico	+	+	+	+	+
<i>i</i> -Erythriol	+	-	-	-	-	Ácido D-Glucônico	+	+	+	+	+	Ácido Glycyl-L-aspártico	+	+	-	-	+
D- fructose	+	+	+	+	+	Ácido D- Glucosaminico	+	+	+	+	+	Glycyl-L- ácido glutâmico	+	+	+	+	+
L-fucose	+	+	+	+	+	Ácido D-Glucurônico	+	+	+	+	+	L-Histidina	+	W	+	-	+
D-galactose	+	+	+	+	+	Ácido α -Hidroxibutírico	-	+	+	+	+	Hidroxil-L- prolina	-	W	-	-	-
Gentiobiose	W	-	-	-	+	Ácido β - Hidroxibutírico	+	+	+	+	+	L- Leucina	+	+	+	+	-
α -D-Glucose	+	+	+	+	+	Ácido γ -Hidroxibutírico	+	+	+	+	+	L-Ornitina	-	W	+	-	-
m-Inositol	W	-	-	-	+	Ácido p-Hidroxifenilacético	W	+	+	+	+	L- Fenilalanina	+	+	+	+	+
α -D-Lactose	+	-	-	-	+	Ácido Itacônico	+	+	+	+	+	L- Prolina	+	+	-	+	+
Lactulose	+	-	-	-	+	Ácido α -cetobutírico	-	+	+	+	-	L- ácido pirogluyâmico	+	+	+	+	+
Maltose	+	-	-	-	+	Ácido α -cetogutarático	+	+	+	+	+	D-Serina	+	+	+	+	+
D- Manitol	+	+	+	+	+	Ácido α -cetovalérico	-	+	+	+	+	L-Serina	-	W	+	-	-
D- Manose	+	+	+	+	+	Ácido D.L- Láctico	+	+	+	+	+	L- Treonina	+	+	+	+	+
D- Melibiose	+	-	-	-	+	Ácido Malônico	+	+	-	+	+	D,L- Carnitina	+	+	-	-	+
β -Metil-D-	+	-	-	-	+	Ácido Propiônico	+	+	+	+	+	Ácido γ -	+	+	-	+	+

glucosidase													aminobutírico					
D- Psicose	+	+	+	-	+	Ácido Quínico	+	+	+	+	+	+	Ácido urocânico	+	+	+	+	+
D- Raffinose	+	-	-	-	+	Ácido D-Sacárico	+	+	+	+	+	+	Inosina	+	-	+	-	-
L- Rhamnose	+	+	+	+	+	Ácido sebácico	+	+	+	+	+	+	Uridina	W	-	-	-	-
D- Sorbitol	+	+	+	-	+	Ácido succínico	+	+	+	+	+	+	Timidina	W	-	-	-	-
Sacarose	+	-	-	-	+													
D- Trehalose	+	+	W	-	+	Álcoois	1	2	3	4	5	Amidas	1	2	3	4	5	
Turanose	+	W	W	-	+	2,3- Butanodiol	-	-	W	-	-	Ácido succinâmico	+	+	+	+	+	
Xilitol	+	+	-	-	+	Glicerol	+	+	+	+	+	Glucuronamida	+	+	+	+	-	
												L-Alaninamida	+	+	+	-	+	
						Ésteres	1	2	3	4	5							
Polímeros	1	2	3	4	5	Piruvato de metil	+	+	+	+	+	Aminas	1	2	3	4	5	
α- Ciclodextrina	-	-	-	-	-	Mono-Metil-Succinato	+	+	+	+	+	Feniletilamina	-	-	-	-	-	
Dextrina	+	-	-	-	+							Putrescina	-	-	-	-	-	
Glicogênio	+	-	-	-	+	Produtos químicos fosforilados	1	2	3	4	5	2- Aminoetanol	-	-	-	-	-	
Tween 40	+	+	+	+	+	D-L-α- Glicerol fosfato	+	+	-	-	+							
Tween 80	+	+	+	+	+	Glucose 1- fosfato	+	-	-	-	+	Produtos químicos bromados	1	2	3	4	5	
						Glucose-6-fosfato	+	+	-	-	+	Ácido succínico bromo	+	+	+	+	+	

Anexo C– Teste Biolog GN2 microplates das estirpes do segundo grupo e as espécies do gênero *Bradyrhizobium*. 1- BR 10303^T, 2- BR 10362, 3- BR 10365, 4- BR 10355, 5- BR 10363, 6- BR 10356, 7- BR 10358, 8- BR 10348, 9- BR 10359, 10- *B. elkanii* USDA 76^T, 11- *B. pachyrhizi* PAC 48^T

Carbohydrates	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Carboxylic acids	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
N acetil-D-galactosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	Ácido acético	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
N acetil-D-glucosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	Ácido cis- aconítico	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	Ácido cítrico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L- Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ácido fórmico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabitól	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	Ácido lactone D-Galactônico	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Cellobiose	W	-	-	-	-	-	W	W	-	+	-	Ácido D-Galacturônico	+	+	W	W	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>i</i> -Erythriol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	Ácido D-Glucônico	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	W
D- fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ácido D- Glucosaminico	W	W	W	+	+	W	+	+	+	+	+	+
L-fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ácido D-Glucrônico	W	W	W	-	-	-	W	+	W	+	+	-
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ácido α -Hidroxibutírico	+	W	-	+	+	W	+	+	W	+	+	+
Gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	Ácido β - Hidroxibutírico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ácido γ -Hidroxibutírico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
m-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	Ácido p-Hidroxifenilacético	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
α -D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	W	Ácido Itacônico	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	W	Ácido α -cetobutírico	+	W	W	+	+	W	W	+	W	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	W	-	+	+	Ácido α -cetogutarático	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- Manitol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	Ácido α -cetovalérico	+	W	W	+	+	+	W	+	W	-	-	-
D- Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ácido D.L- Láctico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	Ácido Malônico	W	-	-	-	-	-	-	W	-	+	+	+
β -Metil-D-glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	Ácido Propiônico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

D- Psicose	W	-	-	-	-	-	W	W	W	W	-	Ácido Quínico	W	-	-	-	-	-	W	W	-	W	-
D- Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	Ácido D-Sacárico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L- Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	Ácido sebáico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- Sorbitol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	Ácido succínico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-												
D- Trehalose	W	-	-	-	-	-	W	W	-	w	+	Álcoois	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Turanose	W	-	-	-	-	-	W	W	-	W	+	2,3- Butanodiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Xilitol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	W	+	Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Polímeros	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Ésteres	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
α - Ciclodextrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	Piruvato de metil	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrina	-	-	-	-	-	W	W	+	-	W	-	Mono-Metil-Succinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicogênio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-												
Tween 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
												Produtos químicos fosforilados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Amidas												Produtos químicos fosforilados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ácido succinâmico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D-L- α - Glicerol fosfato	W	+	W	-	+	+	+	W	+	+	-
Glucuronamida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Glucose 1- fosfato	-	-	-	-	-	-	-	W	-	+	-
L-Alaninamida	+	+	w	+	+	+	+	+	W	+	+	Glucose-6-fosfato	+	+	W	-	+	+	+	+	+	+	-
												Produtos químicos bromados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Aminas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Produtos químicos bromados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Feniletilamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ácido succínico bromo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Putrescina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-												
2- Aminoetanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-												
												Aminoácidos											
Aminoácidos												Aminoácidos											
D-Alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	L- ácido pirogluyâmico	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
L-Alanina	W	-	-	W	+	W	W	W	-	+	+	D-Serina	+	+	W	-	+	+	+	+	+	+	W
L-Alanil-glicina	+	W	+	-	+	+	+	+	+	+	+	L-Serina	W	-	-	-	+	W	+	W	-	+	W
L- Asparagina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	L- Treonina	+	+	W	-	+	W	+	+	W	+	+

L- Ácido aspártico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D,L- Carnitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L- ácido glutâmico										+	+	Ácido γ -aminobutírico	-	W	-	-	-	-	W	+	-	W	W
Ácido Glycyl-L-aspártico	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	W	Ácido urocânico	+	-	+	W	+	+	+	+	-	+	+
Glycyl-L- ácido glutâmico	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	Inosina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Histidina	W	-	-	-	-	-	W	-	-	W	-	Uridina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidroxi-L- prolina	W	-	-	-	+	-	W	-	-	W	-	Timidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L- Leucina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
L-Ornitina	W	-	-	-	-	-	W	W	-	-	-												
L- Fenilalanina	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+												
L- Prolina	+	W	W	-	+	+	+	+	+	+	+												