

UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

DISSERTAÇÃO

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO
GÊNERO *Bradyrhizobium* COMO ENDOFÍTICAS E NA
RIZOSFERA DE DUAS CULTIVARES DE CANA-DE-
AÇÚCAR**

Ivan de Alencar Menezes Júnior

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bradyrhizobium* COMO
ENDOFÍTICAS E NA RIZOSFERA DE DUAS CULTIVARES DE CANA-
DE-AÇÚCAR**

IVAN DE ALENCAR MENEZES JÚNIOR

Sob a orientação do professor
Dr. Luc Felicianus Marie Rouws

Co-orientação do professor
Dr. Ederson da Conceição Jesus

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de concentração Biotecnologia Aplicada.

Seropédica, RJ
Abril, 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada com os dados fornecidos pelo autor

M541d Menezes Júnior, Ivan de Alencar, 1977-
Diversidade de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*
como endofíticas e na rizosfera de duas cultivares de cana-
de-açúcar / Ivan de Alencar Menezes Júnior. - 2017.
77 f.: il.

Orientador: Luc Felicianus Marie Rouws.
Coorientador: Ederson da Conceição Jesus.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, 2017.

1. Gênero *Bradyrhizobium*. 2. Cana-de-açúcar. 3.
Bactérias associadas às plantas. 4. Avaliação da densidade
microbiana nas amostras. 5. Avaliação da diversidade
microbiana. I. Rouws, Luc Felicianus Marie, 1976-, orient.
II. Jesus, Ederson da Conceição, 1979-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa
de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia
Aplicada. IV. Título.

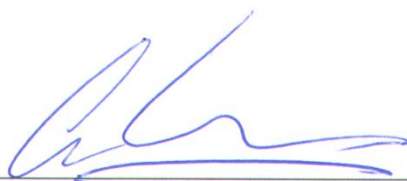
É permitida a cópia parcial ou total desta dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA**

IVAN DE ALENCAR MENEZES JÚNIOR

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada**, Área de concentração em Biotecnologia Aplicada.


DISERTAÇÃO APROVADA EM 27/04/2017.



Luc Felicianus Marie Rouws. (Dr.) Embrapa Agrobiologia
(Orientador)



Irene da Silva Coelho. (Dra.) UFRRJ



Marcia Reed Rodrigues Coelho. (Dra.) Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

*À minha família e amigos,
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e o Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada por tornar possível a realização de mais uma etapa profissional importante em minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro à pesquisa, através da concessão de bolsa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luc Felicianus Marie Rouws, pela grandiosa colaboração, atenção, sugestões e ensinamentos transmitidos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ederson da Conceição Jesus pelo inestimável auxílio e colaboração.

Ao colega Peter pela ajuda e amizade desde o início desta jornada.

Ao pesquisador Dr. Jerri Édson Zilli, pelo apoio no início desta jornada.

À professora Dra. Altagratia Chiesse e ao professor Me. Gilson Roberto de Souza pelo apoio.

Aos professores dos programas pelos ensinamentos transmitidos.

À professora Dra. Anelise Dias, pelo estágio e participação como membro da banca.

Às Dras. Irene Coelho, Marcia Reed e Márcia Vidal pela participação como membros da banca.

A todos os funcionários do Programa de Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Ivanete, Adriana, Vera, Silvana, pelo carinho e atenção, sobretudo ao secretário Roberto Tadeu pela dedicação e disponibilidade.

Aos colegas Karine Moura de Freitas, João Luis, Lúcio, Wilson, Claudinho, Marildo, Damaris, Roberto e Aurélio da EMBRAPA Agrobiologia, pela ajuda, ensinamentos e dedicação dispensados a mim durante a realização deste trabalho.

Aos colegas Jaqueline, Rulfe, Vinício, Samuel, Daniele, Daniel, Ophelia, Gustavo, Natália, Érica, Fernanda, Sumaya, Alexandre Baraúna, Mayan, Aurea, Thiago e Luis Fernando pela amizade e companheirismo nos laboratórios da Embrapa Agrobiologia.

Às colegas Tatiana e Kerly pela amizade.

À dona Dinália, Maria Isabel, Mariana e família pela amizade.

À minha mãe Rosane Mautoni Menezes, minhas irmãs Monique e Mônica e minha sobrinha Luiza pelo apoio, dedicação e carinho.

Ao Cesar, Solange, Cesar Junior, Maraize e Aninha pelo carinho e amizade.

À Cristiane por todo o amor.

Aos meus familiares e amigos que de uma maneira e de outra colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

MENEZES JÚNIOR, Ivan de Alencar. **Diversidade de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* como endofíticas e na rizosfera de duas cultivares de cana-de-açúcar.** 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O gênero *Bradyrhizobium* é comumente encontrado como endossimbionte em leguminosas (família *Fabaceae*) como a soja (*Glycine max*), formando nódulos nas raízes dessas plantas e disponibilizando nitrogênio da atmosfera para essas plantas e para o solo. Pesquisas recentes mostraram a presença de bactérias desse gênero no interior de raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), uma não leguminosa pertencente à família *Poaceae*. Este trabalho tem como objetivo conhecer a densidade populacional dessas bactérias associadas às raízes de duas cultivares de cana-de-açúcar e compreender como o genótipo da planta (cultivar) afeta a composição populacional dessas bactérias encontradas na rizosfera e na endosfera. Amostras de rizosfera e de raízes de duas cultivares economicamente relevantes de cana-de-açúcar (RB867515 e IACSP95-5000) foram coletadas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, seriadamente diluídas e inoculadas em plântulas gnotobióticas de feijão-caupi usadas como plantas iscas. A técnica de número mais provável foi utilizada para quantificar a densidade dos rizóbios presentes nas amostras e os isolados obtidos dos nódulos foram cultivados até formarem culturas puras. A técnica de BOX-PCR e análise de sequência dos genes *recA*, região ITS e *nodC* foram aplicadas para compreender melhor a diversidade genética desses rizóbios. Ensaio de redução de acetileno foi aplicado para verificar a presença de atividade da nitrogenase. Observou-se a presença de no mínimo 15625 rizóbios g⁻¹ de raiz em amostras de rizosfera e entre 125 e 625 rizóbios g⁻¹ de raiz nas amostras de endosfera. Isso mostra que a densidade de rizóbios na rizosfera de cana-de-açúcar é significativamente maior do que no interior das raízes para as duas cultivares de cana. Foram obtidos 34 isolados das amostras de rizosfera de cada cultivar e 15 e 14 respectivamente do interior das raízes das cultivares IACSP95-5000 e RB867515. A maior parte dos isolados apresentaram características morfo-culturais do gênero *Bradyrhizobium*. Análises filogenéticas posicionaram a maioria dos isolados no superclado de *Bradyrhizobium elkanii*. Não foi observada correlação entre a cultivar vegetal e a abundância de *Bradyrhizobium* spp. nas raízes e rizosfera das plantas de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Fixação Biológica de Nitrogênio, bactérias diazotróficas, gene *nifH*

ABSTRACT

MENEZES JÚNIOR, Ivan de Alencar. **Diversidade de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* como endofíticas e na rizosfera de duas cultivares de cana-de-açúcar.** 2017. 77 p. Dissertation (Master in Applied Biotechnology and Plant health). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The genus *Bradyrhizobium* is commonly found as endosymbiont in legumes (*Fabaceae* family), such as soybean (*Glycine max*), forming nodules on the roots and providing nitrogen from the atmosphere to these plants and to the soil. Recent research has shown the presence of bacteria from this genus inside roots of sugarcane (*Saccharum* spp.), a non-legume belonging to the *Poaceae* family. This work aims to know the population density of these bacteria associated with the roots of two sugarcane cultivars and to understand how the plant genotype (cultivar) affects the population composition of these bacteria found in the rhizosphere and the endosphere. Rhizosphere and root samples of two economically relevant sugarcane cultivars (RB867515 and IACSP95-5000) were collected in the experimental field of Embrapa Agrobiology, serially diluted and inoculated on gnotobiotic seedlings of cowpea used as trap plants. The most probable number technique was used to quantify the density of the rhizobia present in the samples and the isolates obtained from the nodules were cultivated to form pure cultures. BOX-PCR technique and sequence analysis of the ribosomal internally transcribed spacer region (ITS), *recA* housekeeping gene, and the symbiotic *nodC* gene were applied to better understand the genetic diversity of these rhizobia. Acetylene reduction test was applied to verify the presence of nitrogenase activity under free-living conditions. The presence of at least 15625 rhizobia g root⁻¹ in rhizosphere samples and between 125 and 625 rhizobia g root⁻¹ in the endosphere samples was observed. This shows that the density of rhizobia in the rhizosphere of sugarcane is significantly higher than in the interior of the roots for the two cane cultivars. A total of 34 isolates were obtained from the rhizosphere samples of each cultivar and 15 and 14 respectively from the roots of cultivars IACSP95-5000 and RB867515. Most of the isolates presented morphoculture characteristics of the genus *Bradyrhizobium*. Phylogenetic analyzes positioned most of the isolates in the superclade *Bradyrhizobium elkanii*. No correlation was observed between the plant cultivar and the abundance of *Bradyrhizobium* spp. in the roots and rhizosphere of sugarcane plants.

Key-words: Biological nitrogen fixation, diazotrophic bacteria, *nifH* gene.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação das plantas de feijão-caupi inoculadas com amostras de endosfera e rizosfera seriadamente diluídas de duas cultivares de cana-de-açúcar no bloco I, onde: R1, R2 e R3 são as repetições e os números são as identificações das plantas inoculadas.....	17
Tabela 2- Relação das plantas de feijão-caupi inoculadas com amostras de endosfera e rizosfera seriadamente diluídas de duas cultivares de cana-de-açúcar no bloco II, onde: R1, R2 e R3 são as repetições e os números são as identificações das plantas inoculadas.....	17
Tabela 3- Relação das plantas de feijão-caupi inoculadas com amostras de endosfera e rizosfera seriadamente diluídas de duas cultivares de cana-de-açúcar no bloco III, onde: R1, R2 e R3 são as repetições e os números são as identificações das plantas inoculadas.....	18
Tabela 4- Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas amplificações das regiões <i>recA</i> , ITS, <i>nodC</i> e <i>nifH</i> , otimização da condição da PCR e volume final da reação de 50 µL para cada amostra e reação final de 25 µL em cada amostra na BOX PCR (continua).....	21
Tabela 5- Número de plantas de feijão-caupi com nodulação após inoculação com diferentes diluições de amostras de rizosfera e de endosfera de raízes de cana-de-açúcar das cultivares RB867515 e IACSP95-5000.....	24
Tabela 6- Quantidade de isolados obtidos após inoculação em plantas de feijão-caupi com diferentes diluições de amostras de rizosfera e de endosfera de raízes de cana-de-açúcar das cultivares RB867515 e IACSP95-5000.....	26
Tabela 7- Genótipos formados e seus respectivos isolados a partir do dendrograma de BOX PCR com similaridade de 80 %. Isolados representantes usados para caracterização dos genes <i>recA</i> , região ITS, <i>nodC</i> e <i>nifH</i> estão destacados em negrito.....	31
Tabela 8- Amplificação e sequenciamento dos genes.....	32
Tabela 9- Valores de etileno expressos em nmol/frasco dos isolados utilizados para o ensaio de redução de acetileno.....	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Localização de rizosfera, endosfera, rizoplano e *bulk soil* no solo e raiz da cana-de-açúcar.....5
- Figura 2-** Localização do Terraço. Local de coleta destacado. Fonte: Google maps (2017)...14
- Figura 3-** Croqui da área de coleta. Fonte: Próprio autor.....15
- Figura 4-** Colônias de isolados obtidos após inoculação em plantas de feijão-caupi com diferentes diluições de amostras de rizosfera e de endosfera de raízes de cana-de-açúcar das cultivares RB867515 e IACSP95-5000 apresentando características morfo culturais diversas. Isolados de crescimento rápido (a-d) e isolados de crescimento lento (e-i).....27
- Figura 5-** Dendrograma de similaridade genética por BOX PCR dos isolados obtidos das amostras de endosfera e rizosfera de raízes de cana-de-açúcar das cultivares RB867515 e IACSP95-5000. (G) Genótipos formados com 80% de similaridade.....29
- Figura 6-** Representação do superclado *Bradyrhizobium japonicum*. Filograma *Maximum Likelihood* (ML) estimado a partir de 617 posições de nucleotídeos do espaçador interno transcrito (ITS) entre os genes 16S e 23S rRNA. Valores de *bootsrtap* são mostrados quando as relações apresentadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros + G + I como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA6. Isolados desse estudo obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas iscas estão mostrados em negrito. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por local.....34
- Figura 7-** Representação do superclado *Bradyrhizobium elkanii*. Filograma *Maximum Likelihood* (ML) estimado a partir de 617 posições de nucleotídeos do espaçador interno transcrito (ITS) entre os genes 16S e 23S rRNA. Valores de *bootsrtap* são mostrados quando as relações apresentadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros + G + I como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA6. Isolados desse estudo obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas iscas estão mostrados em negrito. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por local.....35
- Figura 8-** Representação do superclado *Bradyrhizobium japonicum*. Filograma *Maximum Likelihood* (ML) estimado a partir de 371 posições de pares de bases do gene *recA*. Valores de *bootsrtap* são mostrados quando as relações apresentadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo Tamura 3-parâmetros + G + I como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA6. Isolados desse estudo obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas iscas estão mostrados em negrito. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por local...37
- Figura 9-** Representação do superclado *Bradyrhizobium elkanii*. Filograma *Maximum Likelihood* (ML) estimado a partir de 371 posições de pares de bases do gene *recA*. Valores de *bootsrtap* são mostrados quando as relações apresentadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo Tamura 3-parâmetros + G + I como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA6. Isolados desse estudo obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas iscas estão mostrados em

negrito. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por local.....39

Figura 10- Filograma *Maximum Likelihood* (ML) estimado a partir de 438 posições de pares de nucleotídeos do gene *nodC*. Valores de *bootsrtap* são mostrados quando as relações apresentadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo Tamura 3-parâmetros + G + I, como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA6. Isolados desse estudo obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas iscas estão mostrados em negrito. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por local. * *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11^T (EU597844); *Bradyrhizobium rifense* CTAW71^T (EU597853); *Bradyrhizobium canariense* BTA 1^T (AJ560653); *Bradyrhizobium neotropiale* BR 1024^T (KJ661727); *Bradyrhizobium ganzhouense* RITF806^T (JX292035); *Bradyrhizobium iriomotense* EK05^T (AB301000); *Bradyrhizobium manausense* BR 3351^T (KF786002); *Bradyrhizobium stylosanthis* BR 446 (KU724160); *Bradyrhizobium ingae* BR 10250^T (KF927054); *Bradyrhizobium liaoningense* LMG 18230^T (GU263466); *Bradyrhizobium jicamae* PAC68^T (AB573869); *Bradyrhizobium lablabi* CCBAU 23086^T (GU433565); *Bradyrhizobium paxllaeri* LMTR 21^T (KF896160); *Bradyrhizobium icense* LMTR 13^T (KF896159); *Bradyrhizobium retamae* Ro19^T (KC247112); *Bradyrhizobium valentinum* LmjM3^T (JX514897).....41

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
μL	Microlitro
μm	Micrometro
ARA	<i>Acetylene Reduction Assay</i> (ensaio de redução de acetileno)
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetro
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
G	Gramma
ITS	<i>Intergenic transcribed space</i> (espaçador interno transcrito)
L	Litro
M	Metro
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mV	Milivolt
N	Nitrogênio
N ₂	Gás nitrogênio
Nmol	Nanomol
nt	Nucleotídeo
°C	Grau Celsius
RCF	<i>Relative centrifugal force</i> (força centrífuga relativa)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
V	Volts
YMA	<i>Yeast Mannitol Agar</i> (ágar de manitol de levedura)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO GERAL.....	2
2.1 Objetivos Específicos.....	2
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1 Cana-de-açúcar.....	3
3.2 Compartimentos Onde as Bactérias se Localizam no Solo.....	4
3.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	6
3.4 Bactérias Associadas às Plantas.....	7
3.4.1 Gênero <i>Bradyrhizobium</i>	9
3.4.2 <i>Bradyrhizobium</i> em Gramíneas (<i>Poaceae</i>).....	9
3.5 Método para Avaliar a Densidade Microbiana nas Amostras.....	10
3.6 Métodos Moleculares para Avaliar a Diversidade Microbiana.....	11
3.6.1 Técnicas de <i>fingerprint</i>	11
3.6.2 Análise filogenética.....	12
3.6.2.1 Estudo do operon ribossomal.....	12
3.6.2.2 Genes <i>housekeeping</i>	12
3.6.2.3 Genes simbióticos.....	13
3.6.2.3.1 Gene <i>nifH</i>	13
3.6.2.3.2 Gene <i>nodC</i>	13
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Localização da Área de Coleta.....	14
4.2 Coleta de Raízes e Rizosfera.....	15
4.3 Obtenção de Diluições Seriadas de Extratos de Rizosfera e Endosfera.....	16
4.4 Inoculação de Extratos de Rizosfera e Endosfera na Planta Isca Feijão-caupi.....	16
4.5 Coleta dos Nódulos e Isolamento.....	18
4.6 Caracterização Genética.....	19
4.6.1 Extração de DNA.....	19
4.6.2 Eletroforese em gel e fotodocumentação.....	19

4.6.3 PCR.....	20
4.6.4 Sequenciamento de DNA.....	20
4.6.5 Análise das sequências dos genes.....	20
4.7 Ensaio de Redução de Acetileno.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Densidade de Rizóbios nas Amostras.....	24
5.2 Isolados Obtidos.....	26
5.3 Características Morfoculturais.....	27
5.4 Agrupamento Genético por meio de BOX PCR.....	28
5.5 Caracterização Genética de Isolados Representativos.....	32
5.6 Análise Filogenética.....	33
5.6.1 Análise filogenética da região ITS.....	33
5.6.2 Análise filogenética do gene <i>recA</i>	36
5.6.3 Análise filogenética do gene <i>nodC</i>	40
5.7 Ensaio de Redução de Acetileno.....	42
6 CONCLUSÕES.....	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
8 ANEXOS.....	62

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das culturas de grande importância econômica mundial devido à produção de energia sustentável, diminuindo a emissão de gases do efeito estufa através da produção do etanol que é um biocombustível alternativo aos combustíveis fósseis e através da utilização da biomassa na queima da palha e do bagaço gerados da cana para gerar energia.

No Brasil, a cultura da cana torna-se de grande importância econômica devido à produção de etanol e de açúcar. Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana, tendo como produção estimada para a safra 2016/2017 de 694,5 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (CONAB, 2016).

Em algumas áreas do Brasil a cana tem sido cultivada continuamente por mais de 100 anos sem a utilização de fertilizante nitrogenado, indicando a possível fixação biológica de nitrogênio (FBN) nestes sistemas (NEYRA; DÖBEREINER, 1977). Com isso, foram aplicados métodos de redução de acetileno para verificar a atividade da nitrogenase (DÖBEREINER et al., 1972) e métodos de balanço de nitrogênio (N) e isótopos de ¹⁵N para quantificar a contribuição da FBN em diferentes variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil (URQUIAGA et al., 1992; BODDEY et al., 1995).

Como consequência destes estudos, várias espécies de bactérias diazotróficas endofíticas foram isoladas da cana-de-açúcar e utilizadas como uma mistura de cinco espécies como inoculante para esta cultura (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) (OLIVEIRA et al., 2006).

Estudos utilizando métodos independentes de cultivo baseados na abundância de filotipos de gene *nifH* e de RNA mensageiro em cana-de-açúcar em diferentes países, apresentaram similaridade de filotipos com *Bradyrhizobium* spp. e *Rhizobium* spp. (ANDO et al., 2005; BURBANO et al., 2011; THAWEENUT et al., 2011; FISCHER et al., 2012), indicando que representantes desses gêneros são possivelmente endofíticos em cana-de-açúcar. No entanto, até recentemente, bactérias do gênero *Bradyrhizobium* não tinham sido isoladas de cana-de-açúcar, embora representantes desse gênero foram isoladas de outras não leguminosas como arroz (YANNI et al., 1997; CHAINTREUIL et al., 2000).

Rouws e colaboradores (2014), utilizando diferentes estratégias de cultivo, relataram pela primeira vez o isolamento de *Bradyrhizobium* sp. endofíticos de raízes de cana-de-açúcar cultivar BR867515. No entanto, na ocasião não avaliaram a densidade destas bactérias nos tecidos vegetais, tampouco avaliaram a importância do genótipo vegetal sobre a sua presença.

O que impulsionou a realização desse trabalho foi o relato de espécies do gênero *Bradyrhizobium* como endofíticas em cana-de-açúcar (ROUWS et al., 2014) e a necessidade de maior compreensão da interação entre essas bactérias e a cana-de-açúcar para estudo da utilização das espécies do gênero *Bradyrhizobium* como possível inoculante para otimizar o desenvolvimento e produção dessa cultura no Brasil.

2. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral, compreender melhor a ocorrência de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* em tecidos de raízes de cana-de-açúcar e em sua rizosfera em relação ao genótipo da planta.

2.1 Objetivos Específicos

- 1- Quantificar a densidade de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* nos tecidos internos (endosfera) e na rizosfera de duas cultivares de cana-de-açúcar;
- 2- Avaliar o efeito da cultivar sobre a composição populacional dos rizóbios do gênero *Bradyrhizobium* na endosfera e na rizosfera de duas cultivares de cana-de-açúcar;
- 3- Comparar a composição genética das populações das bactérias do gênero *Bradyrhizobium* encontradas como endofíticas e na rizosfera de duas cultivares de cana-de-açúcar.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum* spp., é uma planta alógama, pertencente à família *Poaceae* (REIS et al., 2007; RAMOS, 2014). Sua atual classificação é: Divisão *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida*, Ordem *Poales*, Família *Poaceae*, Sub-família *Panicoideae*, Tribo *Andropogoneae*, Sub-tribo *Saccharinae*, Gênero *Saccharum* e Espécies como *Saccharum officinarum*; *Saccharum spontaneum*; *Saccharum sinense*; *Saccharum barberi*; *Saccharum robustum*; *Saccharum edule*, *Saccharum villosum* e *Saccharum asperum* (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; MENDES, 2015).

A cana tem sua origem determinada no Sudeste da Ásia nas regiões compreendidas entre Indonésia e Nova Guiné (MENEDES, 2015), as primeiras mudas chegaram ao Brasil por volta de 1515 vindas da ilha da Madeira (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Esta planta pode ser cultivada em regiões temperadas e tropicais e em diversos tipos de solos (ANTUNES, 2016).

Seu cultivo é de grande importância para o setor econômico desde a colonização do Brasil, onde foi a primeira atividade agrícola (PERIN et al., 2007) e uma das principais economias do país nesse período. O potencial de produção e o papel fundamental da cana-de-açúcar e seus subprodutos, tanto do ponto de vista agrícola, quanto industrial, fazem essa cultura ser de incontestável importância para o Brasil (RAMOS, 2014), que atualmente ocupa o posto de líder de produção de açúcar e álcool, assim como lidera a exportação desses produtos (CONAB, 2016).

A cana-de-açúcar também possui grande importância no ponto de vista ambiental devido à produção de etanol, um biocombustível alternativo aos combustíveis fósseis (SILVA et al., 2013) e através da utilização da biomassa, utilizando a queima da palha e do bagaço gerados da cana para gerar energia (DANTAS, 2010), diminuindo assim, a emissão de gases do efeito estufa (SANTOS, 2014).

De acordo com as previsões para a safra de 2016/2017 dadas pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016), a produção estimada para essa safra será de 694,5 mil toneladas de cana-de-açúcar e a área colhida no Brasil destinada à atividade sucroalcooleira deverá ser de 9.110,9 mil hectares. A produção de açúcar está estimada em 39.814,8 mil toneladas e estima-se 368.059,5 mil toneladas de cana-de-açúcar destinada para produção de etanol.

A cana-de-açúcar obtém até 70% do total de nitrogênio da planta vindo do nitrogênio atmosférico através da fixação biológica de nitrogênio (LIMA et al., 1987; URQUIAGA et al., 1992; BODDEY et al., 1995; YONEYAMA et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2002) e se destaca de outras não leguminosas comparando a eficiência de FBN (DÖBEREINER, 1997).

A cana-de-açúcar associa-se com várias bactérias promotoras de crescimento vegetal que colonizam a rizosfera e o interior dos tecidos dessas plantas, sendo as bactérias de vida livre e as de rizosfera as primeiras a serem isoladas nessa planta (PEDRAZA, 2008; PEREIRA, 2011). Ocupam lugar de destaque as espécies *Azospirillum* sp. (REIS JUNIOR et al., 2000), *Herbaspirillum seropedicae* (MARIN et al., 1999), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (ANTÔNIO, 2010), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BALDANI et al., 1997, 2014; PERIN et al., 2004), *Burkholderia tropica* (REIS et al., 2004; PERIN, 2007) e recentemente Rouws e colaboradores (2014) isolaram bactérias do gênero *Bradyrhizobium* como endofíticas nas raízes da cana-de-açúcar.

3.2 Compartimentos Onde as Bactérias se Localizam no Solo

As bactérias são encontradas na rizosfera (Figura 1), no rizoplano, no interior dos tecidos das plantas e na fração de solo que não sofre influência direta das plantas (em inglês: *bulk soil*) localizada fora da rizosfera (BOWEN; ROVIRA, 1999; BARILLOT et al., 2013; DALY et al., 2015, 2016).

A região do solo que é influenciada diretamente pelas raízes das plantas é conhecida como rizosfera. O tamanho da rizosfera pode variar de 1 mm a 5 mm a partir da raiz de acordo com o tipo de planta, o tipo de raiz e o tipo de solo, assim como a alocação de nutrientes pela planta (ZELENEV et al., 2005; BARILLOT et al., 2013).

A rizosfera é uma região onde ocorre uma intensa atividade química e biológica influenciada pela liberação de água e compostos orgânicos denominados de exsudatos como ácidos orgânicos, proteínas, aminoácidos, carboidratos, vitaminas e mucilagem, os quais formam um conjunto de substâncias conhecido como rizodepósito, cuja função é estimular as interações físicas e biológicas entre raízes e micro-organismos (HARTMANN et al., 2009; HUANG et al., 2014; YORK et al., 2016).

Os exsudatos radiculares podem variar em sua composição de acordo com a espécie da planta e/ou as condições do ambiente como, tipo de substrato, características químicas do solo, temperatura, concentração de CO₂ e condições de luminosidade (PII et al., 2015). De acordo com estimativas de Moreira e Siqueira (2006), para um grama de raiz são produzidos 10 a 100 mg de exsudatos, 100 a 250 mg de material solúvel e 20 a 50 mg de mucilagem, mucigel e células mortas. Por essa disponibilidade de nutrientes é encontrado um maior número de micro-organismos na rizosfera em comparação com o *bulk soil* (HINSINGER et al., 2009; BARILLOT et al., 2013).

Segundo Chaparro et al. (2014) as plantas mantêm uma quantidade de rizomicrobioma, o qual está relacionado às diferentes funções e estágios de desenvolvimento da planta, ao mesmo tempo separam determinados grupos de micro-organismos durante seus diferentes estágios do crescimento, provavelmente para exercerem funções específicas que nem todos os micro-organismos poderiam como a fixação biológica de nitrogênio e a antibiose contra patógenos por exemplo, e os exsudatos são diferencialmente produzidos durante o crescimento da planta direcionando tais atividades.

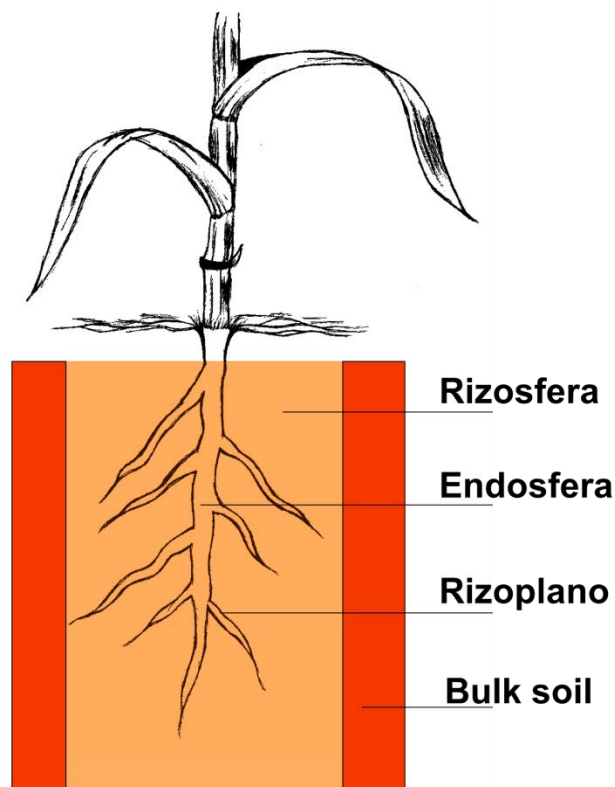


Figura 1. Localização de rizosfera, endosfera, rizoplano e *bulk soil* no solo e raiz da cana-de-açúcar. Desenhado por Peter S. Medeiros.

Durante vários anos os componentes da rizosfera incluindo o solo, os micro-organismos e as plantas foram estudados de forma separada. Entretanto, através do conhecimento propiciado pela emergência das ferramentas moleculares, estudos mais recentes com uma abordagem ecológica tem favorecido uma melhor compreensão do complexo ambiente que é a rizosfera onde plantas e micro-organismos são analisados em conjunto, não mais separadamente (DESSAUX et al., 2016).

O *bulk soil*, solo também referido como não rizosférico, é um ambiente que possui diferença física, química e biológica da rizosfera (BOWEN; ROVIRA, 1999). As bactérias localizadas no *bulk soil* sobrevivem com a escassez de nutrientes essenciais para sua sobrevivência, fato evidenciado provavelmente pela maior umidade encontrada na rizosfera onde ocorre a formação de uma bainha coerente de solo permeado por mucilagem e pêlos radiculares, conhecido como revestimento da raiz, (do inglês: *rhizosheath*) (YORK et al., 2016).

Se retirarmos o solo em volta das raízes de uma planta coletada de um vaso ou diretamente do solo, podemos verificar que ainda ficam detritos ou partículas de solo fortemente aderidos à sua superfície externa, essa camada de solo é definida como rizoplano, termo introduzido por Clark (1949), delimitando entre a superfície da raiz e a rizosfera, em cerca de 1 mm de espessura (YORK et al., 2016).

Esses dimensionamentos da rizosfera e do rizoplano foram definidos para facilitar o estudo dessas regiões, porém é difícil identificar o real limite entre elas (BARILLOT et al., 2013). Outro sítio onde as bactérias podem estar presentes seria a endosfera, região localizada no interior das plantas como caule, folhas e raiz (BECKERS et al., 2017).

3.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O Nitrogênio (N) está presente nos aminoácidos, nas proteínas, nas enzimas, DNA, RNA e na clorofila, tornando-se um dos principais macronutrientes para os seres vivos. Todos os processos vitais nas plantas necessitam de proteínas, das quais o Nitrogênio é um constituinte essencial (LEGHARI et al., 2016). Na atmosfera, ele se encontra na forma de nitrogênio (N_2), que é o gás mais abundante na atmosfera da Terra (HAAG et al., 2013).

A maior parte do N estocado no solo é através de processos bióticos (como o ciclo do N) associados com a produtividade das plantas e decomposição de matéria orgânica (POST et al., 1985).

O N é disponibilizado à planta via atmosfera através da ação de raios e relâmpagos que liberam uma alta quantidade de energia para separar os átomos de N da molécula de N_2 , assim, o N se liga com o oxigênio na atmosfera formando óxidos de N, podendo ser então transportados para os ecossistemas terrestres juntamente com a água da chuva (DRAPCHO et al., 1983).

Uma segunda forma de disponibilizar N é por via industrial (processo Haber-Bosch), sendo um processo com elevado custo energético o qual utiliza combustíveis fósseis, gás natural e petróleo para seu funcionamento e através de altas temperaturas e pressão reduz o nitrogênio em amônia (HERRIDGE et al., 2008; ROUWS et al., 2015; HUNGRIA et al., 1997). Esse processo consome mais de 1% do total de produção mundial de energia e emite mais de 300 milhões de toneladas métricas de dióxido de carbono tornando-se um processo poluidor (CHERKASOV et al., 2015).

Apesar disso, foi por meio desta via industrial que a agricultura moderna se desenvolveu, juntamente com a aplicação de outros fertilizantes, corretivos e melhoramento genético de plantas (SPIERTZ, 2010; BISWAS; GRESSHOFF, 2014). Contudo, sabe-se que a produção e aplicação de fertilizantes nitrogenados consomem enormes quantidades de energia, e o excesso pode torna-se prejudicial ao ambiente devido à lixiviação do nitrato poluindo as águas e o solo e à emissão de óxido nitroso para a atmosfera (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010; SPIERTZ, 2010; SHRIDHAR, 2012).

Atualmente, a eficiência do uso do N tem sido essencial para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, onde, a aquisição e a assimilação de N pelas plantas são ações governadas por fatores de interações genéticas e ambientais (XU et al., 2012).

A terceira forma de disponibilização de nitrogênio é através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo em que bactérias que possuem o complexo enzimático nitrogenase, em temperatura e pressão ambiente retiram da atmosfera o N_2 que está em uma forma que não pode ser utilizada pelas plantas, quebrando a tripla ligação de ponte de hidrogênio dessa molécula e a transforma em amônia (NH_3), podendo esta forma ser utilizada pelas plantas (LAM et al., 1996; DIXON; KAHN, 2004; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; FRANCHE et al., 2009; CHERKASOV et al., 2015).

A FBN, depois da fotossíntese, é provavelmente o processo biológico mais importante no mundo (UNKOVICH et al., 2008), disponibilizando N assimilável para as plantas e fazendo parte essencial do ciclo do N repondo o teor global de nitrogênio da biosfera e compensando as perdas de N que ocorrem na desnitrificação (DIXON; KAHN, 2004; XU et al., 2012).

Visto que o N_2 atmosférico é um recurso renovável, a FBN em sistemas agrícolas é uma fonte sustentável de N em sistemas de cultivo, além de não poluir o ar, o solo, as águas e o alimento como acontece com o excesso de adubos nitrogenados (BOHLOOL et al., 1992; JENSEN; HAUGGAARD-NIELSEN, 2003; SPIERTZ, 2010). Por consequência, a FBN entrou como uma das linhas temáticas a serem promovidas visando à mitigação de gases de

efeito estufa dentro do Plano ABC do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2010), comprovando a sua importância para a agricultura brasileira.

A fixação biológica de Nitrogênio pode ser quantificada através de métodos como balanço total de N, quantificação de ^{15}N e através da atividade da nitrogenase pelo ensaio de redução de acetileno (*Acetylene Reduction Assay-ARA*) (HERRIDGE et al., 2008). O método ARA é baseado na capacidade da nitrogenase de reduzir, além do N_2 o gás acetileno (C_2H_2) formando etileno (C_2H_4), uma molécula identificável e quantificável por cromatografia gasosa. (DILWORTH, 1966; HARDY et al. 1968, 1973). O ensaio de redução de acetileno é um método rápido, simples e sensível para medir a fixação de nitrogênio sendo mais simples que os outros métodos utilizados para esse fim (BODDEY; KNOWLES 1987; RICE; PAUL, 1971).

3.4 Bactérias Associadas às Plantas

As bactérias estão frequentemente em associação com as plantas, estabelecendo interações neutras, negativas ou positivas e colonizando a rizosfera, rizoplano e tecidos internos destas plantas (MARELLA, 2014; PII et al., 2015). Estas bactérias exercem o papel como promotoras de crescimento vegetal através da fixação biológica de nitrogênio ou utilizando outros mecanismos de promoção de crescimento (SANTOYO et al., 2016).

As bactérias capazes de FBN denominadas como diazotróficas (CARVALHO et al., 2014), são organismos que possuem representantes dos Domínios *Eubacteria* e *Archaea* (WIDMER et al., 1999; ZEHR et al., 2003; GAGE, 2004).

As bactérias diazotróficas de vida livre fixam o nitrogênio atmosférico independente de outros organismos (ASIS JR. et al., 2004). Este grupo de bactérias é encontrado na superfície das plantas e de suas folhas, na serapilheira, na madeira em decomposição e no solo (REED et al., 2011). Um exemplo é a espécie *Beijerinckia fluminenses*, encontrada na rizosfera de cana-de-açúcar (NEYRA; DÖBEREINER, 1977).

As bactérias diazotróficas de vida livre também atuam como promotoras de crescimento vegetal, assim como, algumas dessas bactérias são capazes de excretar subprodutos de fixação de N_2 , tais como aminoácidos (GONZALEZ-LOPEZ et al., 1983; PATI et al., 1994; SHRIDHAR, 2012).

As bactérias diazotróficas encontradas em associação com plantas são denominadas bactérias diazotróficas associativas, que auxiliam no crescimento da planta sem estabelecer simbiose e nesse caso não há formação de nódulos (ELMERICH, 2007; SANTI et al., 2013). Estas bactérias colonizam a rizosfera das plantas não leguminosas e tipicamente não invadem seus tecidos internos (MUS et al., 2016). Um gênero que representa esse grupo é *Azospirillum* e estas bactérias são encontradas em forrageiras e cereais como arroz, milho, sorgo, cana-de-açúcar (MARIN et al., 1999).

As bactérias denominadas endofíticas colonizam os tecidos internos de plantas vivas sem apresentar sinais externos de infecção e sem causar sintomas de doenças em todo seu ciclo de vida ou em parte dele (RYAN et al., 2008; HARDOIM et al., 2008). Estas bactérias podem infectar suas hospedeiras inicialmente no rizoplano, sendo o principal local de iniciação de infecção nas raízes laterais emergentes e seguindo no interior das raízes, caule, bainha foliar e folhas (HALLMANN et al., 1997; CHI et al., 2005; HARDOIM et al., 2008).

A colonização do interior da raiz garante uma vantagem em relação às bactérias que colonizam a rizosfera por ser um nicho mais específico, dessa forma, estão protegidas do excesso de oxigênio que é capaz de inibir a ação da enzima nitrogenase (GOLDING; DONG, 2010). Com essa especificidade, diminui bastante a competição por nutrientes com bactérias do solo e estão mais protegidas de mudanças adversas no ambiente (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; BHATTACHARJEE et al., 2008). Como exemplo de bactérias endofíticas

isoladas na cana-de-açúcar podem ser citadas *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Gluconacetobacter* sp. e *Burkholderia* sp. (BALDANI et al., 1997; REIS et al., 2004).

As bactérias endofíticas beneficiam o crescimento e desenvolvimento da planta hospedeira atuando como promotoras de crescimento vegetal, proteção contra patógenos e contra herbivoria de artrópodes (BHATTACHARJEE et al., 2008; HARDOIM et al., 2015).

Outra forma de beneficiar suas hospedeiras é observada em bactérias endofíticas que colonizam os tecidos internos de plantas da família *Poaceae*, em associação com essas plantas, são capazes de fixar nitrogênio e são denominadas diazotróficas endofíticas (DÖBEREINER, 1992; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; BALDANI; BALDANI, 2005). Algumas bactérias representantes desse grupo são: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica* (BODDEY, 1995; REIS JUNIOR et al., 2000; REIS et al., 2004).

Devido aos benefícios proporcionados para as plantas hospedeiras através da associação com bactérias endofíticas, tornou-se importante a utilização destas bactérias no desenvolvimento de uma agricultura sustentável (BHATTACHARJEE et al., 2008; MILIUTE et al., 2015).

Diferente das bactérias diazotróficas endofíticas, as bactérias diazotróficas simbióticas (endosimbiontes) estabelecem uma interação muito estreita entre bactéria e hospedeiro formando estruturas diferenciadas denominadas nódulos (OLDROYD; DOWNIE, 2008; DESBROSSES; STOUGAARD, 2011), onde promovem a FBN. Em troca, as plantas fornecem fotossintatos para estas bactérias (SACHS et al., 2011).

Bactérias simbióticas estão presentes no filo α -*Proteobacteria* encontradas nos gêneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium* e *Ensifer* associadas com plantas leguminosas (família *Fabaceae*) e são conhecidas como rizóbios (HARDOIM et al., 2015; OKUBO et al., 2016). E também encontradas no filo β -*Proteobacteria* em alguns representantes dos gêneros *Burkholderia* e *Cupriavidus*. (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2001). Assim como, em *Actinobacteria* no gênero *Frankia* associada com plantas não leguminosas (FRANCHE et al., 2009; SANTI et al., 2013).

A infecção ocorre através da indução e formação de nódulos nas raízes de suas hospedeiras, iniciando o processo com a fixação da bactéria na superfície dos pelos radiculares, após trocas de sinais com o hospedeiro a bactéria é capturada devido ao encurvamento do pelo radicular e em seguida inicia-se a formação do cordão de infecção (DIXON; KHAN, 2004; SACHS et al. 2009; HARDOIM et al., 2015). Através dessa rota o cordão de infecção invade o córtex interno das raízes e este sofre divisões celulares, formando os nódulos (OLDROYD et al., 2011).

As plantas controlam a entrada de oxigênio nas células dos nódulos através de uma barreira difusora de oxigênio que permite reagirem com a disponibilidade de oxigênio na rizosfera (HAAG et al., 2013). A quantidade de oxigênio no interior das células dos nódulos infectados é controlada pela proteína leghemoglobina que tem a função de reduzir o oxigênio livre na região de fixação de nitrogênio do nódulo (OTT et al., 2005; HAAG et al., 2013).

LÖHNIS e HANSEN (1921) sugeriram inicialmente a divisão dos rizóbios em grupos de acordo com a velocidade de crescimento em meio de cultura agarizado. Estas bactérias são divididas entre as bactérias de crescimento rápido (*Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*), as de crescimento intermediário (*Mesorhizobium*) e as de crescimento lento (*Bradyrhizobium*) (MARIN et al., 1999).

Nesse contexto, o gênero *Bradyrhizobium* tem se destacado pela sua capacidade de interação com a soja (*Glycine max*), uma cultura de grande importância econômica, através da

indução de nódulos e uma eficiente fixação de nitrogênio (HUNGRIA et al., 1998; YU et al., 2014).

3.4.1 Gênero *Bradyrhizobium*

Segundo Jordan (1982), o nome *Bradyrhizobium* tem origem do prefixo *bradus* que significa lento, indicando sua característica de crescimento lento em meio de extrato de manitol. Cresce em torno de 5 ou 7 dias incubadas em temperatura entre 25 e 30 °C e alcaliniza este meio (JORDAN, 1982).

De acordo com Tortora e colaboradores (2005) o gênero *Bradyrhizobium* está localizado no Domínio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, classe Alfa-*Proteobacteria*, Ordem *Rhizobiales* e Família *Bradyrhizobiaceae* (GARRITY et al., 2005).

Antes dos anos 80, o gênero *Rhizobium* era dividido em dois grupos, de crescimento rápido e crescimento lento, contendo um representante neste último grupo a espécie *Rhizobium japonicum* (JORDAN, 1982; HUNGRIA et al., 2015). Entretanto, a taxonomia foi redefinida usando critérios numéricos, incluindo várias propriedades morfofisiológicas e genéticas (DELAMUTA et al., 2013). Como consequência, o grupo de crescimento lento foi nomeado como gênero *Bradyrhizobium* e a espécie *Rhizobium japonicum* transferida para o novo gênero e renomeada como *Bradyrhizobium japonicum* (JORDAN, 1982). E posteriormente, algumas estirpes foram separadas desta nova espécie e nomeadas como *Bradyrhizobium elkanii* (KUYKENDALL et al., 1992), subdividindo as estirpes deste gênero nestas duas espécies (HUNGRIA et al., 1998).

O gênero *Bradyrhizobium* possui diversas bactérias que realizam diferentes papéis e colonizam diferentes plantas hospedeiras, incluindo estirpes não simbióticas (RIVAS et al., 2004; WILLEMS, 2006; MENNA et al., 2009a; SACHS et al., 2010; TERAOKA-TONOOKA et al., 2013; GOPALAKRISHNAN et al., 2015; JONES et al., 2016).

O gênero *Bradyrhizobium* contém uma grande diversidade de estirpes (WILLEMS et al., 2003) que possuem capacidade de interação com as leguminosas (família *Fabaceae*), como soja (*Glycine max.*) (JORDAN, 1982), feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (ZILLI et al., 2006) e siratro (*Macroptilium atropurpureum*) (WOOMER et al., 1988), possuindo elevada eficiência na FBN com estas plantas (BHATTACHARJEE et al., 2008).

Jones e colaboradores (2016) relataram duas estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas do solo de pastagem e de pousio que possuem a característica de vida livre, não são diazotróficas e tem o potencial de realizar muitas funções degradativas e transformadoras no solo.

Algumas espécies de *Bradyrhizobium* são fotossintetizantes que colonizam raiz e nódulos de caule da leguminosa da espécie *Aeschynomene indica* (MOLOUBA et al., 1999; OKUBO et al., 2012). Assim como, Chaintreuil e colaboradores (2000) isolaram estirpes de *Bradyrhizobium* endofítica fotossintetizante na raiz de arroz (*Oryza breviculata*), uma planta representante da família *Poaceae*.

Estirpes de *Bradyrhizobium* endofíticas foram isoladas de raiz, folhas e caule na superfície da batata-doce (*Ipomoea batatas*) (TERAKADO-TONOOKA et al., 2013) e em deformações como tumores na beterraba (*Beta vulgaris*) (RIVAS et al., 2004).

3.4.2 *Bradyrhizobium* em Gramíneas (*Poaceae*)

Em não leguminosas (família *Poaceae*), métodos independentes de cultivos, aplicando sequenciamento de bibliotecas de amplicons de gene *nifH*, têm sugerido que bactérias do gênero *Bradyrhizobium* fazem parte da comunidade diazotrófica associadas às famílias de milho (*Zea mays*) (ROESCH et al., 2008) e sorgo (*Sorghum bicolor*) (COELHO et al., 2008). *Bradyrhizobium* spp. também foram isolados de raízes de arroz (*Oryza sativa*) por diferentes pesquisadores no Senegal e no Egito e experimentos de inoculação mostraram que estas

bactérias promovem o crescimento dessa planta (YANNI et al., 1997; CHAINTREUIL et al., 2000). Para cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), grupos de pesquisa independentes usaram sequenciamento de bibliotecas de cDNA de gene *nifH* obtidos de raízes de cana no intuito de investigar grupos de bactérias associativas ativos em FBN (THAWEENUT et al., 2011; FISHER et al., 2012). Ambos os estudos encontraram filotipos de cDNA de *nifH* relacionados ao gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* indicando um papel para essas bactérias em FBN associativas em cana-de-açúcar. Com base nesses conhecimentos Rouws e colaboradores (2014) aplicaram estratégias diferentes de cultivo para isolar *Bradyrhizobium* de raízes de cana-de-açúcar em Seropédica, RJ, Brasil. Este trabalho permitiu a obtenção de 109 isolados geneticamente diversos de *Bradyrhizobium* spp. Alguns dos quais apresentaram atividade de nitrogenase em condições *in vitro*, confirmando uma relevância potencial dessas bactérias no processo de FBN ou em promoção de crescimento em cana-de-açúcar.

Matos et al. (2015) observaram que uma estirpe de *Bradyrhizobium* (P9-20) isolada de raízes de cana-de-açúcar da cultivar RB867515 do estudo de Rouws et al. (2014) tem potencial como promotora de crescimento vegetal, induzindo maiores taxas de crescimento radicular em mini-toletes de cana-de-açúcar.

Bradyrhizobium spp. em associação com a cana-de-açúcar se encontram fora dos nódulos por motivo dessa planta não formar essas estruturas. Torna-se necessário avaliar a capacidade dessas bactérias de fixar nitrogênio fora dos nódulos, podendo ser avaliada através do ensaio da redução de acetileno (ROUWS et al., 2014).

Os possíveis motivos que influenciam o isolamento de *Bradyrhizobium* spp. de cana-de-açúcar são: um inóculo possuindo bactérias de crescimento rápido e de crescimento lento, haveria a inibição das bactérias de crescimento lento pelas bactérias de crescimento rápido quando isoladas (DAVIS et al., 2011); ou utilização de um meio de cultura adequado para a sobrevivência da espécie a ser isolada (BALDANI et al., 2014).

3.5 Método para Avaliar a Densidade Microbiana nas Amostras

A densidade é definida como o número de indivíduos de uma população por unidade de área ou de volume e abundância se refere ao número de indivíduos (TOKESHI, 1993; ODUM, 1988).

E para estimar a quantidade de bactérias de uma amostra coletada em um ambiente onde os micro-organismos são encontrados de uma forma muito heterogênea, dificultando a contagem, como em amostras de solo ou na rizosfera de plantas (WOOMER, 1994) é utilizada a técnica de Número Mais Provável (NMP).

O conceito dessa técnica iniciou com McCrady (1915) e para rizóbios tem como base a inoculação de uma leguminosa hospedeira específica (planta isca) com alíquotas de diluições seriadas de uma amostra (VINCENT, 1970; ANDRADE; HAMAKAWA, 1994; WOOMER, 1994), onde o crescimento dessas plantas ocorre em ambiente controlado. Existindo pelo menos uma única célula de rizóbio a planta será infectada e haverá formação de nódulos. A estimativa de células de rizóbios viáveis é feita através da proporção dessas plantas iscas que formaram nódulos (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994). O resultado de número de plantas que apresentaram nodulação em cada nível (VINCENT, 1970; WOOMER, 1994) são registrados e comparados em tabelas de modelos matemáticos desenvolvidos inicialmente por Halvorson e Ziegler (1933) e com contribuições de Cochran (1950) com procedimentos de estimativa de erros e limites de confiança. Estas tabelas apresentam as taxas de diluições e número de réplicas com seus respectivos valores estimados do número mais provável. Vincent (1970); Woome e colaboradores (1990); Andrade e Hamakawa (1994); Woome (1994) indicam fontes de várias tabelas de NMP que podem ser utilizadas de acordo com o experimento.

Como planta isca é indicado o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) por ser uma planta com perfil de nodulação promíscua formando nódulos na presença de uma grande diversidade de rizóbios, principalmente do gênero *Bradyrhizobium* (ZILLI et al., 2006, 2009), podendo ser cultivadas em vasos Leonard ou tubos de ensaio com solução agarizada inclinada (VINCENT, 1970) ou em recipientes de vidro contendo solução nutritiva (FLORENTINO; MOREIRA, 2009).

3.6 Métodos Moleculares para Avaliar a Diversidade Microbiana

O primeiro relato de observação de um micro-organismo vivo foi em 1673, pelo holandês Antonie van Leeuwenhoek com a utilização de lentes de aumento (TORTORA et al., 2005). Van Leeuwenhoek além de observar, fazia anotações e desenhos desses organismos. Nesses desenhos, ele registrava as formas das bactérias, assim como seus movimentos, iniciando assim, a microbiologia e a caracterização de micro-organismos.

Os micro-organismos eram classificados através de métodos convencionais que dependem do isolamento, do cultivo em meios apropriados e da caracterização estrutural, morfológica, tintorial, fisiológica, bioquímica e sorológica (VERMELHO et al., 2007). Esses métodos podem resultar em identificação errônea dos isolados (BARCELLOS; HUNGRIA, 2010).

As taxas de erros na classificação de bactérias com os métodos convencionais foram diminuindo através de análises filogenéticas que iniciaram entre as décadas de 1980 e 1990 com utilização das técnicas de biologia molecular, iniciando com a PCR.

A técnica PCR (*polymerase chain reaction*- reação em cadeia da polimerase) permite amplificar específicos fragmentos do genoma para a obtenção de várias cópias de determinada região do DNA. Com isso, a PCR se torna uma reação específica, amplificando uma sequência alvo de nucleotídeo mesmo em uma amostra com grande diversidade de sequências (REIS JUNIOR et al., 2002). A especificidade na amplificação da sequência de DNA de determinado micro-organismo é obtida através de oligonucleotídeos específicos conhecidos como *primers* (sequências iniciadoras) que complementam aquelas localizadas em locais de interesse do genoma (LOUREIRO, 1994). Com a ação da *Taq* DNA polimerase e em ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, repetidos várias vezes em temperaturas adequadas, o fragmento alvo é amplificado de forma exponencial (SAIKI et al., 1985; REIS JUNIOR et al., 2002).

Essas técnicas de biologia molecular tornaram-se amplamente utilizadas para avaliar a diversidade genética dos micro-organismos encontrados no solo. Porém, as características culturais e morfológicas ainda possuem importância nos primeiros passos de identificação de novas taxa de micro-organismos (JESUS, 2005).

3.6.1 Técnicas de *fingerprint*

A caracterização de estirpes pode ser realizada por técnicas baseadas na determinação do perfil de DNA após a amplificação com *primers* relacionados a regiões repetitivas e conservadas do DNA, em geral no espaço intergênico, conhecidas conjuntamente por rep-PCR (*repetitive sequence based PCR*. Sequência baseada em PCR) (VERSALOVIC et al., 1991, 1994; MENNA et al., 2009b). Estas técnicas são REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) (STERN et al., 1984), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) (HULTON et al., 1991) e elementos BOX (MARTIN et al., 1992). A análise de BOX-PCR se destaca entre as outras em virtude de seus resultados apresentarem perfis com maior número de bandas e menor custo na análise, por requerer um único *primer* (MENNA et al., 2009b).

Uma variação da PCR é a BOX PCR, que gera *fingerprints* (impressões digitais) facilitando a identificação de organismos e analisando as divergências genéticas entre elas

(CORDEIRO, 2011). BOX são sequências de DNA altamente conservadas e repetitivas intercaladas ao longo do genoma de um organismo, sendo constituído pelas subunidades BOX A, BOX B e BOX C (MARTIN et al., 1992). Essas subunidades aparecem intercaladas individualmente ou combinadas ao longo do genoma, gerando na PCR tamanhos diferenciados de DNA, criando assim a impressão digital do micro-organismo (KOEUTH et al., 1995). Segundo Liu e colaboradores (2005), a BOX PCR é uma poderosa ferramenta utilizada para avaliar a diversidade genômica em populações bacterianas, mas pode ser incapaz de diferenciar espécies estreitamente relacionadas.

3.6.2 Análise filogenética

Os métodos moleculares são amplamente utilizados nos estudos filogenéticos, seguindo como base as diferenças genéticas entre organismos indicadas através de sequências de nucleotídeos de DNA e RNA e sequências de aminoácidos de proteínas e determinadas por técnicas moleculares (PATWARDHAN et al., 2014).

3.6.2.1 Estudo do operon ribossomal

Muitos estudos fazem do gene 16S rRNA a molécula mais utilizada para traçar filogenia de bactérias (GARRITY; HOLT, 2001; WEISBURG et al., 1991; WOESE, 1987), sendo uma ótima ferramenta para separar bactérias de gêneros diferentes e entre espécies. O gene 16S rRNA possui regiões altamente conservadas que dificultam a separação de bactérias entre organismos com grau de parentesco elevado (EISEN, 1995; WILLEMS et al., 2003). Muito utilizado devido ao elevado grau de conservação das sequências, estar presente em todos os procariontes e existir um vasto banco de dados (EISEN, 1995). A variabilidade desse gene no gênero *Bradyrhizobium* é muito baixa, dificultando uma definição eficiente de espécies (BARCELLOS; HUNGRIA, 2010; DELAMUTA et al., 2012; RIVAS et al., 2009a).

Para detectar essa alta diversidade no gênero *Bradyrhizobium* é utilizada a região ITS (*intergenic transcribed spacer*-espaçador interno transcrito) que se localiza entre os genes 16S e 23S rRNA (DELAMUTA et al., 2012). De acordo com Cardinale e colaboradores (2004), sua utilização é adequada para avaliar a estrutura das comunidades microbianas no ambiente. Apresenta grande variação no comprimento e na sequência, mesmo entre estirpes (WILLEMS et al., 2003). Existem isolados de *Bradyrhizobium* que possuem múltiplos operons de RNA ribossômico que contém regiões espaçadoras intergênicas com grande variabilidade de tamanho e sequência, o que pode dificultar as análises filogenéticas (RIVAS et al., 2009a).

3.6.2.2 Genes *housekeeping*

Os genes *housekeeping* desempenham funções básicas e altamente conservadas e, por isso, são indicados nos estudos filogenéticos para diferenciar estirpes com elevado grau de similaridade que não podem ser detectadas utilizando os operons ribossomais (CHRISTENSEN et al., 2004; RIVAS et al., 2009a).

O gene *housekeeping recA* é um gene que tem papel fundamental na manutenção do DNA (BIANCO; KOWALCZYKOWSKI, 1998), possuindo regiões conservadas evolutivamente e variáveis, indicando ser adequado para separação de organismos com grau de evolução muito próximo (EISEN, 1995), como no gênero *Bradyrhizobium* que possui elevada diversidade genética entre suas estirpes (MENNA et al., 2009a). Além da utilização do gene *recA*, outros genes *housekeeping* (*atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB* e *rpoB*) são frequentemente utilizados no estudo de isolados do gênero *Bradyrhizobium* (RIVAS et al., 2009a).

3.6.2.3 Genes simbióticos

Segundo Aoki e colaboradores (2013), os genes simbióticos são os genes responsáveis pela nodulação (genes *nod*) e os genes relacionados à fixação de nitrogênio (genes *nif*, *fix* e *fdx*). Nas espécies de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* os genes simbióticos são encontrados em plasmídeos simbióticos (pSym). Em algumas espécies de *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* estes genes se localizam em regiões específicas no cromossomo (KANEKO et al., 2000). Os genes simbióticos são amplamente utilizados para estudar a diversidade simbiótica, a fisiologia, a especificidade de hospedeiros e a ecologia de micro-organismos fixadores de nitrogênio (LI et al., 2011).

3.6.2.3.1 Gene *nifH*

O gene *nifH* codifica a enzima dinitrogenase redutase que está envolvida na fixação de N, sendo utilizado como base para identificar micro-organismos diazotróficos (OHKUMA et al., 1999; RIVAS et al., 2009b). Zehr e colaboradores. (2003) relataram a presença do gene *nifH* em micro-organismos localizados nos mais diversos ambientes como lagos, rios, mares abertos, estuários, estromatólitos, charco, solo de floresta, em copépodes marinhos e invertebrados, como no intestino de cupins (isópteros).

Este gene é muito utilizado em estudos relacionados ao gênero *Bradyrhizobium* (LAGUERRE et al., 2001; ANDO et al., 2005; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2006; BURBANO et al., 2011; LI et al., 2011; MENNA; HUNGRIA, 2011; FISCHER et al., 2012).

3.6.2.3.2 Gene *nodC*

Os genes *nod* codificam enzimas envolvidas na síntese do fator Nod, envolvidas na sinalização entre plantas e rizóbios durante a formação de nódulo e infecção através do cordão de infecção (FISHER; LONG, 1992; PERRET et al., 2000).

O gene *nodC* participa da primeira etapa na montagem do fator Nod, codificando a enzima N-acetilglucosamina transferase (GEREMIA et al., 1994). Este gene é utilizado em estudos relacionados ao gênero *Bradyrhizobium* (LAGUERRE et al., 2001; SARITA et al., 2005; LI et al., 2011; MENNA; HUNGRIA, 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

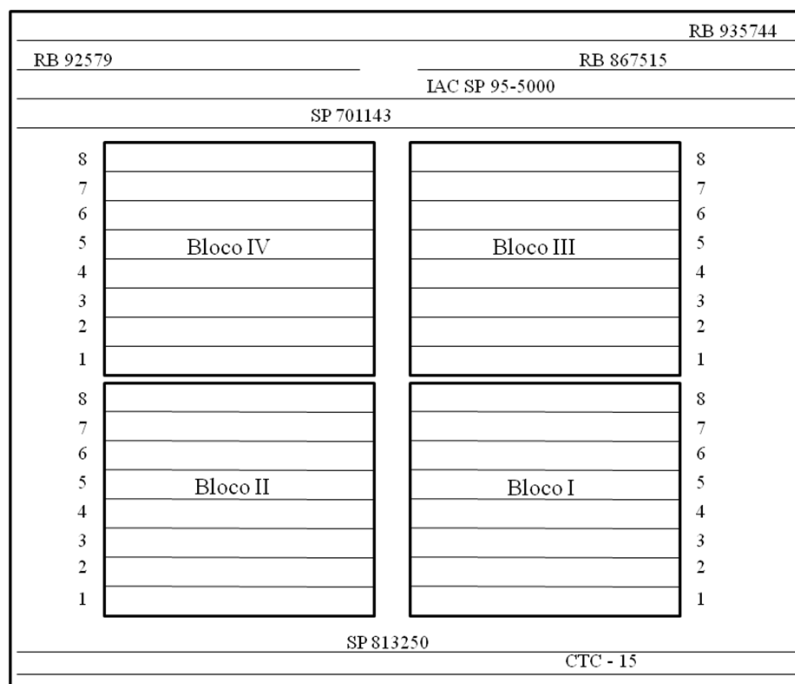
4.1 Localização da Área de Coleta

A área onde foi realizada a coleta das cultivares de cana-de-açúcar RB867515 e IACSP95-5000 pertence ao campo experimental (terraço) da Embrapa Agrobiologia (Figura 2), no município de Seropédica, no Estado do Rio de Janeiro. O clima local é do tipo Aw de acordo com a classificação de Köppen-Geiger (PEEL et al., 2007), com verões chuvosos e invernos secos, temperatura média anual de 24 °C e precipitação média anual de 1.250 mm (ALVES et al., 2010).



Figura 2. Localização do Terraço. Local de coleta destacado. Fonte: Google maps (2017).

A área de coleta com coordenadas S 22°44'53.8'' e O 43°40'15.4'', foi plantada em 12/09/2014 e possui 4 blocos com 8 cultivares diferentes de cana-de-açúcar (Figura 3). O comprimento da parcela é de 6 m e o espaçamento entre as linhas é de 1 m.



Variedades: 1. RB867515 2. RB92579 3. IACSP95-5000 4. RB72454 5. CTC15
6. SP813250 7. SP701143 8. RB935744

Figura 3. Croqui da área de coleta. Fonte: Próprio autor.

As cultivares escolhidas foram RB867515 e IACSP95-5000. As duas cultivares são amplamente utilizadas na agricultura brasileira por apresentarem alto nível produtivo. A primeira cultivar é considerada responsiva à inoculação bacteriana e foi utilizada em estudo prévio descrevendo a presença de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* nas suas raízes (ROUWS et al., 2014). A segunda cultivar é proveniente do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e é amplamente usada na agricultura paulista.

4.2 Coleta de Raízes e Rizosfera

Amostras de raízes não lignificadas ou em início de processo de lignificação (pouco lignificadas) foram coletadas de duas cultivares de cana-de-açúcar cinco meses após o último corte, portanto, tratando-se de plantas em fase de rebrotamento com sistema radicular recém-formado. Raízes adequadas com solo de rizosfera aderente foram selecionadas *in loco* e acondicionadas em tubos Falcon estéreis. Em cada coleta amostras de raízes foram coletadas de até três plantas para cada cultivar em um único bloco. O bloco I foi coletado em 08/04/16 e a temperatura no dia de coleta foi 21°C; o bloco II foi coletado em 15/04/16 à temperatura de 22°C e o bloco III coletado em 22/04/16 à temperatura de 24 °C. As amostras de raízes foram levadas ao laboratório para procedimentos posteriores.

4.3 Obtenção de Diluições Seriadadas de Extratos de Rizosfera e Endosfera

A obtenção de amostras de rizosfera e de endosfera das raízes de cana-de-açúcar seguiu o protocolo de Barillot e colaboradores (2013) com algumas modificações. No laboratório removeu-se manualmente, usando luvas de látex, o excesso de solo das raízes não ou pouco lignificadas previamente selecionadas. Em seguida, para cada amostra, foi pesado 1 g de raízes e foram acondicionadas em tubos falcon de 50 mL estéreis contendo 5 mL de solução salina (0,7%) e Tween 20 (0,01%) (adaptado de BARILLOT et al., 2013; SACHS et al., 2009). As amostras foram incubadas sob agitação por 15 minutos em vórtex na velocidade de 4 RPM. Em seguida, as raízes foram retiradas do tubo e o líquido foi usado como amostra de rizosfera.

As raízes foram rinsadas com solução salina (0,7%) estéril, desinfestadas com água sanitária comercial contendo 2,5 % de hipoclorito de sódio durante 5 minutos e, em seguida, lavadas 10 vezes com água estéril. Na última etapa de lavagem foram retirados 100 µL de água e aplicados em placas de petri contendo o meio YMA (*Yeast Mannitol Agar*) (VINCENT, 1970). Essas placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias para verificar a ausência de micro-organismos e assim, a eficiência do processo de desinfestação.

As raízes foram transferidas para um gral (almofariz) estéril e cortadas em pequenos pedaços para facilitar a maceração, com auxílio de tesoura flambada. Foram adicionados gradativamente 4 mL de solução salina (0,7%) no gral e as amostras foram macerados com ajuda de pistilos. O produto da maceração (4 mL de solução + 1 g de raiz) totalizando 5 mL foi transferido com auxílio de pipeta para um tubo Falcon (15 mL) estéril, sendo esta suspensão considerada como amostra de endosfera.

A partir das amostras de rizosfera e de endosfera obtidas (nível de diluição 5^{-1}), 1 mL foi transferido para um novo tubo Falcon (15 mL) contendo 4 mL de solução salina (0,7%) e a mistura foi homogeneizada em vórtex, gerando-se a diluição de nível 5^{-2} . Repetidas diluições seriadas foram realizadas seguindo esse procedimento até chegar ao nível de diluição 5^{-6} .

4.4 Inoculação de Extratos de Rizosfera e Endosfera na Planta Isca Feijão-caupi

Para avaliar a densidade bacteriana cultivável nos extratos de rizosfera e endosfera, foi aplicada a técnica de NMP, utilizando *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) como planta isca crescida em tubos de ensaio contendo solução agarizada (1%) (VINCENT, 1970).

Como em cada bloco foram coletadas amostras de raízes de cana-de-açúcar de ambas as cultivares, foram obtidas quatro amostras por bloco. Cada amostra foi diluída seriadamente seis vezes e foram utilizadas três repetições nas inoculações. Com isso, em cada bloco foram necessárias 72 plantas iscas para inoculação com as amostras. Totalizando 216 plantas iscas para a inoculação com as amostras, mais 3 plantas como controle positivo (somente no primeiro bloco) e 9 plantas como controle negativo (3 plantas por cada bloco), totalizando 228 plantas iscas.

Os tubos de ensaio de 20 cm de comprimento contendo 60 mL de solução de Norris (modificada para vaso Leonard, livre de nitrogênio) (NORRIS; DATE, 1976) e 0,60 g de ágar foram autoclavados. Após o término do processo de autoclave foram imediatamente agitados manualmente para homogeneização do ágar com a solução e foram posicionados de forma inclinada para solidificarem da maneira correta.

As sementes homogêneas foram visualmente selecionadas, colocadas em um frasco tipo Erlenmeyer e lavadas em etanol 70 % durante 1 minuto sob agitação manual. Em seguida, as sementes foram superficialmente esterilizadas utilizando-se água sanitária comercial contendo 2,5 % de hipoclorito de sódio por 3 minutos. Após 10 lavagens com água estéril, as sementes foram transferidas para papel filtro estéril para secarem. E foram transferidas para placas de Petri contendo meio ágar-água (1%) e as placas foram embaladas e

foram incubadas à 28 °C. Após 2 a 3 dias de incubação, plântulas sem sinais de contaminação e com radícula de 2-3 cm foram selecionadas para serem transferidas para os tubos.

Com auxílio de pinça flambada o ágar na região superior do meio inclinado foi suavemente separado criando uma abertura para a inserção da radícula das plântulas. Cada tubo recebeu uma plântula e foi tampado com um saquinho plástico estéril (20 cm x 11,5 cm) para evitar a contaminação e ao mesmo tempo permitir uma troca gasosa eficiente. A metade inferior dos tubos foi envolvida em papel de alumínio para bloquear a entrada de luz ao sistema radicular das plantas.

Os tubos foram colocados em câmara de crescimento com luz proveniente de LEDs emitindo luz vermelha, azul e branca com fotoperíodo de 12 horas diárias com temperatura de aproximadamente 28 °C.

As inoculações foram realizadas por bloco, seguindo a data de coleta de raízes e preparo das amostras, tal como foi seguida a relação de plantas iscas a serem inoculadas (Tabelas 1, 2 e 3). Para cada nível de diluição das amostras de cada cultivar foram inoculadas 03 plântulas de feijão-caupi com 01 mL do conteúdo para cada uma (VINCENT, 1970).

Tabela 1. Relação das plantas de feijão-caupi inoculadas com amostras de endosfera e rizosfera seriadamente diluídas de duas cultivares de cana-de-açúcar no bloco I, onde: R1, R2 e R3 são as repetições e os números são as identificações das plantas inoculadas

Bloco I	RB867515						IACSP95-5000						Controle (+)			Controle (-)		
	Rizosfera			Endosfera			Rizosfera			Endosfera			R1	R2	R3	R1	R2	R3
Nível de Diluição	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	51	77	26	52	78
5 ⁻¹	1	27	53	13	39	65	7	33	59	19	45	71	-	-	-	-	-	-
5 ⁻²	2	28	54	14	40	66	8	34	60	20	46	72	-	-	-	-	-	-
5 ⁻³	3	29	55	15	41	67	9	35	61	21	47	73	-	-	-	-	-	-
5 ⁻⁴	4	30	56	16	42	68	10	36	62	22	48	74	-	-	-	-	-	-
5 ⁻⁵	5	31	57	17	43	69	11	37	63	23	49	75	-	-	-	-	-	-
5 ⁻⁶	6	32	58	18	44	70	12	38	64	24	50	76	-	-	-	-	-	-

Sem Diluição (SD) se refere às plantas inoculadas com controles (+) e (-).

Tabela 2. Relação das plantas de feijão-caupi inoculadas com amostras de endosfera e rizosfera seriadamente diluídas de duas cultivares de cana-de-açúcar no bloco II, onde: R1, R2 e R3 são as repetições e os números são as identificações das plantas inoculadas

Bloco II	RB867515						IACSP95-5000						Controle (-)		
	Rizosfera			Endosfera			Rizosfera			Endosfera			R1	R2	R3
Nível de Diluição	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	103	128	153
5 ⁻¹	79	104	129	85	110	135	91	116	141	97	122	147	-	-	-
5 ⁻²	80	105	130	86	111	136	92	117	142	98	123	148	-	-	-
5 ⁻³	81	106	131	87	112	137	93	118	143	99	124	149	-	-	-
5 ⁻⁴	82	107	132	88	113	138	94	119	144	100	125	150	-	-	-
5 ⁻⁵	83	108	133	89	114	139	95	120	145	101	126	151	-	-	-
5 ⁻⁶	84	109	134	90	115	140	96	121	146	102	127	152	-	-	-

Sem Diluição (SD) se refere às plantas inoculadas com controle (-).

Tabela 3. Relação das plantas de feijão-caupi inoculadas com amostras de endosfera e rizosfera seriadamente diluídas de duas cultivares de cana-de-açúcar no bloco III, onde: R1, R2 e R3 são as repetições e os números são as identificações das plantas inoculadas

Bloco III	RB867515						IACSP95-5000						Controle (-)		
	Rizosfera			Endosfera			Rizosfera			Endosfera			R1	R2	R3
Nível de Diluição	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
SD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	178	203	228
5 ⁻¹	154	179	204	160	185	210	166	191	216	172	197	222	-	-	-
5 ⁻²	155	180	205	161	186	211	167	192	217	173	198	223	-	-	-
5 ⁻³	156	181	206	162	187	212	168	193	218	174	199	224	-	-	-
5 ⁻⁴	157	182	207	163	188	213	169	194	219	175	200	225	-	-	-
5 ⁻⁵	158	183	208	164	189	214	170	195	220	176	201	226	-	-	-
5 ⁻⁶	159	184	209	165	190	215	171	196	221	177	202	227	-	-	-

Sem Diluição (SD) se refere às plantas inoculadas com controle (-).

Para controle positivo foi utilizado a estirpe BR3262 de *Bradyrhizobium*. As colônias foram retiradas direto da placa de petri e transferidas para o tubo falcon contendo 5 mL de solução salina (0,7%). Este foi colocado no vórtex até homogeneizar seu conteúdo e foi inoculado como acima, 1 mL para cada plântula, sendo três plântulas no total. Os controles negativos foram inoculados da mesma forma, utilizando apenas solução salina. Após a inoculação, as plântulas foram levadas para a câmara de crescimento.

4.5 Coleta dos Nódulos e Isolamento

Aos 26 dias após a inoculação das plantas de feijão-caupi, a ocorrência de nódulos radiculares nas plantas foi avaliada. O número de plantas que nodularam foi registrado. Quando possível, os números de plantas noduladas nas diferentes diluições de inóculo para cada tratamento foram comparados com tabela McCrady (WOOMER, 1994) para estimar a quantidade de rizóbios nas amostras.

Os nódulos foram coletados das plantas e acondicionados em microtubos. Para o isolamento das bactérias foram separados cerca de 3 nódulos de 20 plantas por bloco. Os nódulos foram lavados em etanol 70% por 30 segundos. Em seguida a superfície do nódulo foi desinfestada com água sanitária comercial contendo 2,5% de hipoclorito de sódio, por 3 minutos. Após 10 lavagens com água estéril por 30 segundos a eficiência na desinfestação pelo plaqueamento de uma amostra da água da última etapa de lavagem, como descrito no item 4.3 para raízes de cana-de-açúcar.

Em seguida, os nódulos foram individualmente macerados com auxílio de pinça sobre placa de YMA e o macerado foi repicado com a ajuda de uma alça de platina. Todas as placas foram embaladas e incubadas à 28°C.

As bactérias foram repicadas até a obtenção de colônias isoladas e foram caracterizadas a nível morfocultural, observando velocidade de crescimento (rápido ou lento), pH do meio (ácido, neutro ou alcalino), cor da colônia, transparência da colônia (opaca, translúcida ou transparente) e tamanho médio das colônias (VINCENT, 1970; ODEE et al., 1997; MOREIRA; PEREIRA, 2001; JESUS et al., 2005).

Os isolados foram nomeados com as duas primeiras letras do nome da cultivar em maiúscula, a primeira letra do compartimento (endosfera ou rizosfera) em maiúscula, o número da planta de feijão caupi que deu origem ao nódulo e a letra em minúscula correspondente ao nódulo utilizado no isolamento (a, b ou c). Como exemplo, o isolado RBR1b tem origem do cultivar RB867515, de uma amostra de Rizosfera da planta (feijão-caupi) identificada como número 1 e isolado do nódulo identificado como b.

Após a obtenção de culturas puras, os isolados foram estocados em microtubos de 2 mL contendo 1 mL de meio YM com glicerol (25%) e armazenados a -70°C em superfreezer. O procedimento de estocagem consistiu em retirar diretamente da placa, colônias isoladas com o auxílio da alça de platina e inserir no microtubo contendo o meio para estoque. Foi feito duplicata para cada isolado e os microtubos foram devidamente identificados e levados ao vórtex para homogeneização de seu conteúdo e posterior armazenagem em superfreezer. O restante da massa bacteriana na placa foi ressuspenso em água ultrapura estéril conforme descrito em seguir no item 4.6.1 e foi utilizado para extração de DNA.

4.6 Caracterização Genética

4.6.1 Extração de DNA

Em cada placa foi adicionado 10 mL de água ultrapura estéril. Com auxílio da alça de platina as colônias foram mecânicamente liberadas do meio contido e com auxílio de ponteira e pipeta de 1000 μL foi homogeneizado o conteúdo da placa e pipetado 2 mL para microtubos de 2 mL. Esses tubos foram centrifugados por 10 minutos a 16,1 rcf. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os microtubos armazenados a -20°C . A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo do kit de extração *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (PROMEGA). Para evitar degradação das amostras de DNA extraídas devido sucessivos descongelamentos, estas foram separadas em alíquotas e armazenadas em freezer a -20°C .

4.6.2 Eletroforese em gel e fotodocumentação

O DNA extraído foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose (0,8%) preparado com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X). Nos poços dos géis foram aplicados uma mistura de 2 μL de tampão tipo *loading* (2x) (concentração inicial 10x. Invitrogen, *Thermo Fisher*, Waltham, Massachusetts, USA) e 2 μL de DNA extraído. Para estimar a quantidade o marcador molecular 1 kb *plus DNA ladder* (Invitrogen, *Thermo Fisher*, Waltham, Massachusetts, USA) foi usado. Eletroforese ocorreu a 80 V durante 100 minutos. Após a eletroforese, os géis foram imersos em solução de Brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 10 segundos e imediatamente foram transferidos para um recipiente contendo água destilada e ficaram em agitação durante 30 minutos para a retirada do excesso de brometo de etídeo nos géis. Em seguida, os géis foram transportados para o fotodocumentador *Kodak Logic 100* (Kodak®) para visualização em luz ultravioleta e para captura da imagem.

Este mesmo procedimento foi utilizado nos produtos de PCR com algumas modificações:

Para a visualização dos produtos de BOX PCR foi utilizado gel de agarose (2%) em tampão TAE 1X. Em cada poço do gel foi aplicado 10 μL de produto do BOX PCR, 10 μL do controle negativo (somente o mix) e 4 μL do marcador 1 kb *plus DNA ladder*. A eletroforese ocorreu a 70 V durante 360 minutos. Ao descorar os géis, utilizaram-se três lavagens de 30 minutos.

Nos produtos de PCR dos genes *recA*, região ITS, *nodC* e *nifH*, foi utilizado gel de agarose (2%) em tampão TAE 1X. Em cada poço do gel foi aplicado uma mistura de 2 μL de *loading* (2x) e 2 μL de produto de PCR (o mesmo para o controle negativo) e uma mistura de 1 μL de *loading* (2x) e 2 μL do marcador *low mass*. A eletroforese ocorreu a 90 V durante 90 minutos.

4.6.3 PCR

Todas as reações de PCR foram preparadas utilizando o DNA extraído dos isolados obtidos. Os detalhes dos reagentes utilizados na preparação do mix para as reações da PCR e as condições de amplificação dos genes estão descritas na Tabela 4. As reações de PCR foram preparadas utilizando o kit *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (PROMEGA) e conduzidas em termociclador Mastercycler® gradiente (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). As imagens de BOX PCR foram analisadas no programa Bionumerics versão 7.5 (*Applied Maths*, Bélgica).

4.6.4 Sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento os produtos da PCR foram submetidos à purificação enzimática por tratamento com as enzimas Exonuclease I e Fast AP (ambas da *Thermo Fisher*) para remoção de dNTPs e *primers* da PCR. Em seguida foi feita a reação de marcação com o kit *Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 3.1 v* (*Applied Biosystems-ABI*). Os *primers* específicos de cada reação de amplificação dos genes na PCR foram utilizados separadamente em reações individuais de marcação. O programa da reação de sequenciamento foi: 95° C por 1 minuto; 40 ciclos de 96° C por 15 segundos, 50° C por 15 segundos e 60° C por 4 minutos. Ao término dessa reação o DNA foi precipitado adicionando-se 1 µL de uma solução de Acetato de Sódio (3M), 1 µL de EDTA (125mM) e 25 µL de Etanol 100%. Após a precipitação durante uma hora a temperatura ambiente no escuro, as amostras foram centrifugadas a 4000 RPM por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado pela adição de 25 µL de etanol (70%). Após a centrifugação por 15 min, o etanol foi descartado e os precipitados foram secos ao ar em temperatura ambiente no escuro e então ressuspensos em Hi-di formamida para injeção no sequenciador ABI 3500 (*Thermo Fisher*). As sequências foram analisadas manualmente com a ajuda do *software* BioNumerics 7.5 (*Applied Maths*, Bélgica) e aquelas que obtiveram baixa qualidade foram removidas.

4.6.5 Análise das sequências dos genes

As sequências de todos os genes foram verificadas com análises de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1997). Alinhamento e análise filogenética foram conduzidos usando o *software* MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). Alinhamentos de sequências foram gerados usando a ferramenta *Muscle* (EDGAR, 2004) no MEGA 6. Utilizando o *software* MEGA 6, as sequências dos isolados obtidos utilizados como representantes foram alinhadas com a sequência de genes de estirpes tipo de todas as espécies descritas do gênero *Bradyrhizobium* e com sequências de isolados desse mesmo gênero obtidos da inoculação de extrato de raízes de cana-de-açúcar em feijão-caupi por Rouws e colaboradores (2014) e sequências desses isolados citados anteriormente utilizados no estudo de Matos (2017) (Tabela em Anexo A). Em seguida, as sequências alinhadas foram editadas manualmente no mesmo tamanho, tendo o dimensionamento de 386 nucleotídeos (nt) nas sequências de gene *recA* e 441 nt nas sequências de *nodC*. As sequências de ITS não foram editadas como as anteriores, sendo utilizado a opção “*complete deletion*” no MEGA 6. As árvores filogenéticas foram calculadas usando o método de construção *maximum-likelihood* (ML) (FELSENSTEIN, 1985). O modelo mais adequado para o cálculo das árvores filogenéticas foi determinado para o alinhamento das sequências usando a ferramenta de seleção modelo integrado do MEGA 6. A confiabilidade da topologia das árvores filogenéticas foi avaliada utilizando o método de *bootstrap* com 1000 pseudoreplicatas (FELSENSTEIN, 1985).

Tabela 4. Sequência dos *primers* utilizados nas amplificações das regiões *recA*, ITS, *nodC* e *nifH*, otimização da condição da PCR e volume final da reação de 50 µL para cada amostra e reação final de 25 µL em cada amostra na BOX PCR (continua)

Região	Condições de PCR	Para 50 µL (PCR) e 25 µL (BOX PCR) de reação foram utilizados
ITS*	Desnaturação inicial de 95° C durante 3 minutos, 30 ciclos de (desnaturação de 95° C durante 1 minuto, anelamento de 57° C durante 1 minuto e extensão de 72° C durante 2 minutos), extensão final de 72° C durante 7 minutos. <i>Primers</i> : ITSF (5'-GTCTAACAAGGTAGCCGTA-3'), ITSReub (5'-GCCAGGCATCCACC-3').	Água de PCR 32,2 µL; Buffer sem cor (estoque 5 x) 1 x; MgCl ₂ (estoque 25 mM) 1,50 mM; dNTP (estoque 10 mM) 0,20 mM; ITSF (estoque 10 µM) 0,25 µM; ITSReub (estoque 10 µM) 0,25 µM; Taq DNA polimerase (estoque 500 U) 1,50 U. Template 1 (49µL de Mix + 1µL de DNA genômico)
<i>nifH</i> **	1. 95°C 5 minutos; 2. 95°C 1 minuto; 3. 72°C 2 minutos, -0,5° C por ciclo; 4. 72°C 2 minutos; 5. Vá para o passo 2, 30X; 6. 95°C 1 minuto; 7. 57°C 2 minutos; 8. 72°C 2 minutos; 9. Vá para o passo 6, 5X; 10. 72°C 10 minutos. <i>Primers</i> : nifHF (5'-ACGGNAARGGSGGNATCGGCAA-3') e nifHI (5'-AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA-3').	Água de PCR 29,25 µL; Buffer sem cor (estoque 5 x) 1 x; MgCl ₂ (estoque 25 mM) 1,50 mM; dNTP (estoque 10 mM) 0,25 mM; nifHF (estoque 10 µM) 0,50 µM; nifHI (estoque 10 µM) 0,50 µM; Taq DNA polimerase (estoque 500 U) 2,50 U. Template 1 (49µL de Mix + 1µL de DNA genômico)
<i>recA</i> ***	Desnaturação inicial de 95° C durante 2 minutos, 35 ciclos de (desnaturação de 95° C durante 45 segundos, anelamento de 58°C durante 30 segundos e extensão de 72° C durante 1,5 minutos), extensão final de 72° C durante 7 minutos. <i>Primers</i> : <i>recA</i> 41F (5'-TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG-3') e <i>recA</i> 640R (5'-ACATSACRCCGATCTTCATGC-3').	Água de PCR 31,95 µL; Buffer sem cor (estoque 5 x) 1 x; MgCl ₂ (estoque 25 mM) 1,50 mM; dNTP (estoque 10 mM) 0,25 mM; <i>recA</i> 41F (estoque 10 µM) 0,25 µM; <i>recA</i> 640R (estoque 10 µM) 0,25 µM; Taq DNA polimerase (estoque 500 U) 1,50 U. Template 1 (49µL de Mix + 1µL de DNA genômico)
<i>nodC</i> ****	Desnaturação inicial de 95° C durante 5 minutos, 35 ciclos de (desnaturação de 95° C durante 1 minuto, anelamento de 60° C durante 2 minutos e extensão de 72° C durante 2 minutos), extensão final de 72° C durante 5 minutos. <i>Primers</i> : <i>nodC</i> 540F (5'-TGATYGAYATGGARTAYTGCT-3') e <i>nodC</i> 1160R (5'-GYGACARCCARTCGCTRTTG-3').	Água de PCR 25,75 µL; Buffer sem cor (estoque 5 x) 1 x; MgCl ₂ (estoque 25 mM) 1,75 mM; dNTP (estoque 10 mM) 0,25 mM; <i>nodC</i> 540F (estoque 10 µM) 0,80 µM; <i>nodC</i> 1160R (estoque 10 µM) 0,80 µM; Taq DNA polimerase (estoque 500 U) 2,50 U. Template 1 (49µL de Mix + 1µL de DNA genômico)

Tabela 4. (continuação)

<i>nodC</i> 1 ^a alteração	Desnaturação inicial de 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de (desnaturação de 95° C durante 1 minuto, anelamento de 50 °C durante 2 minutos e extensão de 72° C durante 2 minutos), extensão final de 72° C durante 5 minutos. <i>Primers</i> : <i>nodC</i> 540F e <i>nodC</i> 1160R.	Água de PCR 24,75 µL; Buffer sem cor (estoque 5 x) 1 x; MgCl ₂ (estoque 25 mM) 1,75 mM; dNTP (estoque 10 mM) 0,25 mM; <i>nodC</i> 540F (estoque 10 µM) 0,80 µM; <i>nodC</i> 1160R (estoque 10 µM) 0,80 µM; Taq DNA polimerase (estoque 500 U) 2,50 U. Template 2 (48µL de Mix + 2µL de DNA genômico)
<i>nodC</i> 2 ^a alteração	Desnaturação inicial de 95° C durante 5 minutos, 35 ciclos de (desnaturação de 95° C durante 1 minuto, anelamento de 50° C durante 2 minutos e extensão de 72° C durante 2 minutos), extensão final de 72° C durante 5 minutos. <i>Primers</i> : <i>nodC</i> 540F e <i>nodC</i> 1160R.	Água de PCR 20,25 µL; Buffer sem cor (estoque 5 x) 1 x; MgCl ₂ (estoque 25 mM) 3,00 mM; dNTP (estoque 10 mM) 0,25 mM; <i>nodC</i> 540F (estoque 10 µM) 0,80 µM; <i>nodC</i> 1160R (estoque 10 µM) 0,80 µM; Taq DNA polimerase (estoque 500 U) 2,50 U. Template 4 (46µL de Mix + 4µL de DNA genômico)
BOX PCR*****	Desnaturação inicial de 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos de (desnaturação de 94°C durante 1 minuto, anelamento de 53°C durante 1 minuto e extensão de 65°C durante 8 minutos), extensão final de 65°C durante 16 minutos. <i>Primer</i> : Box A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3').	Água de PCR 12,50µl; Buffer com cor (estoque 5x) 1x; MgCl ₂ (estoque 25 mM) 3,00 mM; dNTP (estoque 10 mM) 0,30mM; BOX A1R (estoque 10µM) 1,0µM; Taq DNA polimerase (estoque 500 U) 1,25 U. Template 1 (24µLde Mix + 1µL de DNA genômico)

* CARDINALE et al., 2004.

** LAGUERRE et al., 2001.

*** VINUESA et al., 2005.

**** SARITA et. al., 2005.

***** VERSALOVIC et al., 1994; KOEUTH et al., 1995

4.7 Ensaio de Redução de Acetileno

Para esse ensaio foram utilizados onze isolados, controle negativo (sem inoculação de bactéria) e *Burkholderia tropica* (Bt - BR11366 = Ppe8^T) como controle positivo (REIS et al., 2004), totalizando 13 tratamentos, com três repetições para cada tratamento e com injeção de acetileno e sem injeção de acetileno, totalizando 78 frascos. Os isolados, foram escolhidos aleatoriamente

O ensaio seguiu a metodologia (REIS et al., 2004 modificada por ROUWS et al., 2014) com algumas modificações. Foi utilizado para cultivo dos isolados o meio semi-sólido JMV (REIS et al., 2004 modificada por ROUWS et al., 2014) contendo para 1 L de solução: 5 g de Manitol, 6 mL de K₂HPO₄ 10 %, 18 mL de KH₂PO₄ 10%, 2 mL de MgSO₄. 7H₂O 10%, 1 mL de NaCl 10 %, 2 mL de CaCl₂. 2H₂O 1%, 4 mL de FeEDTA 1,64 %, 2 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura, 1 mL de vitaminas para meio de cultura, 0,4 g de extrato de levedura por litro e 1,6 g de ágar por litro. O pH deve ser de 6,5. Foram aliqüotados 10 mL do meio JMV modificado em cada frasco de soro de 25 mL, foram tampados com algodão e autoclavados.

Os isolados foram cultivados em placas de petri contendo meio YMA e o controle positivo foi cultivado em placa de petri contendo meio TY (DÖBEREINER et al., 1999).

Para cada isolado e para o controle positivo foi feita uma suspensão em 1 mL de água estéril em microtubos e 20 µL da suspensão foi liberada no frasco.

Em seguida, os frascos foram transportados para câmara de incubação para que os isolados fossem incubados à temperatura de 30 °C no escuro por cinco dias. No quinto dia as rolhas de algodão foram trocadas por tampas de borracha e em seguida foi injetado acetileno no interior dos frascos.

A injeção de gás acetileno foi feita em lugar aberto da seguinte maneira: 10 % do espaço ocupado por ar no interior do frasco devem ser retirados com seringa e agulha. Como foram preparados 10 mL de meio em um frasco de 25 mL, 10 % do ar ocupado foram 1,5 mL de ar. Esse mesmo valor deve ser repostado com gás de acetileno com auxílio também de seringa. Nessa etapa e na etapa de medição de acetileno é importante ter o cuidado de não abrir as tampas de borracha dos frascos para que não haja perda do gás injetado e não haver contaminações. Após 1,5 mL de acetileno ser injetado em cada frasco do tratamento com acetileno os frascos foram transportados para câmara de incubação para serem mantidos a 30 °C no escuro até o próximo dia para a medição de etileno convertido.

Passadas 15 horas de incubação após a injeção de acetileno, os frascos foram transportados para a sala de cromatografia gasosa e foram retirados 0,5 mL de fase gasosa no interior de cada frasco com auxílio de seringa de insulina e agulha (28 mm X 05 mm) acoplada e foi injetado no cromatógrafo gasoso para avaliar a presença de etileno. Para cada tratamento foram utilizadas seringas e agulhas novas. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo gasoso modelo Perkin Elmer, coluna cromatográfica Porapack Q de 1 m, temperatura da corrida (forno) de 90° C, temperatura do injetor de 100° C, detector Flame Ionization Detector (Ionização de Chama), temperatura do detector de 50 °C, limite mínimo de detecção para etileno de 5 mV, limite mínimo de quantificação de 15 mV, septo de borracha e tempo para estabilização da linha de base de 30 a 40 minutos.

Em cada medição foi apresentado um gráfico indicando a presença de etileno, assim como de acetileno, onde o valor da área do gráfico de etileno para cada amostra foi registrado em mV. A atividade da nitrogenase foi estimada por comparação desses picos a uma curva padrão, com o valor dado em nmol de etileno produzido por frasco (ou nmol/15 mL, devido o volume de 15 mL ocupado pelo gás em cada frasco) durante o período de incubação de 15 horas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Densidade de Rizóbios nas Amostras

Plântulas de feijão-caupi, utilizadas como plantas iscas e cultivadas em tubos de vidro, foram individualmente inoculadas com diferentes diluições de extratos de rizosfera e de raízes de duas cultivares de cana-de-açúcar. As amostras de rizosfera de ambas as cultivares induziram nódulos em todos os níveis de diluição, enquanto nas amostras de endosfera de ambas as cultivares foram registrados nódulos até a diluição do nível 5^{-4} . Esse resultado indica haver um número maior de rizóbios na rizosfera das plantas de cana-de-açúcar do que nos tecidos internos de suas raízes.

Amostras de rizosfera da cultivar IACSP95-5000 (considerando os três blocos) induziram nodulação em um maior número de plantas. Porém, amostras de endosfera dessa mesma cultivar apresentaram o menor número de plantas com nódulos (Tabela 5).

Tabela 5. Número de plantas de feijão-caupi com nodulação após inoculação com diferentes diluições de amostras de rizosfera e de endosfera de raízes de cana-de-açúcar das cultivares RB867515 e IACSP95-5000

Bloco	1				2				3			
Tratamentos	RBR	RBE	IAR	IAE	RBR	RBE	IAR	IAE	RBR	RBE	IAR	IAE
Diluição												
5^{-1}	2	1	2	2	2*	3	3	3	2*	2*	3	1
5^{-2}	3	1	3	1	3	3	3	1	3	2	3	2
5^{-3}	2*	2	3	0	3	2	3	1	3	2	3	1
5^{-4}	3	1	3	0*	3	0*	2	0	3	0	3	0
5^{-5}	2	0	3	0	3	0	2	0	3	0	3	0
5^{-6}	3	0	3	0	2*	0	3	0	3	0*	3	0
Soma	15	5	17	3	16	8	16	5	17	6	18	4

*Uma planta entre as três repetições não se desenvolveu; (RBR) amostra de rizosfera da cultivar RB867515, (RBE) amostra de endosfera da cultivar RB867515, (IAR) amostra de rizosfera da cultivar IACSP95-5000, (IAE) amostra de endosfera da cultivar IACSP95-5000.

A determinação do número mais provável de rizóbios foi realizada após a quantificação das plantas noduladas após a inoculação com diferentes níveis de diluição das amostras de interesse. Desta forma, em cada nível de diluição, o número de rizóbios diminui em torno de 5 vezes e espera-se que ao alcançar certo nível de diluição, não existam mais rizóbios na amostra. Nesse sentido, é importante notar que em algumas diluições seriadas (RBR, RBE e IAE do bloco I além de RBR e IAR do bloco II) o número de plantas noduladas não diminui coerentemente de acordo com o nível de diluição (Tabela 5). Uma possível explicação para essa observação se dá pela distribuição não homogênea dos micro-organismos nos ambientes naturais, sendo que os mesmos frequentemente são encontrados em agregados e/ou biofilmes (STOODLEY et al., 2002; FETT; COOKE, 2005; CULLER et al., 2014). Vale

lembrar que a técnica da diluição seriada se baseia na ideia de que as bactérias em certa amostra se encontram de forma homogênea. Portanto, a ocorrência de agregados na amostra, que podem consistir de diversas espécies de micro-organismos, pode dificultar a realização de diluições seriadas.

Outra fonte de heterogeneidade ocorre no preparo das amostras de endosfera. Como a maior parte das raízes de cana-de-açúcar coletadas estavam em início de processo de lignificação, a maceração das raízes não foi eficiente em comparação com maceração de raízes não lignificadas, gerando resíduos dos tecidos das raízes que possivelmente serviram de abrigo para as bactérias, impossibilitando a utilização efetiva dos micro-organismos retirados dessas raízes presentes na diluição seriada e posterior inoculação.

Blodgett e Garthright (1998); Garthright e Blodgett (2003) explicam que cada tubo das repetições inoculado nas etapas de inoculação é independente do outro, sugerindo que estatisticamente nenhum será obrigatoriamente igual ao outro após a inoculação. Ou seja, nenhum terá estatisticamente o mesmo número de micro-organismo que o outro e também comentam que o organismo alvo possui uma distribuição aleatória e não agregada no inóculo facilitando ou dificultando a presença do micro-organismo no tubo inoculado na fase de diluição seriada. Isso pode acontecer no momento de pipetar na inoculação das plantas em um nível de diluição, pegando quantidades diferentes de bactérias para cada repetição, mesmo com uma ótima homogeneização antes de pipetar e sabendo que foi inoculado o mesmo volume em todas as repetições.

Em alguns casos, a inconsistência no resultado da diluição seriada se dá apenas no primeiro nível (5^{-1}), sendo este o caso nas amostras IAR do bloco I e RBR do bloco III. Pode-se especular que nesses casos algum a substância inibidora da amostra original esteja inibindo o processo de nodulação.

Andrade e Hamakawa (1994) sugerem que as condições desfavoráveis para a nodulação podem ter origem da falha na sobrevivência ou multiplicação do rizóbio, baixo vigor das sementes das plantas iscas (resultando na baixa emergência e desenvolvimento das plântulas) ou interferência de algas ou fungos saprofíticos, além da morte de rizóbios por diferença no potencial osmótico. Verificando a Tabela 5, observou-se que as plantas que não se desenvolveram afetaram o resultado de nodulação nas diluições seriadas.

Contudo, as seguintes amostras seguiram o padrão de diluição seriada esperada, possibilitando obtenção do número mais provável de rizóbios mediante a tabela McCrady (WOOMER, 1994): IAE do bloco I para qual obteve o valor estimado de 6,1 rizóbios g^{-1} de raiz; IAE do bloco II obteve 18 rizóbios g^{-1} de raiz e RBE do bloco II obteve o valor de 105 rizóbios g^{-1} de raiz. O restante das amostras não seguiu esse padrão, impossibilitando a utilização da tabela e posterior estimativa de rizóbios nas amostras. Seguindo esta ideia, Andrade e Hamakawa (1994) comentam que o número restrito de tabelas de NMP publicado fornece um número limitado de resultados de nodulação, impossibilitando a comparação de resultados de nodulação diferentes dos encontrados nas tabelas McCrady.

Como houve inconsistência nos resultados de nodulação para estimar a densidade de rizóbios nas amostras utilizando a técnica de NMP, a observação de nódulos nos níveis de diluição torna-se uma alternativa para estimar o nível mínimo de rizóbios nas amostras: Nas amostras de rizosfera de ambas as cultivares observaram-se nódulos até o nível mais diluído (5^{-6}), mostrando a presença de no mínimo uma célula de rizóbio nessa diluição. Portanto, pode-se estimar que na amostra original tinha um mínimo em torno de $1/5^{-6} = 5^6 = 15625$ rizóbios g raiz $^{-1}$.

O mesmo raciocínio pode ser aplicado às demais amostras de endosfera de ambas as cultivares. Como foram observados nódulos até os níveis 5^{-3} e 5^{-4} de diluição, estima-se um mínimo entre 125 e 625 rizóbios g^{-1} de raiz.

5.2 Isolados Obtidos

A partir das plantas de feijão-caupi inoculadas com diferentes diluições de amostras de rizosfera e de endosfera de raízes de cana-de-açúcar das cultivares RB867515 e IACSP95-5000, cerca de 20 plantas apresentando nódulos foram escolhidas aleatoriamente entre todos os níveis de diluição, principalmente nos níveis de maior e menor diluição. Três nódulos por planta foram selecionados para o isolamento dos rizóbios. Como resultado, foram obtidos 97 isolados de rizóbios, sendo o mesmo número de isolados (34) para as amostras de rizosfera de cada cultivar e 15 e 14 respectivamente do interior das raízes das cultivares IACSP95-5000 e RB867515 (Tabela 6).

Tabela 6. Quantidade de isolados obtidos após inoculação em plantas de feijão-caupi com diferentes diluições de amostras de rizosfera e de endosfera de raízes de cana-de-açúcar das cultivares RB867515 e IACSP95-5000

Bloco	1				2				3			
Tratamentos	RBR	RBE	IAR	IAE	RBR	RBE	IAR	IAE	RBR	RBE	IAR	IAE
Diluição												
5 ⁻¹	6	2	6	6	2	5	4	1	6	1	5	0
5 ⁻²	3	2	0	2	0	0	0	1	0	0	3	2
5 ⁻³	3	0	0	0	0	4	1	1	0	0	0	2
5 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
5 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	0
5 ⁻⁶	2	0	3	0	3	0	3	0	6	0	6	0
Soma	14	4	9	8	5	9	8	3	15	1	17	4

(RBR) amostra de rizosfera da cultivar RB867515, (RBE) amostra de endosfera da cultivar RB867515, (IAR) amostra de rizosfera da cultivar IACSP95-5000, (IAE) amostra de endosfera da cultivar IACSP95-5000; (0) sem êxito de isolamento.

Bactérias puderam ser isoladas em pelo menos uma repetição em todos os níveis de diluição. No nível 5⁻⁴ houve somente um isolado, de rizosfera da cultivar RB867515 (Tabela 6). Foi observado somente um isolado na amostra de endosfera no bloco III dessa mesma cultivar.

Não foi observado o domínio de um dos genótipos de cana em relação ao número da população dos rizóbios estudados.

Reis Junior et al. (2000) quantificaram a população de *Azospirillum* spp. e de *Acetobacter diazotrophicus* em quatro cultivares de cana-de-açúcar e não verificaram influência do genótipo da cana, registrando a presença de representantes dos micro-organismos avaliados em todas as partes de todas as cultivares, assim como perceberam maior densidade dessas bactérias na rizosfera da cana. Gottel e colaboradores (2011) também observaram o maior número de micro-organismos na rizosfera de *Populus deltoides* (algodão-americano) e relataram *Bradyrhizobium* spp. como destaque em número na rizosfera e em menor quantidade na endosfera. A riqueza de rizóbios associados às raízes em comparação com nódulos foi relatada por Miranda-Sánchez e equipe (2015) quando estudaram a comunidade de rizóbios em duas espécies de *Acacia* spp. e por Sullivan et al. (1996) estudando rizóbios na rizosfera de *Lotus corniculatus*, assim, corroborando com o presente estudo.

5.3 Características Morfoculturais

Praticamente todos os isolados apresentaram características morfofoculturais compatíveis com o gênero *Bradyrhizobium* (Tabela em Anexo B), apresentando alcalinização do meio YMA e crescimento lento (Figura 4) segundo Jordan (1982).

Somente quatro isolados apresentaram crescimento rápido (RBR179a, IAE71a, IAE45b e IAR64a) apresentando acidificação ou neutralização no pH do meio (Figura 4), assim como Rouws e colaboradores (2014) também relataram três isolados (P5-2, P5-21 e P5-25) de extrato de raiz de cana com essas características.

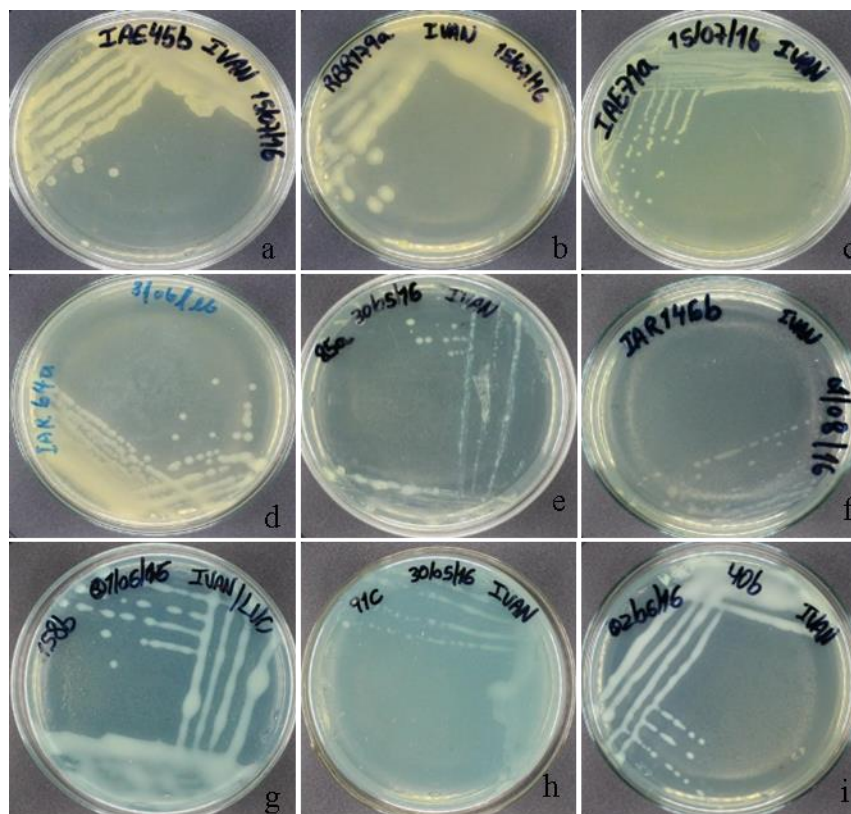


Figura 4. Colônias de isolados obtidos após inoculação em plantas de feijão-caupi com diferentes diluições de amostras de rizosfera e de endosfera de raízes de cana-de-açúcar das cultivares RB867515 e IACSP95-5000 apresentando características morfofoculturais diversas. Isolados de crescimento rápido (a-d) e isolados de crescimento lento (e-i).

Florentino et al. (2010) relataram bactérias do gênero *Bradyrhizobium* isoladas de feijão-caupi com crescimento entre 5 e 7 dias e alcalinizando ou neutralizando o meio, sendo que três dessas bactérias possuíam características semelhantes ao isolado IAR146b (desse estudo) com colônia de aparência aquosa (aparência do exopolissacarídeo formado pela colônia).

As características culturais, que são utilizadas para caracterização e identificação prévia dos isolados, podem induzir ao erro e somente a análise genética irá confirmar a identificação. Guimarães et al. (2012) comentam que BOX PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA são os mais indicados porque seus resultados são mais precisos em termo de identificação e avaliação da diversidade.

5.4 Agrupamento Genético por meio de BOX PCR

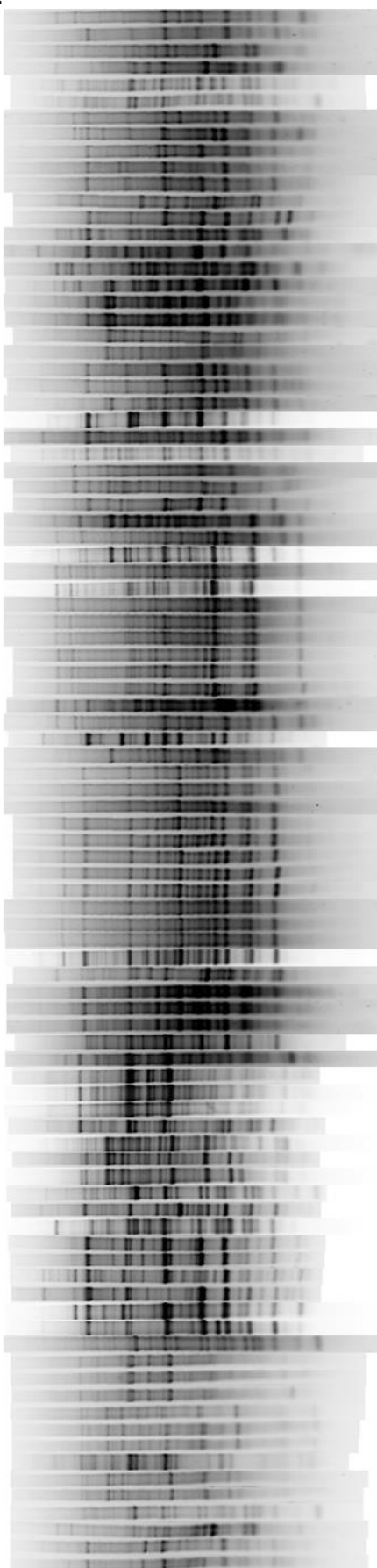
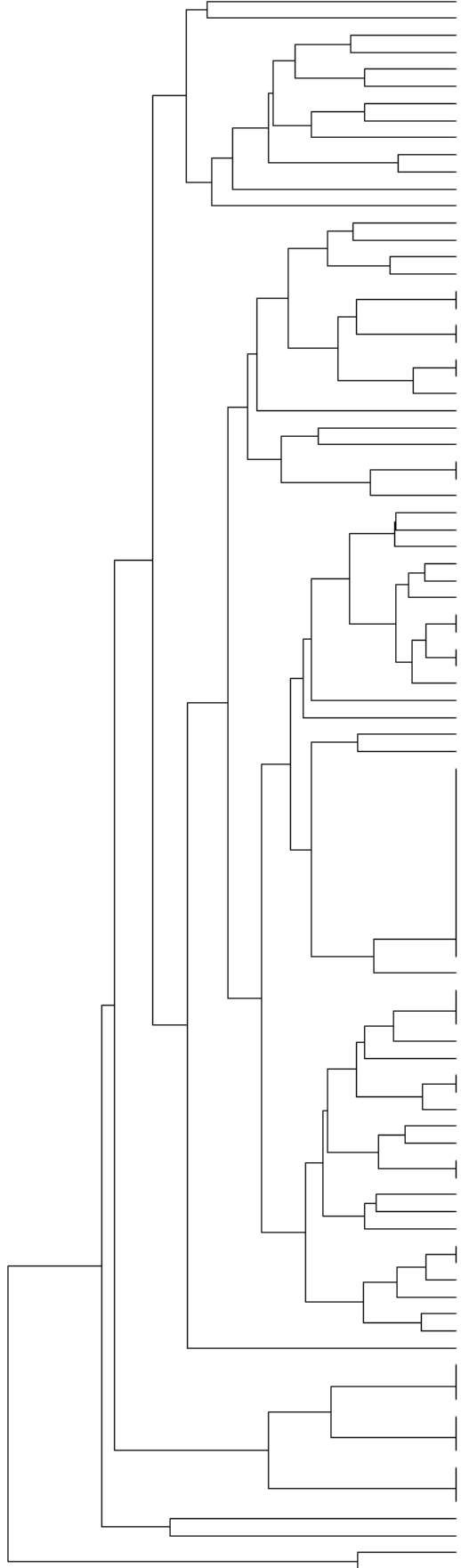
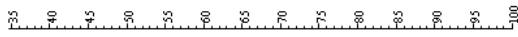
Na sua grande maioria, os isolados obtidos apresentaram características morfológicas compatíveis com o gênero *Bradyrhizobium*. Por apresentarem características bastante homogêneas, o método de BOX-PCR foi aplicado para estudar melhor a diversidade genética da coleção de bactérias obtida (Figura 5). Então, os isolados de crescimento rápido não foram utilizados neste método e na análise filogenética.

Após a análise computadorizada dos géis de agarose com os produtos das reações de BOX-PCR um dendrograma de similaridade foi gerado com base nos perfis de bandas. Uma similaridade de 80% foi aplicada no sentido de identificar grupos genotípicos (Figura 5). Desta forma, foram identificados 28 genótipos (Tabela 7).

A relação dos genótipos e a quantidade de isolados presentes em cada amostra estão indicadas na tabela em Anexo C.

Box

BOX



- IAE45a } G 1
- IAE33c } G 2
- IAE140b } G 3
- IAE174c } G 3
- IAE191a } G 4
- RER6b } G 5
- RER204a } G 5
- IAE91c } G 6
- RER179b } G 7
- RER179c } G 7
- RER129a } G 8
- IAE71b } G 9
- IAE12c } G 9
- RER35a } G 10
- IAE20b } G 10
- RER160a } G 10
- RER184a } G 11
- IAE59a } G 11
- RER158a } G 11
- RER158b } G 11
- RER137b } G 11
- RER53b } G 11
- RER29c } G 11
- RER112a } G 12
- IAE123a } G 13
- RER135a } G 14
- RER40b } G 15
- RER40a } G 15
- RER184b } G 15
- RER2c } G 16
- RER29a } G 16
- IAE116a } G 16
- IAE216a } G 16
- RER104a } G 16
- IAE118a } G 16
- RER1c } G 16
- IAE12b } G 16
- RER1b } G 16
- IAE141b } G 16
- IAE20a } G 17
- IAE91b } G 18
- IAE45c } G 18
- IAE147a } G 19
- RER109c } G 19
- RER204c } G 20
- IAE23a } G 20
- IAE59b } G 20
- RER2b } G 20
- RER109a } G 20
- IAE71c } G 20
- RER2a } G 20
- RER1a } G 20
- IAE166a } G 20
- RER53a } G 20
- RER39a } G 20
- RER204b } G 20
- IAE174b } G 20
- IAE96b } G 20
- RER6a } G 21
- RER53c } G 21
- RER157a } G 21
- IAE167c } G 21
- IAE171b } G 21
- IAE195a } G 21
- IAE171a } G 21
- IAE221b } G 21
- IAE167a } G 21
- IAE59c } G 21
- RER209c } G 21
- IAE198a } G 21
- RER39b } G 21
- IAE195b } G 21
- RER134b } G 22
- RER159b } G 22
- IAE121b } G 22
- RER137c } G 22
- IAE171c } G 22
- RER137a } G 22
- IAE198b } G 23
- IAE221a } G 24
- IAE221c } G 24
- IAE167b } G 24
- RER110a } G 24
- RER110c } G 24
- RER110b } G 24
- RER29b } G 25
- RER209b } G 25
- RER209a } G 25
- IAE195c } G 26
- IAE191b } G 27
- IAE191c } G 27
- IAE99b } G 28

Legenda:

- Amostra de Rizosfera da cultivar IACSP95-5000
- Amostra de Endosfera da cultivar IACSP95-5000
- Amostra de Rizosfera da cultivar RB867515
- Amostra de Endosfera da cultivar RB867515

Figura 5. Dendrograma de similaridade genética por BOX PCR dos isolados obtidos das amostras de endosfera e rizosfera de raízes de cana-de-açúcar das cultivares RB867515 e IACSP95-5000. (G) Genótipos formados com 80% de similaridade.

Alguns genótipos foram predominantes em relação aos demais possuindo maior número de isolados, os quais se destacaram os genótipos G 21 (15 isolados), G 20 (13 isolados), G 16 (11 isolados), G 11 (7 isolados) e apresentando 6 isolados os genótipos G 22 e G 24.

Os Grupos com um número superior a três isolados formaram grupos heterogêneos constituindo isolados dos dois cultivares e dos dois compartimentos. Houve um maior número de isolados pertencentes à cultivar RB867515 nos Grupos 5, 11 e 13. No G 11, a maioria dos isolados pertence à cultivar RB867515. O G 16 apresentou o mesmo número de isolados para amostras de rizosfera de ambas as cultivares e apresentou somente um isolado de amostra de endosfera na cultivar IACSP95-5000 (IAE).

O genótipo G 20 apresentou isolados de todas as amostras em ambas as cultivares. A amostra RBR apresentou com maior número de isolados (7 isolados) nesse genótipo. O G 21 também apresentou isolados de todas as amostras em ambas as cultivares. Neste genótipo o maior número de isolados foi da amostra IAR. O G 22 apresentou isolados em quase todas as amostras em ambas cultivares, com exceção da amostra IAE. O G 24 apresentou isolados somente das amostras RBE e IAR.

Em alguns casos, isolados obtidos de diferentes nódulos da mesma planta foram geneticamente distintos, como por exemplo no caso dos isolados RBR204a (G 5) e os isolados RBR204b e RBR204c pertencentes ao G 20. Já que normalmente cada nódulo de uma planta é induzido por uma (estirpe de) bactéria, essa observação está dentro do esperado.

Foi possível observar a presença de isolados do gênero *Bradyrhizobium* colonizando rizosfera e endosfera em ambas as cultivares de cana-de-açúcar. Assim como Rouws e colaboradores (2014) relataram a presença desse gênero como endofíticas na cultivar RB867515 de cana-de-açúcar. Esta observação deste estudo sugere que não há influência das duas cultivares estudadas sob a comunidade de *Bradyrhizobium*, indicando por exemplo que determinada estirpe não coloniza somente uma cultivar.

Tabela 7. Genótipos formados e seus respectivos isolados a partir do dendrograma de BOX PCR com similaridade de 80 %. Isolados representados usados para caracterização dos genes *recA*, região ITS, *nodC* e *nifH* estão destacados em negrito

Genótipos BOX	Isolados obtidos
G 1	IAE45a
G 2	IAR33c
G 3	IAR146b, IAE174c
G 4	IAR33b, IAR191a
G 5	RBR6b, RBR204a
G 6	IAR91c
G 7	RBR179b, RBR179c
G 8	RBR129a
G 9	IAE71b
G 10	IAR12c, RBE85a, IAE20b, RBE160a
G 11	RBR184a, IAR59a, RBR158a, RBR158b, RBE137b, RBR53b, RBR29c
G 12	RBE112a
G 13	IAE123a,
G 14	RBE135a
G 15	RBE40b, RBE40a, RBR184b
G 16	RBR2c, RBR29a, IAR116a, IAR216a, RBR104a, IAR118a, RBR1c, IAR12b, RBR1b, IAR141b, IAE20a
G 17	IAR91b
G 18	IAE45c
G 19	IAE147a, RBR109c
G 20	RBR204c, IAR33a, IAR59b, RBR2b, RBR109a, IAE71c, RBR2a, RBR1a, IAR166a, RBR53a, RBE39a, RBR204b, IAE174b
G 21	IAR96b, RBR6a, RBR53c, RBR157a, IAR167c, IAR171b, IAR195a, IAR171a, IAR221b, IAR167a, IAR59c, RBR209c, IAE198a, RBE39b, IAR195b
G 22	RBR134b, RBR159b, IAR121b, RBE137c, IAR171c, RBE137a
G 23	IAE198b
G 24	IAR221a, IAR221c, IAR167b, RBE110a, RBE110c, RBE110b
G 25	RBR29b, RBR209b, RBR209a
G 26	IAR195c
G 27	IAR191b
G 28	IAR191c, IAE99b

5.5 Caracterização Genética de Isolados Representativos

Isolados representativos foram aleatoriamente escolhidos a partir dos grupos de similaridade genética (Fig. 5) com o intuito de uma caracterização genética mais apurada. Para esse objetivo, decidiu-se analisar sequências de DNA do gene *recA* (recombinase A) e da região ITS do operon ribossomal como marcadores filogenéticos. Além disso, os genes simbióticos *nodC* (envolvido na síntese de fator Nod) e *nifH* (envolvido na biossíntese do complexo enzimático nitrogenase) também foram analisados (Tabela 7).

Tabela 8. Amplificação e sequenciamento dos genes

Isolados	<i>recA</i>	<i>nodC</i>	ITS	<i>nifH</i>
IAE71b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A-; S-
RBR6b	A+; S+	A+; S+	A+; S-	A-; S-
RBE40a	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A-; S-
IAE45c	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A-; S-
IAE45a	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAE45b*	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A-; S-
IAR33c	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAR64a*	A+; S-	A-; S-	A-; S-	A-; S-
IAR59a	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
RBE39b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAE20b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAE71a*	A+; S-	A+; S+	A+; S-	A+; S-
IAR146b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
RBR179a*	A+; S-	A+; S-	A+; S-	A-; S-
RBR134b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
RBE112a	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAE99b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAR91b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A-; S-
IAR91c	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
RBE85a	A+; S-	A-; S-	A-; S-	A-; S-
RBR129a	A+; S-	A+; S+	A-; S-	A+; S-
RBR109c	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A-; S-
RBE110a	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAE123a	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A-; S-
RBE135a	A-; S-	A+; S+	A+; S+	A+; S-
RBR204b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
RBR179b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAR191a	A-; S-	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAR167b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAE198b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAR195c	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAR216a	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAE174c	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
RBR209b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A-; S-
IAR191b	A+; S+	A+; S+	A+; S+	A+; S-
IAR33b	A+; S-	A+; S+	A+; S+	A-; S-
RBE110c	A+; S-	A+; S+	A+; S+	A+; S-

(A) amplificação; (S) sequenciamento; (+) amplificou, sequenciou; (-) não amplificou, não sequenciou; (*) isolados de crescimento rápido.

A primeira etapa da caracterização genética consistiu na amplificação do DNA alvo por meio de PCR usando *primers* específicos para cada sequência alvo (Tabela 8). Embora os experimentos de PCR tenham tido êxito para a maioria dos isolados/conjuntos de *primers*, para muitos isolados a amplificação do gene *nifH* não obteve sucesso, apresentando falhas nas reações ou apresentando múltiplos amplicons de diferentes tamanhos por ser um *primer* degenerado (ZEHR; MCREYNOLDS, 1989; POLY et al., 2001; LINHART; SHAMIR, 2002). O que impossibilitou o sequenciamento do gene *nifH* dos isolados neste estudo.

Em tentativa de amplificar o gene *nifH*, foram trocados os *primers* nifHF e nifHI por PolF e PolR (POLY et al., 2001) e a condição de PCR para: desnaturação inicial de 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de (desnaturação de 95°C durante 1 minuto, anelamento de 60°C durante 2 minutos e extensão de 72°C durante 2 minutos) e extensão final de 72°C durante 5 minutos. Assim como foi utilizado os *primers* nifHF e nifHI nesta condição de PCR acima e utilizado os *primers* PolF e PolR na condição de PCR na Tabela 4, sem sucesso em todas as alterações.

Para um futuro esforço na amplificação do gene *nifH* dos isolados deste estudo será realizada alteração na concentração de MgCl₂ e/ou na temperatura de anelamento utilizando a princípio os *primers* e a condição de PCR na Tabela 4.

Os amplicons dos genes *recA*, *nodC* e para a região ITS obtidos para os isolados (Tabela 8) foram sequenciados nos dois sentidos com os mesmos *primers* usados na sua amplificação e as sequências consenso foram montadas. Primeiramente, essas sequências montadas foram submetidas a análises Blast-n (ALTSCHUL et al., 1997) no intuito de identificar a existência de espécies/estirpes de bactérias geneticamente próximas nos bancos de dados do Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tabelas nos Anexos D, E e F).

As sequências de gene *recA* dos isolados utilizados nas análises filogenéticas foram comparadas no Blast-n (Anexo D) e sugerem que a maioria dos isolados pertence ao gênero *Bradyrhizobium*, exceto os isolados de crescimento rápido (Tabela em Anexo B), sugerindo pertencerem aos gêneros *Rhizobium* e *Burkholderia*. Fato que confirma suas características morfoulturais de acidificação ou neutralização do meio YMA e crescimento rápido. Esses isolados não foram utilizados na construção das árvores filogenéticas.

5.6 Análise Filogenética

As árvores filogenéticas foram construídas com base nas sequências da região ITS, dos genes *recA* e *nodC* dos isolados desse estudo (com exceção dos isolados de crescimento rápido), de genes de estirpes tipo de todas as espécies descritas do gênero *Bradyrhizobium* nos bancos de dados do Genbank, além das sequências dos isolados de origem de tecidos internos de raízes de cana-de-açúcar previamente obtidos (ROUWS et al., 2014), sendo os isolados que iniciam com a letra P (inclusive BR10266 (P4-7), BR10555 (P5-24), BR10556 (P7-18) e BR10280^T (P9-20)).

5.6.1 Análise filogenética da região ITS

A região ITS é um marcador do operon ribossomal amplamente usada para a caracterização abaixo do nível de gênero e mais informativo para distinguir entre estirpes de *Bradyrhizobium* que o gene 16S RNA. Para facilitar a visualização por causa de seu tamanho, a árvore filogenética da região ITS foi dividida entre os superclados *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum* (Figuras 6 e 7).

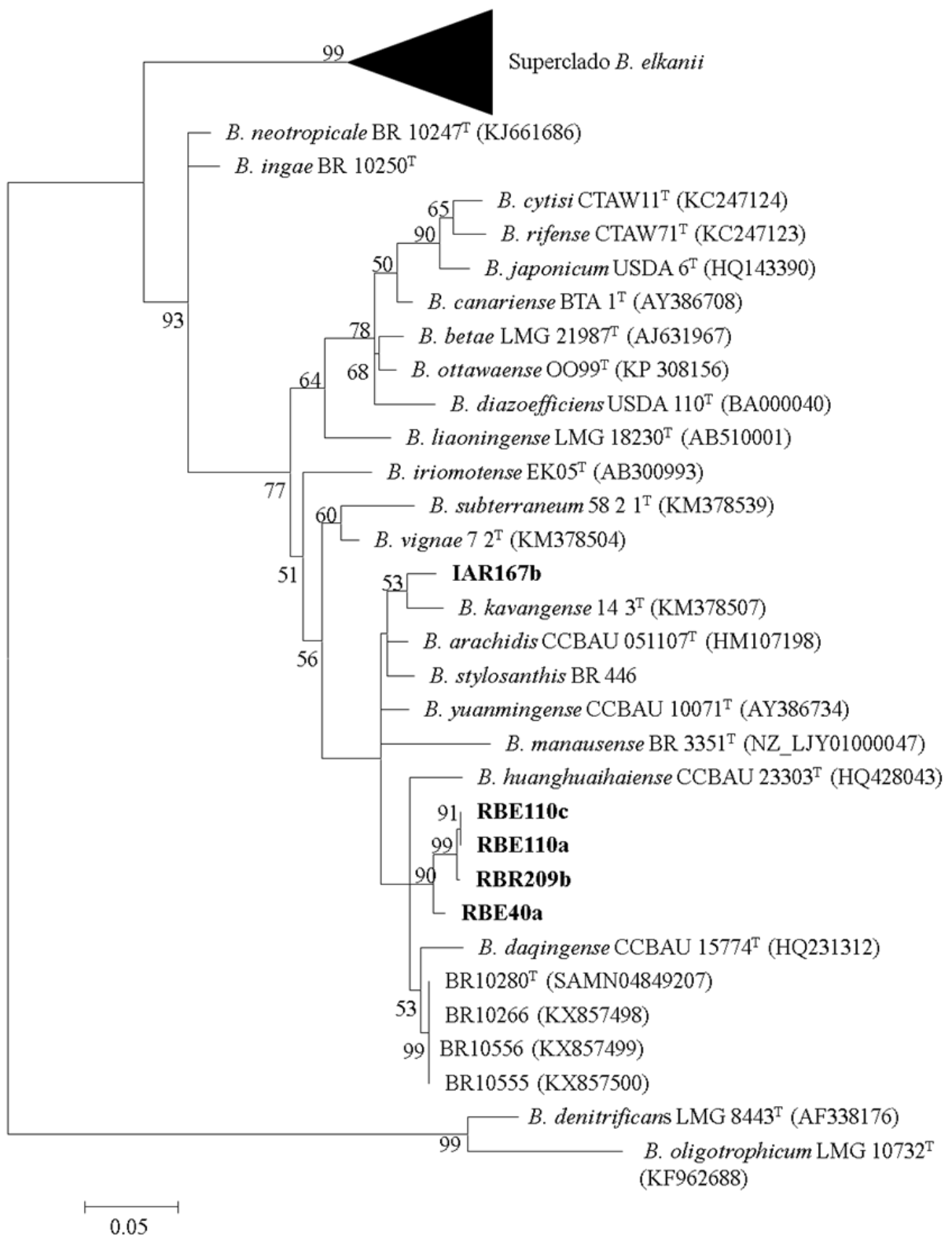


Figura 6. Representação do superclado *Bradyrhizobium japonicum*. Filograma *Maximum Likelihood* (ML) estimado a partir de 617 posições de nucleotídeos do espaçador interno transcrito (ITS) entre os genes 16S e 23S rRNA. Valores de *bootsrtap* são mostrados quando as relações apresentadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros + G + I como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA6. Isolados desse estudo obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas iscas estão mostrados em negrito. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por local.

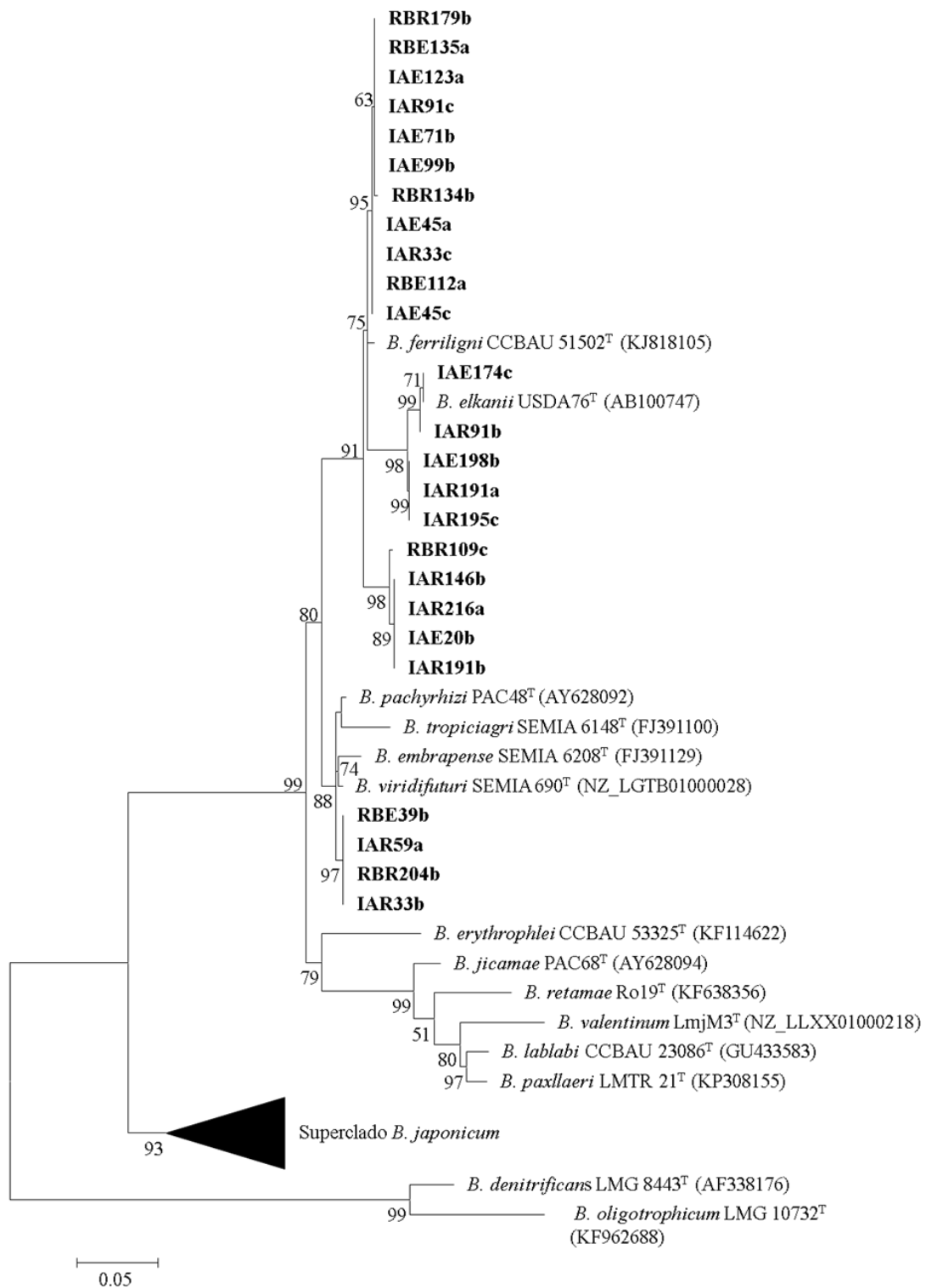


Figura 7. Representação do superclado *Bradyrhizobium elkanii*. Filograma *Maximum Likelihood* (ML) estimado a partir de 617 posições de nucleotídeos do espaçador interno transcrito (ITS) entre os genes 16S e 23S rRNA. Valores de *bootstrap* são mostrados quando as relações apresentadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros + G + I como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA6. Isolados desse estudo obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas iscas estão mostrados em negrito. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por local.

A árvore de ITS mostra que a maioria dos isolados representativos deste estudo pertence ao superclado de *Bradyrhizobium elkanii* e que os isolados são geneticamente diversos. Mesmo assim, vários isolados que apresentaram perfis de BOX PCR distintos, apresentaram sequência de ITS altamente semelhante.

Como exemplo, os isolados pertencentes ao G 15 (RBE40a), ao G 21 (RBE110a, RBE110c e IAR167b) e G 25 (RBR209b) possuem perfis de BOX PCR diferentes (Figura 5 e Tabela 7). Na árvore filogenética da região ITS estes mesmos isolados se encontram no superclado de *Bradyrhizobium japonicum* (Figura 6), formando uma sequência semelhante como no dendrograma de BOX PCR. O clado representado pelos isolados RBE110c, RBE110a, RBR209b e RBE40a se posiciona próximo ao clado que se encontra a estirpe BR10280^T (P9-20) de Rouws e colaboradores (2014) e Matos (2017).

O isolado IAR167b se posiciona afastado dos demais isolados no superclado *Bradyrhizobium japonicum*, posicionando-se mais próximo de *Bradyrhizobium kavangense* 14-3^T. Os isolados IAR167b, RBE110c, RBE110a, RBR209b e RBE40a foram posicionados próximos às espécies *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T, *Bradyrhizobium manausense* BR 3351^T, *Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107^T, *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071^T, *Bradyrhizobium stylosanthis* BR 446 e *Bradyrhizobium daqingense* CCBAU 15774^T.

No superclado de *Bradyrhizobium elkanii* (Figura 7) a maioria dos isolados deste estudo posicionaram-se em cladogramas distintos das espécies já descritas de *Bradyrhizobium*.

Os isolados IAE174c e IAR 91b se posicionaram dentro do clado de *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T indicando serem possivelmente o mesmo genótipo. Vale lembrar que esses dois isolados são de origem da cultivar IACSP95-5000. O clado que pertencem os isolados IAE198b, IAR191a e IAR195c também se posicionou próximo à *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T. Os cladogramas que pertencem os isolados RBR179b, RBE135a, IAE123a, IAR91c, IAE71b, IAE99b, RBR134b, IAE45a, IAR33c, RBE112a e IAE45c posicionaram-se próximos à *Bradyrhizobium ferriligni* CCBAU 51502^T. Os isolados RBR109c, IAR146b, IAR216a, IAE20b e IAR191b pertencem a um clado formado exclusivamente com os isolados deste estudo. Os isolados RBR204b, IAR33b, IAR59a e RBE39b formaram um clado próximo à *Bradyrhizobium viridifuturi* SEMIA 690^T e *Bradyrhizobium embrapense* SEMIA 6208^T.

5.6.2 Análise filogenética do gene *recA*

O *recA* é um gene *housekeeping* amplamente usado para classificação molecular de bactérias. A maioria dos isolados deste estudo posicionaram-se em cladogramas com isolados de Rouws e colaboradores (2014) e Matos (2017). Assim como na árvore da região ITS, a árvore do gene *recA* foi dividida entre os superclados *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum* (Figuras 8 e 9) para facilitar sua visualização. Nesta árvore, a maioria dos isolados foi posicionada no superclado *Bradyrhizobium elkanii*, como na árvore da região ITS. Os isolados IAR167b, RBE110a, RBR209b e RBE40a, foram posicionados novamente no superclado *Bradyrhizobium japonicum* conforme na árvore da região ITS. As estirpes pertencentes ao clado onde se posicionaram os isolados RBR209b, RBE110a e RBE40a são as mesmas em Matos et al. (2017) e também se posicionaram próximas à *Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107^T como nesse estudo.

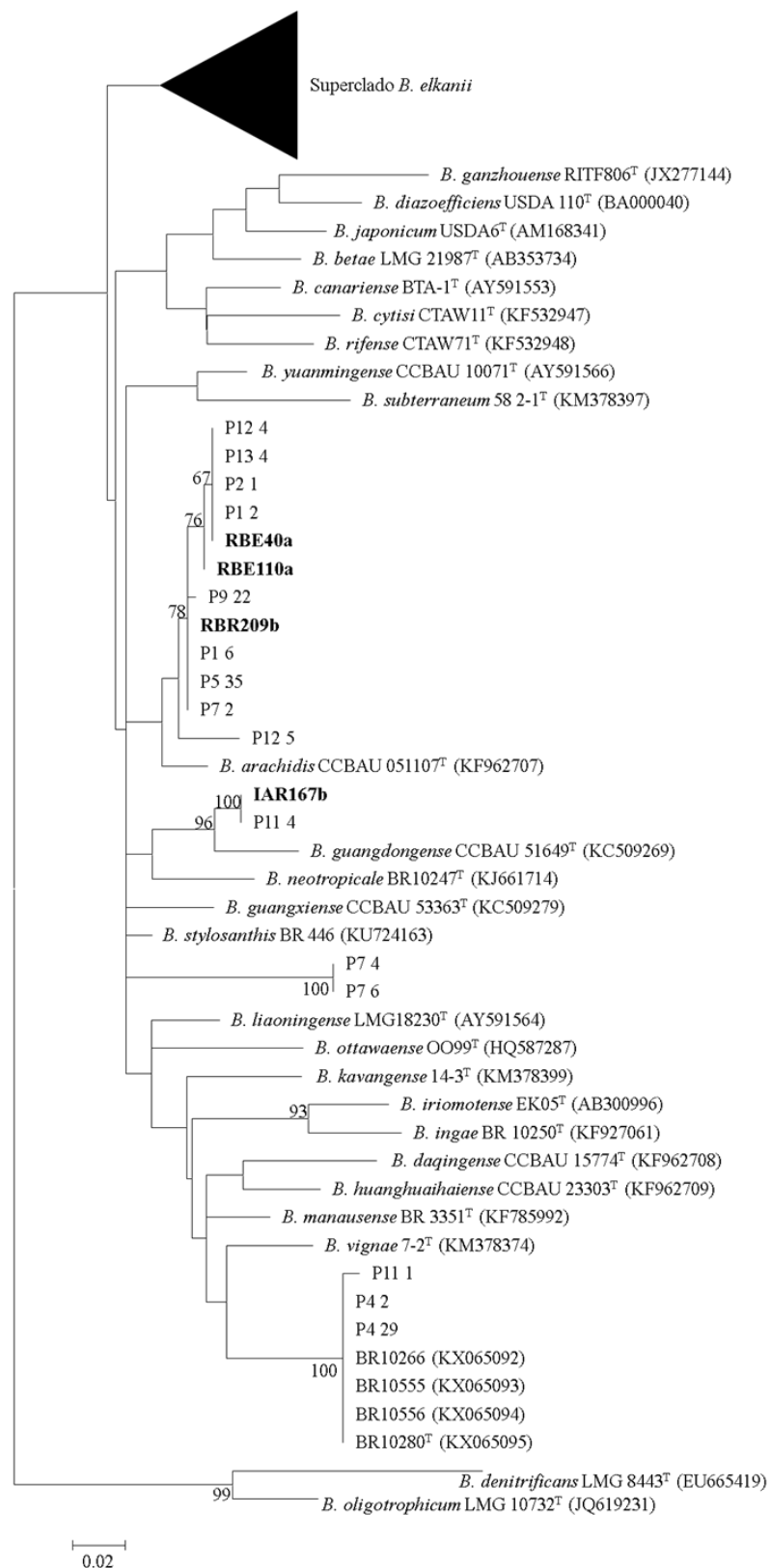


Figura 8. Representação do superclado *Bradyrhizobium japonicum*. Filograma *Maximum Likelihood* (ML) estimado a partir de 371 posições de pares de bases do gene *recA*. Valores de *bootsrtap* são mostrados quando as relações apresentadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo Tamura 3-parâmetros + G + I como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA6. Isolados desse estudo obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas iscas estão mostrados em negrito. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por local.

O isolado IAR167b se posicionou em um clado separado dos isolados deste estudo. Este isolado encontra-se no mesmo clado da estirpe de P11-4 com 100% de *bootstrap* e se posicionou próximo de *Bradyrhizobium guangdongense* CCBAU 51649^T como também em Matos (2017). Ao contrário da árvore da região ITS, os isolados deste estudo se posicionaram afastados do clado onde se encontra a estirpe BR10280^T de Rouws e colaboradores (2014) e Matos (2017).

Três cladogramas no superclado *Bradyrhizobium elkanii* (Figura 9) apresentaram somente isolados deste estudo. O primeiro clado formado pelos isolados RBR179b, IAE71b, IAR91c, IAR33c, RBR134b e IAE123a.

O segundo clado formado pelos isolados IAE45a, IAE45c e RBE112a. Este clado está próximo de *Bradyrhizobium ferriligni* CCBAU 51502^T.

E o terceiro clado formado por IAR216a, IAR191b, IAE20b, IAR146b e RBR109c. Estes isolados encontram-se em um mesmo clado na árvore da região ITS.

Os demais isolados se posicionaram em cladogramas juntamente com os isolados de Rouws e colaboradores (2014) e Matos (2017).

RBE39b, RBR6b, IAR59a e RBR204b formam um clado próximo à *Bradyrhizobium pachyrhizi* PAC48^T. IAE198b e IAR195c se posicionaram em um clado com 100% de *bootstrap* juntamente com os isolados de Rouws e colaboradores (2014) e Matos (2017), indicando serem possivelmente o mesmo genótipo. Os isolados IAE174c e IAR91b se posicionaram em um clado juntamente com os isolados de Rouws et al. (2014) e Matos (2017). Além disso, este clado se encontra próximo de *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76^T e concorda com a árvore ITS. O isolado IAE99b se posicionou em um clado com 98% de *bootstrap* juntamente com os isolados de Rouws e equipe (2014) e Matos (2017), indicando serem possivelmente o mesmo genótipo.

As sequências de gene *recA* posicionaram os isolados desse estudo no mesmo clado ou próximos aos isolados obtidos por Rouws et al. (2014), indicando uma proximidade filogenética. A detecção dos mesmos genótipos desse trabalho e de Rouws e colaboradores (2014) sugere certa afinidade dessas bactérias com cana-de-açúcar. Nesse sentido também se observa que vários genótipos isolados nos dois trabalhos são geneticamente distintos de outras espécies de *Bradyrhizobium* (Figuras 6, 7, 8 e 9).

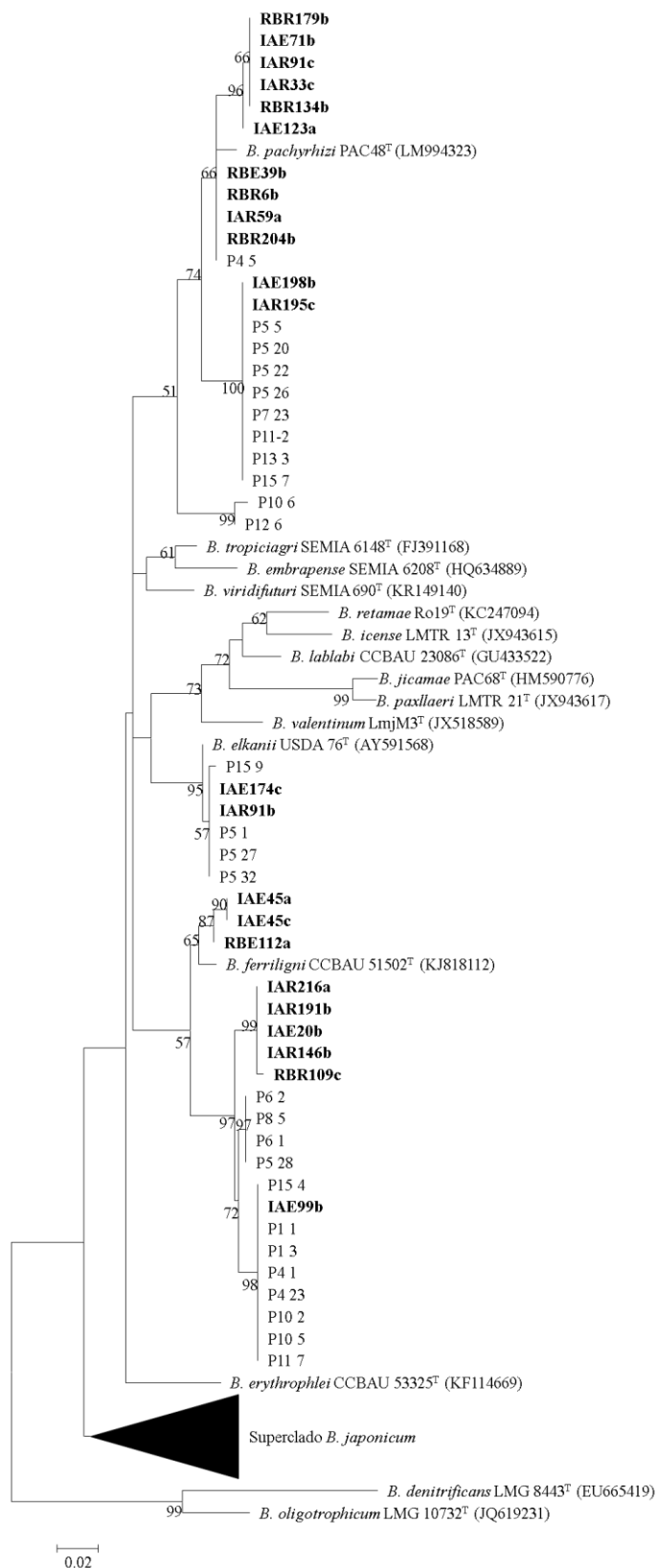


Figura 9. Representação do superclado *Bradyrhizobium elkanii*. Filograma *Maximum Likelihood* (ML) estimado a partir de 371 posições de pares de bases do gene *recA*. Valores de *bootsrtap* são mostrados quando as relações apresentadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo Tamura 3-parâmetros + G + I como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA6. Isolados desse estudo obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas iscas estão mostrados em negrito. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por local.

Os isolados RBE110a, RBR209b, RBE40a e IAR167b foram os únicos isolados deste estudo posicionando-se no superclado *Bradyrhizobium japonicum* nas árvores filogenéticas do gene *recA* e região ITS, com exceção do RBE110c que não foi sequenciado no gene *recA*.

As topologias das árvores filogenéticas obtidas a partir das sequências de gene *recA* e região ITS foram semelhantes entre as duas árvores.

5.6.3 Análise filogenética do gene *nodC*

As sequências do gene *nodC* (Figura 10) formaram clados exclusivos com representantes dos isolados em estudo, com exceção de IAR167b que se posicionou distante dos outros isolados. Observou-se um clado formado exclusivamente com isolados da cultivar IAC5P95-500 e dois clados exclusivos com isolados da cultivar RB867515.

O primeiro clado formado por RBR6b, RBR134b, RBE135a e RBR179b com valor de *bootstrap* de 100 %. Os isolados possuem origem em três blocos diferentes de experimento. Os isolados foram posicionados próximos à *Bradyrhizobium pachyrhizi* PAC48^T que forma nódulos efetivos em jicama (*Pachyrhizus erosus*) (RAMÍREZ-BAHENA et al., 2009).

O segundo clado foi formado pelos isolados RBE110a, RBE110c e RBR209b (os mesmos isolados presentes no superclado *Bradyrhizobium japonicum* vistos nas Figuras 6 e 8, exceto os isolados IAR167b e RBE40a). Os isolados possuem origem em dois blocos diferentes de experimento. Juntamente com RBE40a, se posicionaram em um clado próximo à espécie *Bradyrhizobium sacchari* representada pelas estirpes BR10266 (P4-7), BR10555 (P5-24), BR10556 (P7-18) e BR10280^T (P9-20) (MATOS et al., 2017).

O clado em que se encontram os isolados RBE110a, RBE110c, RBR209b e RBE40a e o clado em que se encontra a estirpe BR10280^T estão próximos ao clado formado por *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6^T, *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071^T, *B. diazoefficiens* USDA 110^T, *Bradyrhizobium daqingense* CCBAU 15774^T, *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T e *Bradyrhizobium ottawaense* OO99^T. Este posicionamento está de acordo com os estudos de Rouws et al. (2014) e Matos (2017). Vale lembrar que todas estas espécies conhecidas formam nódulos eficientes em soja (*Glycine max*) (YAO et al., 2002; ZHANG et al., 2012; DELAMUTA et al., 2013; WANG et al., 2013; YU et al., 2014).

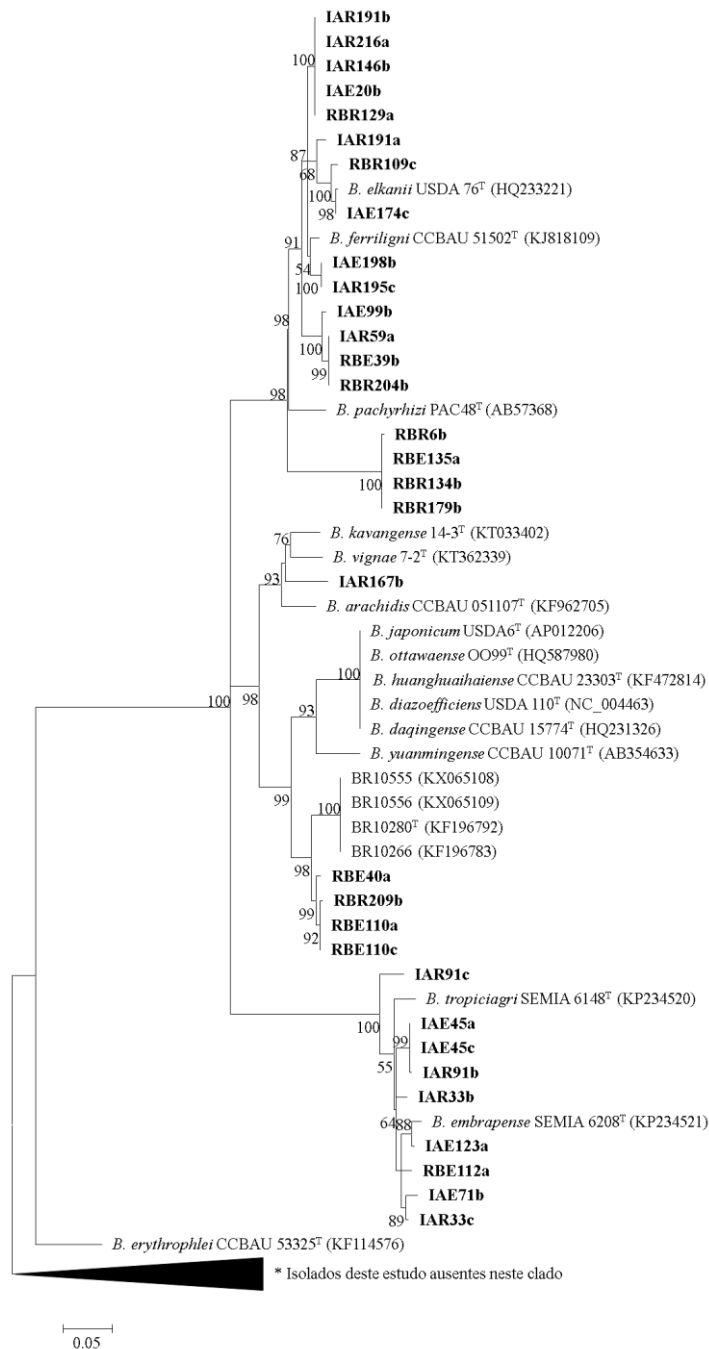


Figura 10. Filograma *Maximum Likelihood* (ML) estimado a partir de 438 posições de pares de nucleotídeos do gene *nodC*. Valores de *bootsrtap* são mostrados quando as relações apresentadas foram observadas em pelo menos 50% de 1000 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo Tamura 3-parâmetros + G + I, como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA6. Isolados desse estudo obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas iscas estão mostrados em negrito. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por local. * *Bradyrhizobium cytisi* CTAW11^T (EU597844); *Bradyrhizobium rifense* CTAW71^T (EU597853); *Bradyrhizobium canariense* BTA 1^T (AJ560653); *Bradyrhizobium neotropicale* BR 1024^T (KJ661727); *Bradyrhizobium ganzhouense* RITF806^T (JX292035); *Bradyrhizobium iriomotense* EK05^T (AB301000); *Bradyrhizobium manausense* BR 3351^T (KF786002); *Bradyrhizobium stylosanthis* BR 446^T (KU724160); *Bradyrhizobium ingae* BR 10250^T (KF927054); *Bradyrhizobium liaoningense* LMG 18230^T (GU263466); *Bradyrhizobium jicamae* PAC68^T (AB573869); *Bradyrhizobium lablabi* CCBAU 23086^T (GU433565); *Bradyrhizobium paxllaeri* LMTR 21^T (KF896160); *Bradyrhizobium icense* LMTR 13^T (KF896159); *Bradyrhizobium retamae* Ro19^T (KC247112); *Bradyrhizobium valentinum* LmjM3^T (JX514897).

O terceiro clado foi formado pelos isolados IAE45a, IAE45c e IAR91b, com origem em dois blocos diferentes de experimento. Este clado posicionou-se próximo à *Bradyrhizobium tropiciagri* SEMIA 6148^T, que possui alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio em soja perene (*Neonotonia wightii*) (DELAMUTA et al., 2015).

O isolado IAR167b se posicionou mais próximo de *Bradyrhizobium arachidis* CCBAU 051107^T, *Bradyrhizobium vignae* 7-2^T e *Bradyrhizobium kavangense* 14-3^T que induzem nódulos efetivos em amendoim (*Arachis hypogaea*), feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), feijão-bambara (*Vigna subterranea*), e lablab (*Lablab purpureus*) (WANG et al., 2013; GRÖNEMEYER et al., 2015, 2016).

Os isolados IAE198b e IAR195c continuam posicionados no mesmo clado como nas análises filogenéticas da região ITS e do gene *recA*. Além disso, posicionaram-se próximos de *Bradyrhizobium ferriligni* CCBAU 51502^T, que nodula a leguminosa arbórea *Erythrophleum fordii* (YAO et al., 2015). Os isolados IAR91c, IAR33b, IAE123a, RBE112a, IAE71b e IAR33c estão posicionados próximos de *Bradyrhizobium tropiciagri* SEMIA 6148^T e *Bradyrhizobium embrapense* SEMIA 6208^T, que induzem nódulos efetivos em soja perene (*Neonotonia wightii*) e desmódio (*Desmodium heterocarpon*) respectivamente (DELAMUTA et al., 2015).

5.7 Ensaio de Redução de Acetileno

Este ensaio se baseia no fenômeno que a nitrogenase, além de converter N₂ em NH₃ tem a capacidade de converter o acetileno em etileno, que pode ser prontamente detectado e quantificado por cromatografia gasosa (DILWORTH, 1966). O etileno é o único produto da redução do acetileno pela nitrogenase, ele não inibe a fixação de N e não é reduzido pela nitrogenase (HARDY et al., 1968).

Neste estudo, a utilização deste método teve como objetivo avaliar qualitativamente a atividade da nitrogenase nos isolados de *Bradyrhizobium* spp. obtidos em condições de vida livre.

Foi observada formação de película dispersa em todos os isolados cultivados no meio semi-sólido JMV modificado, indicando o crescimento dos isolados no meio de cultura. Uma característica de bactérias diazotróficas aeróbias é formarem exopolissacarídeos com a função de impedir a entrada de oxigênio na região de atividade da nitrogenase (SILVA, 2010), porém como foi adicionado extrato de levedura (uma fonte de N), ao meio utilizado, não é possível afirmar, nesse caso, que a presença de camada de biofilme indica que esses isolados fixam nitrogênio. Rouws e colaboradores (2014) explicaram que após a inoculação neste meio semi-sólido, as bactérias se encontrando em condições favoráveis, podem migrar para profundidades adequadas de concentração de oxigênio para que aconteça a FBN.

David e Fay (1977) indicam que o período de pré-incubação com acetileno deve ser breve o suficiente para a nitrogenase alcançar seu pico de atividade, mas insuficiente para alcançar seu esgotamento. Silva (2010) indica que o tempo ideal de exposição ao acetileno e o tempo ideal de crescimento dos isolados são as maiores dificuldades para a detecção da nitrogenase.

Os tratamentos sem injeção de acetileno e no controle negativo (sem bactéria) apresentaram valores nulos ou próximos do zero (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de etileno expressos em nmol/frasco dos isolados utilizados para o ensaio de redução de acetileno

Isolados	Repetição	Repetição	Repetição	Repetição	Repetição	Repetição
	1 com Acetileno	2 com Acetileno	3 com Acetileno	1 sem Acetileno	2 sem Acetileno	3 sem Acetileno
IAE20b	0,1350	0,1314	0,1242	0,0000	0,0018	0,0009
IAR59a	0,1827	0,1836	0,1548	0,0000	0,0000	0,0000
RBE40a	0,1170	0,1008	0,1224	0,0000	0,0000	0,0441
IAR216a	0,1350	0,1719	0,1917	0,0000	0,0018	0,0000
RBR204b	0,1368	0,1719	0,1692	0,0000	0,0000	0,0018
RBE39b	0,1719	0,2034	0,1863	0,0000	0,0000	0,0009
RBR134b	0,1179	0,1107	0,1044	0,0027	0,0531	0,0405
IAR191a	0,1404	0,1521	0,1404	0,0045	0,0441	0,0387
RBE110a	0,1017	0,1242	0,1161	0,0009	0,0108	0,0081
RBR209b	0,1440	0,1008	0,1062	0,0000	0,0081	0,0009
IAR167b	0,1899	0,4050	0,4050	0,0009	0,0018	0,0126
(+) ppe8 ^T	24642,0000	41031,0000	43704,0000	0,0009	0,0297	0,0009
(-)	0,0855	0,1494	0,1035	0,0009	0,0009	0,0000

O controle positivo, *Burkholderia tropica* Ppe8^T (REIS et al., 2004), apresentou níveis altos de redução de acetileno com valores entre 24 e 43 μ mol de etileno produzido por frasco.

Para todos os isolados do presente estudo, foram detectadas atividades de redução de acetileno muito baixas. Apenas o isolado IAR167b obteve um valor que destacou entre os outros, mesmo assim produzindo entre 0,18 e 0,4 nmol etileno/frasco. Foi possível observar que os isolados do gênero *Bradyrhizobium* deste estudo e do estudo de Rouws e colaboradores (2014) não possuem altas taxas de fixação de nitrogênio comparadas com *Burkholderia tropica* Ppe8^T utilizada como controle positivo em ambos os trabalhos. Vale observar que os isolados deste estudo obtiveram resultados muito inferiores aos obtidos por Rouws et al. (2014).

Keister (1975) relatou a capacidade de algumas estirpes de *Bradyrhizobium* spp como a 32H1 em fixar nitrogênio em condições *in vitro* e algumas não, sendo que essa capacidade varia de acordo com fontes de C ou N adequadamente disponíveis no meio de cultura (KURZ; LA RUE, 1975). *Bradyrhizobium* possuem elevada eficiência na FBN quando associadas com leguminosas (BHATTACHARJEE et al., 2008). Relatos de *Bradyrhizobium* isolados em não leguminosas como arroz (*Oryza breviculata*) (CHARENTREUIL et al., 2000), batata-doce (*Ipomoea batatas*) (TERAKADO-TONOOKA et al., 2013), beterraba (*Beta vulgaris*) (RIVAS et al., 2004) e cana-de-açúcar (ROUWS et al., 2014) demonstram que as bactérias deste gênero são capazes de colonizar vários hospedeiros além das leguminosas. Em associação com não leguminosas, as bactérias deste gênero possivelmente atuam como promotoras de crescimento vegetal através da FBN, como na batata-doce (*Ipomoea batatas*) (TERAKADO-TONOOKA et al., 2013) e cana-de-açúcar (ROUWS et al., 2014, 2015; MATOS et al., 2015).

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo confirmam a presença de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* na rizosfera e nos tecidos internos das raízes de diferentes cultivares de cana-de-açúcar (RB867515 e IACSP95-5000). Estima-se uma densidade populacional de *Bradyrhizobium* na rizosfera de ambas as cultivares de no mínimo 15625 rizóbios g⁻¹ de raiz e entre 125 e 625 rizóbios g⁻¹ de raiz nos tecidos internos (endosfera). Não é observado nenhum efeito claro de cultivar vegetal sobre a densidade e composição das populações de *Bradyrhizobium*. Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* em cana-de-açúcar são geneticamente diversas e alguns genótipos se destacam como predominantes. Os isolados representativos de *Bradyrhizobium* utilizados no ensaio de redução de acetileno apresentam baixa atividade da nitrogenase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES, B. J. R.; JANTALIA, C. P.; MADARI, B. E.; MACHADO, P. L. O. A.; FRANCHINI, J. C.; SANTOS, H. P. dos; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Emissões de óxido nitroso de solos pelo uso de fertilizantes nitrogenados em áreas agrícolas. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia-CNPAB. Comunicado Técnico**. 2010.
- ANDO, S.; GOTO, M.; MEUNCHANG, S.; THONGRA-AR, P.; FUJIWARA, T.; HAYASHI, H.; YONEYAMA, T. Detection of *nifH* sequences in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). **Soil Science & Plant Nutrition**, v. 51, n. 2, p. 303-308, 2005.
- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbionos solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, p.45-62, 1994.
- ANTÔNIO, C. de S. **Ocorrência de bactérias endofíticas associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas nos Estados: Alagoas e Pernambuco**. 2010. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.
- ANTUNES, J. E. L. **Bactérias diazotróficas endofíticas em Cana-de-açúcar: estratégia para uma agricultura sustentável**. 2016. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo). Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2016.
- AOKI, S.; ITO, M.; IWASAKI, W. From β -to α -proteobacteria: the origin and evolution of rhizobial nodulation genes *nodIJ*. **Molecular biology evolution**. v. 30, n. 11, p. 2494-2508, 2013.
- ASIS JR., C. A.; ADACHI, K.; AKAO, S. N_2 fixation in sugarcane and population of N_2 -fixing endophytes in stem apoplast solution. **Philippine Journal of Crop Science**, v. 29, n. 2, p. 45-58, 2004.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.911-922, 1997.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, n. 1-2, p. 413-431, 2014.
- BARCELLOS, F. M.; HUNGRIA, M. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo da diversidade e à identificação de bactérias e fungos de interesse agrícola. In: FIGUEIREDO, M. V.; B, BURITY, H. A; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Biotecnologia aplicada à**

agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE: Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), p. 191-221, 2010.

BARILLOT, C. D. C.; SARDE, C. O.; BERT, V.; TARNAUD, E.; COCHET, N. A. standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 471-476, 2013.

BECKERS, B.; OP DE BEECK, M.; WEYENS, N.; BOERJAN, W.; VANGRONSVELD, J. Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. **Microbiome**, v. 5, p. 25, 2017.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 199-209, 2008.

BIANCO, P. R.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. *RecA* protein. **eLS**, 11 p. 1998.

BISWAS, B.; GRESSHOFF, P. M. The role of symbiotic nitrogen fixation in sustainable production of biofuels. **International Journal of Molecular Science**, v. 15, p. 7380-7397, 2014.

BLODGETT, R. J.; GARTHRIGHT, W. E. Several MPN models for serial dilutions with suppressed growth at low dilutions. **Food Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 91-99, 1998.

BODDEY R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE A. S.; ALVES B. J.; URQUIAGA S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugarcane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28. n 9, p. 889–895, 2001.

BODDEY, R. M.; KNOWLES, R. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with *gramineae*. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 6, n. 3, p. 209-266, 1987.

BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: a key to energetically viable biofuel production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, n. 3, p. 263-279, 1995.

BODDEY, R. M.; DE OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; DE OLIVARES, F. L.; BALDANI, V.L.D.; DÖEBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant Soil**, v. 174, p. 195–209, 1995.

BOHLOOL, B. B.; LADHA, J. K.; GARRITY, D. P.; GEORGE, T. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. **Plant Soil**, v. 141, p. 1-11, 1992.

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Advances in Agronomy**, v. 66, 1999.

BURBANO, C. S.; LIU, Y.; RÖSNER, K. L.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J.; REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental microbiology reports**, v. 3, n. 3, p. 383-389, 2011.

CARDINALE, M.; BRUSETTI, L.; QUATRINI, P.; BORIN, S.; PUGLIA, A. M.; RIZZI, A.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C.; CORSELLI, C.; DAFFONCHIO, D. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 6147-6156, 2004.

- CARVALHO, T. L. G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R. M.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 19, p. 5631-5642, 2014.
- CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.; BÂ, A.; GILLIS, M.; DE LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5437-5447, 2000.
- CHAPARRO, J. M.; BADRI, D. V.; VIVANCO, J. N. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. **The ISME Journal**, n. 8, p. 790–803, 2014.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A. V. O.; FILGUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 62-89, 2011.
- CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, 2001.
- CHERKASOV, N.; IBHADON, A. O.; FITZPATRICK, P. A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 90, p. 24-33, 2015.
- CHI, F.; SHEN, S. H.; CHENG, H. P.; JING, Y. X.; YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7271-7278, 2005.
- CHRISTENSEN, H.; KUHNERT, P.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, n. 54, p. 1601-1609. 2004.
- CLARK, F. E. Soil microorganisms and plant roots. **Advances in Agronomy**, v.1, p. 241-288, 1949.
- COCHRAN, W. G. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number". **Biometrics**, v. 6, n. 2, p. 105-116, 1950.
- COELHO, M.; R. R.; DE VOS, M.; CARNEIRO, N. P.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, E.; SELDIN, L. Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. **FEMS microbiology letters**, v. 279, n. 1, p. 15-22, 2008.
- CONAB– Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Safra 2016/2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_30_01_boletim_cana_portugues_-3o_lev_-16-17.pdf> Acesso em: 09/02/2017.

- CORDEIRO, M. C. R. Biotecnologia e diagnósticos moleculares. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.195-216. 2011.
- CULLER, H. F.; MOTA, C. M.; ABE, C. M.; ELIAS, W. P.; SIRCILI, M. P.; FRANZOLIN, M. R. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- DALY, K. R.; KEYES, S. D.; MASUM, S.; ROOSE, T. Image-based modelling of nutrient movement in and around the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 4, p. 1059–1070, 2016.
- DALY, K. R.; MOONEY, S. J.; BENNETT, M. J.; CROUT, N. M. J.; ROOSE, T.; TRACY, S. R. Assessing the influence of the rhizosphere on soil hydraulic properties using X-ray computed tomography and numerical modelling. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 8, p. 2305–2314, 2015.
- DANTAS, D. N. **Uso da biomassa de cana-de-açúcar para geração de energia elétrica: análise energética, exergética e ambiental de sistemas de cogeração em sucroalcooleiras do interior paulista**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2010.
- DAVID, K. A; FAY, P. Effects of long-term treatment with acetylene on nitrogen-fixing microorganisms. **Applied and environmental microbiology**, v. 34, n. 6, p. 640-646, 1977.
- DAVIS, K. E. R.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P. H. *Acidobacteria*, *Rubrobacteridae* and Chloroflexi are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 3, p. 798-805, 2011.
- 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, n. 9, p. 3342-3351, 2013.
- 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, n. 2, p. 698-710, 2012.
- DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, 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, n. 12, p. 4424-4433, 2015.
- DESBROSSES, G. J.; STOUGAARD, J. Root nodulation: a paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. **Cell Host & Microbe**, v. 10, n. 4, p. 348-358, 2011.
- DESSAUX, Y.; GRANDCLÉMENT, C.; FAURE, D. Engineering the Rhizosphere. **Trends in Plant Science**, v.21, n. 3, p. 266-278, 2016.
- DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 127, n. 2, p. 285-294, 1966.

- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621-631, 2004.
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 771-774, 1997.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e cultura**, v. 44, n. 5, p. 310-313, 1992.
- DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110), 38 p. 1999.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M.; DART, P. J. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. **Plant and Soil**, v. 37, n. 1, p. 191-196, 1972.
- DRAPCHO, D. L.; SISTERTON, D.; KUMAR, R. Nitrogen fixation by lightning activity in a thunderstorm. **Atmospheric Environment**, v. 17, n. 4, p. 729-734, 1983.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
- EISEN, J. A. The *RecA* protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of *RecAs* and 16S rRNAs from the same species. **Journal of molecular evolution**, v. 41, n. 6, p. 1105-1123, 1995.
- ELMERICH, C. Historical perspective: from bacterization to endophytes. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**, The Netherlands: Springer, p. 1-20. 2007.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791. 1985.
- FETT, W. F.; COOKE, P. H. A survey of native microbial aggregates on alfalfa, clover and mung bean sprout cotyledons for thickness as determined by confocal scanning laser microscopy. **Food Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 253-259, 2005.
- FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTTER, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, H. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 83-99, 2012.
- FISHER, R. F.; LONG, S. R. *Rhizobium*-plant signal exchange. **Nature**, v. 357, p. 655-660. 1992.
- FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. S. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereineriae*, microossimbiote de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, v. 33, n. 2, p. 215-226, 2009.
- FLORENTINO, L. A.; SOUSA, P. M. de; SILVA, J. S.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. de S. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1113-1123, 2010.
- FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and soil**, v. 321, p. 35-59, 2009.

- GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 2, p. 280-300, 2004.
- GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the manual. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Springer New York, p. 119-166. 2001.
- GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. Family VII. *Bradyrhizobiaceae* fam. nov. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY G. M. (editors). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2, 2 ed. (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria*), Springer, New York, p. 438. 2005.
- GARTHRIGHT, W. E.; BLODGETT, R. J. FDA's preferred MPN methods for standard, large or unusual tests, with a spreadsheet. **Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 439-445, 2003.
- GEREMIA, R. A.; MERGAERT, P.; GEELEN, D.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. The *NodC* protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 7, p. 2669-2673, 1994.
- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012.
- GOLDING, A. L.; DONG, Z. Hydrogen production by nitrogenase as a potential crop rotation benefit. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, p. 101-121, 2010.
- GONZALEZ-LOPEZ, J.; SALMERON, V.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. Amino acids and vitamins produced by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically-defined media and dialysed soil media. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 15, n. 6, p. 711-713, 1983.
- GOPALAKRISHNAN, S.; SATHYA, A.; VIJAYABHARATHI, R.; VARSHNEY, R. K.; LAXMIPATHI GOWDA, C. L.; KRISHNAMURTHY, L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 355-377, 2015.
- GOTTEL, N. R.; CASTRO, H. F.; KERLEY, M.; YANG, Z.; PELLETIER, D. A.; PODAR, M.; KARPINETS, T.; UBERBACHER, E.; TUSKAN, G. A.; VILGALYS, R.; DOKTYCZ, M. J.; SCHADT, C. W. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 17, p. 5934-5944, 2011.
- GRÖNEMEYER, J. L.; HUREK, T.; BÜNGER, W.; REINHOLD-HUREK, B. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 1, p. 62-69, 2016.
- 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, n. 12, p. 4886-4894, 2015.
- GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, 2012.
- HAAG, A. F.; ARNOLD, M. F. F.; MYKA, K. K.; KERSCHER, B.; DALL'ANGELO, S.; ZANDA, M.; MERGAERT, P.; FERGUSON, G. P. Molecular insights into bacteroid

development during *Rhizobium*-legume symbiosis. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 3, p. 364-383, 2013.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbial**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HALVORSON, H. O.; ZIEGLER, N. R. Application of statistics to problems in bacteriology: I. A means of determining bacterial population by the dilution method. **Journal of Bacteriology**, v. 25, n. 2, p. 101, 1933.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C.; HOLSTEN, R. D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 47-81, 1973.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant physiology**, v. 43, n. 8, p. 1185-1207, 1968.

HARTMANN, A.; SCHMID, M.; VAN TUINEN, D.; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. **Plant Soil**, n. 321, p. 235-257. 2009.

HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1-18, 2008.

HINSINGER, P.; BENGOUGH A. G.; VETTERLEIN, D.; YOUNG, I. M. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. **Plant and soil**, v. 321, p. 117-152, 2009.

HUANG, X. F.; CHAPARRO, J. M.; REARDON, K. F.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; VIVANCO, J. M. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. **Botany**, v. 92, p. 267-275, 2014.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular microbiology**, v. 5, n. 4, p. 825-834, 1991.

HUNGRIA, M.; BODDEY, L. H.; SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, n. 4, p. 393-399, 1998.

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; DELAMUTA, J. R. M. *Bradyrhizobium*, the ancestor of all rhizobia: phylogeny of housekeeping and nitrogen-fixation genes. In: BRUIJN, F. J. **Biological nitrogen fixation**. John Wiley & Sons Inc, v. 1, p. 191-202, 2015.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; CAMPO, R. J. **A inoculação da soja**. EMBRAPA-CNPSo; Brasília, DF: EMBRAPA-CPAC, 28 p., 1997.

- JENSEN, E. S.; HAUGGAARD-NIELSEN, H. How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 177-186, 2003.
- JESUS; E. da C.; MOREIRA, F. M de S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D. e OLIVEIRA, M. S. de. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.
- JONES, F. P.; CLARK, I. M.; KING, R.; SHAW, L. J.; WOODWARD, M. J.; HIRSCH, P. R. Novel European free-living, non-diazotrophic *Bradyrhizobium* isolates from contrasting soils that lack nodulation and nitrogen fixation genes—a genome comparison. **Scientific reports**, v. 6, 2016.
- JORDAN, D. C. NOTES: 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 and Evolutionary Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 136-139, 1982.
- KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; KATO, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KIYOKAWA, C.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MOCHIZUKI, Y.; NAKAYAMA, S.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKEUCHI, C.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA research**, v. 7, n. 6, p. 331-338, 2000.
- KEISTER, D. L. Acetylene reduction by pure cultures of Rhizobia. **Journal of bacteriology**, v. 123, n. 3, p. 1265-1268, 1975.
- KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v.5, p.408-418, 1995.
- 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, n. 6, p. 501-505, 1992.
- LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 981-993, 2001.
- LAM, H. M.; COSCHIGANO, K. T.; OLIVEIRA, I. C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G. M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual review of plant biology**, v. 47, n. 1, p. 569-593, 1996.
- LEGHARI, S. J.; WAHOCHO, N. A.; LAGHARI, G. M.; LAGHARI, A. H.; BHABHAN, G. M.; TALPUR, K. H.; BHUTTO, T. A.; WAHOCHO, S. A.; LASHARI, A. A. role of Nitrogen for plant growth and development: A review. **Advances in Environmental Biology**, v.10, n. 9, p. 209-218, 2016.
- LI, Q. Q.; WANG, E. T.; ZHANG, Y. Z.; ZHANG, Y. M.; TIAN, C. F.; SUI, X. H.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Diversity and biogeography of rhizobia isolated from root nodules of *Glycine max* grown in Hebei Province, China. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 4, p. 917-931, 2011.

- LIMA, A. A. **Caracterização e seleção de rizóbios de mucuna**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciências do solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2009.
- LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ^{15}N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 165-170, 1987.
- LINHART, C.; SHAMIR, R. The degenerate primer design problem. **Bioinformatics**, v. 18, n. suppl 1, p. S172-S181, 2002.
- LIU, J.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. **Systematic and applied microbiology**, v. 28, n. 5, p. 465-477, 2005.
- LÖHNIS, F.; HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **Journal Agricultural Research**. Washington, v.20, p.543-556, 1921.
- LOUREIRO, M. de F. Caracterização das estirpes por técnicas moleculares: o uso dos métodos de PCR e RAPD. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, p.45-62, 1994.
- MARELLA, S. Bacterial endophytes in sustainable crop production: applications, recent developments and challenges ahead. **International Journal of Life Sciences Research**, v. 2, n. 2, p. 46-56, 2014.
- MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; BALDANI, J. I. **Fixação biológica de Nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Seropédica, 34p. Série Documentos. Embrapa Agrobiologia, 1999.
- MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J., MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D. A.; BOULNOIS, G. J.; CLAVERYS, J. P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 13, p. 3479-3483, 1992.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, S. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v. 105, p. 1141–1157, 2010.
- MATOS, G. F. **Caracterização taxonômica e funcional de novas estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de cana-de-açúcar**. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.
- MATOS, G. F.; ZILLI, J. E.; ARAÚJO, J. L. S., PARMA, M. M.; MELO, I. S.; RADL, V.; BALDANI, J. I., ROUWS, L. F. M. *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating bacterium isolated from sugarcane roots. **Archives of Microbiology**, p. 1-8, 2017.
- MATOS, G. F.; SANTOS, S. G.; BAHIA, P. P.; COELHO, M. R. R.; BALDANI, J. I.; ROUWS, J. R. C., REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; ROUWS, L. F. M. Positive effects of endophytic (*Bradyrhizobium* isolates on sugarcane sett germination and root growth under glass house conditions. In: **10th International PGPR WorKshop, 2015, Liège**. From Omics to the Field, 2015.

MCCRADY, M. H. The numerical interpretation of fermentation-tube results. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 183-212, 1915.

MENDES, C. A. **Construção de um modelo de seleção genômica ampla para canade-açúcar (*Saccharum spp.*) no contexto do programa de melhoramento da RIDESA - Goiás**. 2015. 79 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

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, n. 12, p. 3052-3067, 2011.

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 *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 12, p. 2934-2950, 2009a.

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

MILIUTE, I.; BUZAITE, O.; BANIULIS, D.; STANYS, V. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. **Zemdirbyste-Agriculture**, v. 102, n. 4, p. 465-478, 2015.

MIRANDA-SÁNCHEZ, F.; RIVERA, J.; VINUESA, P. Diversity patterns of *Rhizobiaceae* communities inhabiting soils, root surfaces and nodules reveal a strong selection of rhizobial partners by legumes. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2375-3291, 2015.

MOLOUBA, F.; LORQUIN, J.; WILLEMS, A.; HOSTE, B.; GIRAUD, E.; DREYFUS, B.; GILLIS, M.; DE LAJUDIE, P.; MASSON-BOIVIN, C. Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3084-3094, 1999.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2.ed. atual. e ampl., Larvas: Editora UFLA, MG, 729 p. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; PEREIRA, E. G. Microsymbionts: Rhizobia. In: SWIFT, M.; BIGNELL, D. (Ed.). **Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice**. Bogor, Indonesia, p. 19-24, 2001.

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

MUS, F.; CROOK, M. B.; GARCIA, K.; COSTAS, A. G.; GEDDES, B. A.; KOURI, E. D.; PARAMASIVAN, P.; RYU, M.; OLDROYD, G. E. D.; POOLE, P. S.; UDVARDI, M. K.; VOIGT, C. A.; ANÉ, J.; PETERS, J. W. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3698-3710, 2016.

NEYRA, C. A.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. **Advances in Agronomy**, v. 29, p. 1-38, 1977.

NORRIS, D. O.; DATE, R. A. Legume bacteriology. In: SHAM, N. H.; BRYAN, W. W. (Ed.). **Tropical pasture research: principles and methods**. Hurley: Commonwealth Bureau

of Pastures and Field Crops, (Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops. Bulletin, 51), p.134-174, 1976.

O'BRIAN, M. R. Heme synthesis in the rhizobium-legume symbiosis: a palette for bacterial and eukaryotic pigments. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 9, p. 2471-2478, 1996.

ODEE, D. W.; SUTHERLAND, J. M.; MAKATIANI, E. T.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. I. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, v. 188, n. 1, p. 65-75, 1997.

ODUM, E. P. **Ecologia**, ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 434 p, 1988.

OHKUMA, M.; NODA, S.; KUDO, T. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4926-4934, 1999.

OKUBO, T.; FUKUSHIMA, S.; MINAMISAWA, K. Evolution of *Bradyrhizobium-Aeschynomene* Mutualism: Living Testimony of the Ancient World or Highly Evolved State?. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 12, p. 2000-2007, 2012.

OKUBO, T.; PIROMYOU, P.; TITTABUTR, P.; TEAUMROONG, N.; MINAMISAWA, K. Origin and Evolution of Nitrogen Fixation Genes on Symbiosis Islands and Plasmid in *Bradyrhizobium*. **Microbes and Environments**, v. 31, n. 3, p. 260-267, 2016.

OLDROYD, G. E. D; DOWNIE, J. A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 519-546, 2008.

OLDROYD, G. E. D.; MURRAY, J. D.; POOLE, P. S.; DOWNIE, J. A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annual review of genetics**, v. 45, p. 119-144, 2011.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1, p. 23-32, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, n. 2, p. 205-215, 2002.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; VINUESA, P.; ZUÑIGA-DÁVILA, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 253-262, 2006.

OTT, T.; VAN DONGEN, J. T.; GÜNTHER, C.; KRUSELL, L.; DESBROSSES, G.; VIGEOLAS, H.; BOCK, V.; CZECHOWSKI, T.; GEIGENBERGER, P.; UDVARDI, M. K. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. **Current Biology**, v. 15, n. 6, p. 531-535, 2005.

PAJARES, S.; BOHANNAN, B. J. M. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 7; 1045, 20 p., 2016.

PATI, B. R.; SENGUPTA, S.; CHANDRA, A. K. Studies on the amino acids released by phyllosphere diazotrophic bacteria. **Microbiological research**, v. 149, n. 3, p. 287-290, 1994.

PATWARDHAN, A.; RAY, S.; ROY, A. Molecular markers in phylogenetic studies-A Review. **Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology**, v. 2, n. 2, 2014.

PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 25-35, 2008.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, v. 4, n. 2, p. 439-473, 2007.

PEREIRA, W. **Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciências do solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2011.

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. **Aspectos genéticos e moleculares na interação entre organismos patogênicos e diazotróficos em cana-de-açúcar**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 41 p. (Embrapa Agrobiologia, documentos, 233), 2007.

PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 763-770, 2004.

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.

PII, Y.; MIMMO, T.; TOMASI, N.; TERZANO, R.; CESCO, S.; CRECCHIO, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 4, p. 403-415, 2015.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; 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, n. 1, p. 95-103, 2001.

POST, W. M.; PASTOR, J.; ZINKE, P. J.; STANGENBERGER, A. G. Global patterns of soil nitrogen storage. **Nature**, v. 317, p. 613-616, 1985.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **PROGRAMA ABC: Agricultura de Baixo Carbono**. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/plano-abc/plano-abc-agricultura-de-baixa-emissao-de-carbono>>. Acesso em: 13/02 /2017.

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*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 8, p. 1929-1934, 2009.

RAMOS, E. T. de A. **Calogênese e Embriogênese Somática de Cana-de-açúcar, variedade RB867515: Otimização de Protocolo**. 2014. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, v. 42, p. 489-512, 2011.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in microbiology**, v. 6, n. 4, p. 139-144, 1998.

REIS JUNIOR, F. B. dos; MENDES, I. D. C., TEIXEIRA, K. R. D. S.; REIS, V. M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de Microrganismos do solo. **Planaltina, DF: Embrapa Cerrados**, 2002.

- REIS JUNIOR, F. B. dos; SILVA, L. G. da; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 985-994, 2000.
- REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, n. 54, p. 2155–2162, 2004.
- REIS, V. M.; LEE, S.; KENNEDY, C. Biological nitrogen fixation in sugarcane. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**. The Netherlands: Springer, p. 213-232. 2007.
- RICE, W. A.; PAUL, E. A. The acetylene reduction assay for measuring nitrogen fixation in waterlogged soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 17, n. 8, p. 1049-1056, 1971.
- RIVAS, R.; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. **Microbiology Insights**, v. 2, p. 51, 2009b.
- RIVAS, R.; MARTENS, M.; DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 101-110, 2009a.
- 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. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1271-1275, 2004.
- ROESCH, L. F. W.; CAMARGO, F. A.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant and soil**, v. 302, n. 1-2, p. 91-104, 2008.
- ROUWS, L. F. M.; LEITE, J.; 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, n. 4, p. 354-363, 2014.
- ROUWS, L. F. M.; FISCHER, D.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Culture-Independent Assessment of Diazotrophic Bacteria in Sugarcane and Isolation of *Bradyrhizobium* spp. from Field-Grown Sugarcane Plants Using Legume Trap Plants. In: BRUJIN, F. J. **Biological Nitrogen Fixation**, v. 2, 1 ed., p. 955-966, 2015.
- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS microbiology letters**, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008.
- SACHS, J. L.; KEMBEL, S. W.; LAU, A. H.; SIMMS, E. L. In situ phylogenetic structure and diversity of wild *Bradyrhizobium* communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4727-4735, 2009.
- SACHS, J. L.; RUSSELL, J. E.; HOLLOWELL, A. C. Evolutionary instability of symbiotic function in *Bradyrhizobium japonicum*. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. 1-10, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026370>>. Acesso em: 01/04 /2017.

- SACHS, J. L.; RUSSELL, J. E.; LII, Y. E.; BLACK, K. C.; LOPEZ, G.; PATIL, A. S. Host control over infection and proliferation of a cheater symbiont. **Journal of evolutionary biology**, v. 23, n. 9, p. 1919-1927, 2010.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.
- SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of botany**, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.
- SANTOS, D. G. dos. **Cultivo de bactérias da rizosfera da cana-de-açúcar e a interferência dos exsudatos da planta em seu desenvolvimento**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP. 86 p., 2014.
- SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G., OROZCO-MOSQUEDA, M. del C.; GLICK B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological research**, v. 183, p. 92-99, 2016.
- SARITA, S.; SHARMA, P. K.; PRIEFER, U. B.; PRELL, J. Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 1, p. 1-11, 2005.
- SHAY, P. E.; WINDER, R. S.; TROFYMOW, J. A. Nutrient-cycling microbes in coastal Douglas-fir forests: regional-scale correlation between communities, *in situ* climate, and other factors. **Frontiers in Microbiology**, 6:1097, 2015.
- SHRIDHAR, B. S. Review: nitrogen fixing microorganisms. **International Journal of Microbiological Research**, v. 3, n. 1, p. 46-52, 2012.
- SILVA, A. T. B.; SPERS, R. G.; WRIGHT, J. T. C.; COSTA, P. R. Cenários prospectivos para o comércio internacional de etanol em 2020. **Revista de Administração**, v. 48, n. 4, p. 727-738, 2013.
- SILVA, M. C. P. da. **Seleção de estirpes eficientes para fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento em plantas da espécie *Brachiaria brizantha***. 79 p. 2010. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2010.
- SPIERTZ, J. H. J. Nitrogen, sustainable agriculture and food security. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, p. 43-55, 2010.
- STERN, M. J.; AMES, G. F. L.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v. 37, n. 3, p. 1015-1026, 1984.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.
- SULLIVAN, J., T.; EARDLY, B. D.; VAN BERKUM, P.; RONSON, C. W. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2818-2825, 1996.
- SUN, H.; SANTALAHTI, M.; PUMPANEN, J.; KÖSTER, K.; BERNINGER, F.; RAFFAELLO, T.; ASIIEGBU, F. O.; HEINONSALO, J. Bacterial community structure and function shift across a northern boreal forest fire chronosequence. **Scientific Reports**. 6:32411, 2016.

- TAMURA K.; STECHER G.; PETERSON D.; FILIPSKI A.; KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, n. 30, p. 2725-2729, 2013.
- TERAKADO-TONOOKA, J.; FUJIHARA, S.; OHWAKI, Y. Possible contribution of *Bradyrhizobium* on nitrogen fixation in sweet potatoes. **Plant and soil**, v. 367, n. 1, p. 639-650, 2013.
- THAWEENUT, N.; HACHISUKA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T. Two seasons' study on *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. **Plant and soil**, v. 338, n. 1-2, p. 435-449, 2011.
- TOKESHI, M. Species abundance patterns and community structure. **Advances in Ecological Research**. v. 24, p. 111-186, 1993.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 894 p., 2005.
- UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), 2008.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 1, p. 105-114, 1992.
- VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. do C. de F.; SÁ, M. H. B. de. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. 582 p., 2007.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v.5, p.25-40, 1994.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15), 1970.
- VINUESA, P.; SILVA, C.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, n. 1, 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, n. 2, p. 616-624, 2013.
- WANG, R.; CHANG, Y. L.; ZHENG, W. T.; ZHANG, D.; ZHANG, X. X.; SUI, X. H.; WANG, E. T.; HU, J. Q.; ZHANG, L. Y.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 2, p. 101-105, 2013.
- WEISBURG, W. G.; BARNES, 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.

- WIDMER, F.; SHAFFER, B. T.; PORTEOUS, L. A.; SEIDLER, R. J. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 374–380, 1999.
- WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1, p. 3-14, 2006.
- WILLEMS, A.; MUNIVE, A., DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M. In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 203-210, 2003.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221, 1987.
- WOOMER, P.; BENNETT, J.; YOST, R. Overcoming the inflexibility of most-probable-number procedures. **Agronomy Journal**, v. 82, n. 2, p. 349-353, 1990.
- WOOMER, P.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1112-1116, 1988.
- WOOMER, P. L. Most Probable Number Counts: Tropical Soil Biology and Fertility Programme, Nairobi, Kenya. In: WEAVER, R. W. Methods of soil analysis. Part 2, **Microbiological and biochemical properties**. Wisconsin, USA: Soil Science Society of America, Inc. p. 59-79, 1994.
- XU, G.; FAN, X.; MILLER, A. J. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 153-82, 2012.
- YANNI, Y. G.; RIZK, R. Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE G.; BRUIJN, F. de; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T. M.; MATEOS, P. F.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v. 194, p. 99-114, 1997.
- 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, n. 6, 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. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2219-2230, 2002.
- YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T. H.; DACANAY, E. V.; NAKANISHI, Y. The natural ¹⁵n abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant Soil**, v. 189, p. 239–244, 1997.
- YORK, L. M.; CARMINATI, A.; MOONEY, S. J.; RITZ, K.; BENNETT, M. J. The holistic rhizosphere: integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 12, p. 3629–3643, 2016.
- YU, X.; CLOUTIER, S.; TAMBONG, J. T.; BROMFIELD, E. S. *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, n. 9, p. 3202-3207, 2014.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental microbiology**, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.

ZEHR, J. P.; MCREYNOLDS, L. A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2522-2526, 1989.

ZELENEV, V. V.; VAN BRUGGEN, A. H. C.; SEMENOV, A. M. Modeling wave-like dynamics of oligotrophic and copiotrophic bacteria along wheat roots in response to nutrient input from a growing root tip. **Ecological Modelling**, v. 188, n. 2, p. 404-417, 2005.

ZHANG, Y. M.; LI JR, Y.; 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, n. 8, p. 1951-1957, 2012.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, v.39, p.749-758, 2009.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.

8. ANEXOS

Anexo A. Número de acesso no Genbank de sequências de genes utilizadas (continua)

Estirpes	recA	ITS	nodC
BR10266 (P4-7)	KX065092	KX857498	KF196783
BR10555 (P5-24)	KX065093	KX857500	KX065108
BR10556 (P7-18)	KX065094	KX857499	KX065109
BR10280 ^T (P9-20)	KX065095	SAMN04849207	KF196792
<i>Bradyrhizobium arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	KF962707	HM107198	KF962705
<i>B. betae</i> LMG21987 ^T	AB353734	AJ631967	-
<i>B. canariense</i> BTA-1 ^T	AY591553	AY386708	AJ560653
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	KF532947	KC247124	EU597844
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	KF962708	HQ231312	HQ231326
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 ^T	BA000040	BA000040	NC_004463
<i>B. denitrificans</i> LMG8443 ^T	EU665419	AF338176	-
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	AY591568	AB100747	HQ233221
<i>B. embrapense</i> SEMIA 6208 ^T	HQ634899	FJ391129	KP234521
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T	KF114669	KF114622	KF114576
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T	KJ818112	KJ818105	KJ818109
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 ^T	JX277144	-	JX292035
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	KC509269	-	-
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	KC509279	-	-
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	KF962709	HQ428043	KF472814
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	JX943615	-	KF896159
<i>B. ingae</i> BR10250 ^T	KF927061	-	KF927054
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T	AB300996	AB300993	AB301000
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	AM168341	HQ143390	AP012206
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	HM590776	AY628094	AB573869
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T	KM378399	KM378507	KT033402
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	GU433522	GU433583	GU433565
<i>B. liaoningense</i> LMG18230 ^T	AY591564	AB510001	GU263466
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	KF785992	NZ_LJYG01000047	KF786002
<i>B. neotropiale</i> BR1024 ^T	KJ661714	KJ661686	KJ661727
<i>B. oligotrophicus</i> LMG 10732 ^T	JQ619231	KF962688	-
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T	HQ587287	KP308156	HQ587980
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	LM994323	AY628092	AB573868
<i>B. paxllaeri</i> LMTR21 ^T	JX943617	KP308155	KF896160
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	KC247094	KF638356	KC247112
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	KF532948	KC247123	EU597853
<i>B. stylosanthis</i> BR 446	KU724163	-	KU724160
<i>B. subterraneum</i> 58 2-1 ^T	KM378397	KM378539	-
<i>B. tropiciagri</i> SEMIA 6148 ^T	FJ391168	FJ391100	KP234520
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	JX518589	NZ_LLXX01000218	JX514897
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	KM378374	KM378504	KT362339
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	KR149140	NZ_LGTB01000028	-
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	AY591566	AY386734	AB354633
P4-29	-	-	-
P4-2	-	-	-
P11-1	-	-	-
P7-4	-	-	-

Anexo A. (continuação)

P7-6	-	-	-
P11-4	-	-	-
P12-5	-	-	-
P5-35	-	-	-
P7-2	-	-	-
P1-6	-	-	-
P9-22	-	-	-
P1-2	-	-	-
P2-1	-	-	-
P12-4	-	-	-
P13-4	-	-	-
P6- 1	-	-	-
P5- 28	-	-	-
P6- 2	-	-	-
P8- 5	-	-	-
P15- 4	-	-	-
P1- 1	-	-	-
P1- 3	-	-	-
P4- 1	-	-	-
P4- 23	-	-	-
P10- 2	-	-	-
P10- 5	-	-	-
P11- 7	-	-	-
P15- 9	-	-	-
P5- 1	-	-	-
P5- 27	-	-	-
P5- 32	-	-	-
P10- 6	-	-	-
P12- 6	-	-	-
P13- 3	-	-	-
P15- 7	-	-	-
P11-2	-	-	-
P7- 23	-	-	-
P5- 26	-	-	-
P5- 22	-	-	-
P5- 20	-	-	-
P5- 5	-	-	-
P4- 5	-	-	-

Sequências não depositadas no Banco de dados do NCBI (-); genes obtidos de genomas inteiros, os números de acesso dos genomas foram indicados.

Anexo B. Relação dos isolados obtidos e suas características morfo culturais (continua)

Isolados	Bloco	Nível de Diluição	Cultivar	Compartimento	Crescimento	pH do meio	Cor da colônia	Transparência da colônia	Tamanho médio das colônias (mm)	Observações
RBE40b	1	2	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	Muco bem pegajoso
IAE71b	1	1	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,2	-
RBR1a	1	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	2,0	-
IAE71c	1	1	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,5	Opaca no centro e translúcida nas bordas (borda hialina)
RBR1b	1	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	Opaca no centro e translúcida nas bordas (borda hialina)
IAE20a	1	2	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,7	-
RBR6a	1	6	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,4	-
RBR6b	1	6	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,3	-
RBE40a	1	2	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,6	-
RBR53a	1	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	-
RBR53c	1	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	-
IAR33a	1	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,4	Opaca no centro e translúcida nas bordas (borda hialina)

Anexo B. (continuação)

IAE45c	1	1	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	2,1	Opaca no centro e translúcida nas bordas (borda hialina)
IAE45a	1	1	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,6	
RBR53b	1	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	0,8	
IAR33b	1	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,2	
IAE45b	1	1	IACSP95-5000	Endosfera	Rápido	Ácido	Branca (início) Amarela(depois)	Opaca	2,8	Branca no início e depois se torna amarela (5 dias).
IAR33c	1	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,5	
IAR64a	1	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Rápido	Ácido	Branca com centro amarelo	Translúcida	3,0	
IAR59b	1	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,7	Muco bem pegajoso
IAR59c	1	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,9	Muco bem pegajoso
IAR59a	1	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	2,3	
RBE39b	1	1	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,4	
RBR2a	1	2	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	
RBR29b	1	3	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,0	
RBR29c	1	3	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,6	
RBR29a	1	3	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,1	
RBE39a	1	1	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,9	
RBR2c	1	2	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	0,7	

Anexo B. (continuação)

RBR1c	1	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,7	Opaca no centro e translúcida nas bordas (borda hialina)
IAE20b	1	2	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	
RBR2b	1	2	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,7	
IAR12b	1	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	
IAR12c	1	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,6	
IAE71a	1	1	IACSP95-5000	Endosfera	Rápido	Ácido	Branca	Opaca	1,5	
IAR146b	2	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Neutro	Branca	Transparente	1,7	massa da colônia de aparência aquosa Branca no início e depois se torna amarela. Bastante mucos.
RBR179a	3	1	RB867515	Rizosfera	Rápido	Ácido	Branca com centro amarelo	Translúcida	5,7	
RBR134b	2	6	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,5	
IAR96b	2	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,6	
RBR109a	2	6	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,2	
RBR104a	2	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	
RBE112a	2	3	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	2,0	
IAR141b	2	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,57	Mucosa
IAR121b	2	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,4	Mucosa

Anexo B. (continuação)

IAE99b	2	3	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,4	
IAR91b	2	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,9	
IAR118a	2	3	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,7	
IAR91c	2	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,4	
IAR116a	2	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	0,7	
RBE85a	2	1	RB867515	Endosfera	Lento	Neutro	Branca	Opaca	1,7	
RBE110b	2	1	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	2,2	
RBE137b	2	3	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	
RBE137a	2	3	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,7	
IAE147a	2	1	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,5	
RBR129a	2	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	
RBR109c	2	6	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,0	
RBR159b	3	6	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,48	
RBE110a	2	1	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,55	
IAE123a	2	2	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,1	
RBE110c	2	1	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	Muco pegajoso (colônia pegajosa)
RBE137c	2	3	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,6	Muco pegajoso (colônia pegajosa)
RBE135a	2	1	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,5	
RBR179c	3	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,8	
RBR204c	3	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,8	
RBR204b	3	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	1,9	
RBR204a	3	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	2,0	
RBR179b	3	1	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	2,7	

Anexo B. (continuação)

IAR191c	3	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,8	
IAR191a	3	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	2,4	
IAR191b	3	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,9	
IAR221c	3	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	0,8	massa e colônia iniciam por vários pontinhos
IAR166a	3	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	2,4	
IAR195a	3	5	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	2,4	
IAR221b	3	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	2,6	
IAR167c	3	2	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	0,6	muco da colônia é seco (Semelhante à IAR195a) e formada por pontinhos como em IAR221c
IAR167b	3	2	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	0,6	muco seco como em IAR167c
IAR167a	3	2	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,2	muco pegajoso
IAE198b	3	2	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	2,1	
IAE198a	3	2	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	2,6	

Anexo B. (continuação)

IAR171a	3	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,00	formada por pontinhos como em IAR221c
IAR171b	3	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	0,9	formada por pontinhos como em IAR221c
IAR195b	3	5	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	2,6	
IAR171c	3	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	2,16	
IAR195c	3	5	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,9	
IAR216a	3	1	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,6	
IAE174c	3	3	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,	
IAE174b	3	3	IACSP95-5000	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1	
IAR221a	3	6	IACSP95-5000	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	0,8	
RBR184a	3	6	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,60	
RBR184b	3	6	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	2,0	
RBR157a	3	4	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	2,1	
RBR209c	3	6	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	2,0	
RBR209b	3	6	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,7	
RBR209a	3	6	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	2,0	
RBR158a	3	5	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	1,6	
RBE160a	3	1	RB867515	Endosfera	Lento	Alcalino	Branca	Translúcida	2,3	
RBR158b	3	5	RB867515	Rizosfera	Lento	Alcalino	Branca	Opaca	2,50	

Anexo C. Distribuição dos isolados pertencentes às amostras dentro dos genótipos obtidos pelo dendrograma através de BOX PCR

Amostras	IAR1	IAE1	IAR2	IAE2	IAR3	IAE3	RBR1	RBE1	RBR2	RBE2	RBR3	RBE3
Compartimento	R	E	R	E	R	E	R	E	R	E	R	E
Bloco	1	1	2	2	3	3	1	1	2	2	3	3
G1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G3	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
G4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
G5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
G6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
G8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
G9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
G11	1	0	0	0	0	0	2	0	0	1	3	0
G12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
G13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
G14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
G15	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0
G16	1	1	3	0	1	0	4	0	1	0	0	0
G17	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G18	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G19	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
G20	2	1	0	0	1	1	4	1	1	0	2	0
G21	1	0	1	0	7	1	2	1	0	0	2	0
G22	0	0	1	0	1	0	0	0	1	2	1	0
G23	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
G24	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0
G25	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0
G26	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
G27	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
G28	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

(RBR) amostra de rizosfera da cultivar RB867515, (RBE) amostra de endosfera da cultivar RB867515, (IAR) amostra de rizosfera da cultivar IACSP95-5000, (IAE) amostra de endosfera da cultivar IACSP95-5000, (1) Bloco 1, (2) Bloco 2 e (3) Bloco 3. R = Rizosfera; E = Endosfera; G = Genótipos BOX.

Anexo D. Primeiro hit no BLAST das sequências amplificadas do gene *recA* dos isolados obtidos (continua)

Isolados	Hits	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
RBR134b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. day16 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	917	917	93%	0	99%	KF532917.1
RBE39b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BRUESC968 recombinase A (<i>recA</i>) gene, partial cds	939	939	96%	0	99%	KU058210.1
RBE40a	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 51172 RecA-like gene, partial sequence	915	915	97%	0	99%	EU370067.1
IAE71b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. day16 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	928	928	93%	0	99%	KF532917.1
IAE45b	<i>Rhizobium hainanense</i> strain CCBAU 57015 recombinase A (<i>recA</i>) gene, partial cds	745	745	99%	0	93%	HM047132.1
IAE123a	<i>Bradyrhizobium</i> genosp. TUXTLAS-17 strain 109m recombinase A protein (<i>recA</i>) gene, partial cds	917	917	96%	0	99%	FJ970336.1
IAE20b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. wall44 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	907	907	94%	0	99%	KF532932.1
IAE71 a	<i>Burkholderia silvatlantica</i> strain PPCR-2 recombinase A (<i>recA</i>) gene, partial cds	983	983	99%	0	99%	HQ398596.1
IAR59a	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BRUESC968 recombinase A (<i>recA</i>) gene, partial cds	939	939	95%	0	99%	KU058210.1
IAR91b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain BuMiT6 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	942	942	94%	0	100%	EU574266.1
IAE198b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ADU16 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	966	966	100%	0	99%	KF933552.1
IAR216a	<i>Bradyrhizobium</i> sp. wall44 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	907	907	94%	0	99%	KF532932.1
IAR64a	<i>Rhizobium tropici</i> strain RHM14 RecA protein (<i>recA</i>) gene, partial cds	909	909	100%	0	97%	JQ085274.1
IAE45c	<i>Bradyrhizobium</i> sp. VULI21 partial <i>recA</i> gene for recombinase A, isolate VULI21	926	926	94%	0	99%	LT630303.1
RBR109c	<i>Bradyrhizobium</i> sp. wall44 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	913	913	94%	0	99%	KF532932.1
RBE112a	<i>Bradyrhizobium</i> sp. DW10.1 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	911	911	94%	0	100%	KM247832.1
RBR204b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain BRUESC963 recombinase A (<i>recA</i>) gene, partial cds	867	867	99%	0	99%	KU058215.1
IAE174c	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain BuMiT6 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	933	933	97%	0	99%	EU574266.1

Anexo D (continuação)

IAE45a	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain IAR12 recombinase A (<i>recA</i>) gene, partial cds	924	924	95%	0	99%	JQ809815.1
IAE99b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Pter12 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	869	869	94%	0	99%	KF532927.1
IAR146b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. wall44 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	926	926	94%	0	99%	KF532932.1
IAR33c	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BR 3262 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	924	924	93%	0	99%	KF828817.1
RBR179b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. day16 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	907	907	94%	0	100%	KF532917.1
RBE110a	<i>Bradyrhizobium</i> sp. IAR18B recombinase A (<i>recA</i>) gene, partial cds	915	915	95%	0	99%	JQ809823.1
RBR209b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 51172 RecA-like gene, partial sequence	917	917	97%	0	99%	EU370067.1
IAR167b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SA1 strain GC1d recombination protein RecA (<i>recA</i>) gene, partial cds	870	870	91%	0	100%	EU364680.1
RBR179a	<i>Rhizobium</i> sp. 1B partial <i>recA</i> gene for Recombinase A, strain 1B	854	854	88%	0	99%	LN890811.1
RBR6b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BRUESC968 recombinase A (<i>recA</i>) gene, partial cds	933	933	97%	0	99%	KU058210.1
IAR91c	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BR 3262 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	941	941	93%	0	99%	KF828817.1
IAR195c	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ADU16 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	976	976	99%	0	99%	KF933552.1
IAR191b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. wall44 recombination protein A (<i>recA</i>) gene, partial cds	928	928	94%	0	99%	KF532932.1

Anexo E. Primeiro hit no BLAST das sequências amplificadas da região ITS dos isolados obtidos (continua)

Isolados	Hits	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
RBR134b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1563	1563	100%	0	99%	KX396569.1
RBE39b	<i>Bradyrhizobium</i> genosp. TUXTLAS-17 strain 10m 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	1482	1482	93%	0	100%	FJ970443.1
IAE45a	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete seq	1565	1565	100%	0	99%	KX396569.1
RBR179a	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. phaseoli DNA, internal transcribed spacer, partial sequence, strain: Gut-3	870	870	86%	0	85%	AB740475.1
IAR146b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6053 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1602	1602	93%	0	99%	FJ391101.1
RBR6b	<i>Bradyrhizobium</i> genosp. TUXTLAS-17 strain 10m 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	1312	1601	99%	0	96%	FJ970443.1
IAR33c	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete seq	1548	1548	100%	0	99%	KX396569.1
IAR91c	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete seq	1557	1557	100%	0	99%	KX396569.1
RBR179b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1572	1572	100%	0	100%	KX396569.1
IAE174c	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain USDA 86 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1591	1591	100%	0	100%	AF293379.1

Anexo E. (continuação)

RBE40a	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Ctj-2 16S ribosomal RNA, partial sequence; tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA, partial sequence	1445	1445	97%	0	99%	AF510949.1
IAE71b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1585	1585	100%	0	100%	KX396569.1
IAE45b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1576	1576	100%	0	99%	KX396569.1
IAE123a	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	99%	0	100%	KX396569.1
IAE20b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6053 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1580	1580	93%	0	99%	FJ391101.1
IAR59a	<i>Bradyrhizobium</i> genosp. TUXTLAS-17 strain 10m 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	1482	1482	92%	0	100%	FJ970443.1
IAR91b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain USDA 4348 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; and tRNA-Ile, tRNA-Ala, and 23S ribosomal RNA genes, complete sequence	1578	1578	100%	0	100%	JQ911631.1
IAE198b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain DTC9 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	1539	1539	100%	0	99%	FJ436375.1
IAR216a	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6053 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1596	1596	92%	0	99%	FJ391101.1
IAE45c	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0	99%	KX396569.1

Anexo E. (continuação)

RBR109c	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6145 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1576	1576	92%	0	99%	FJ391135.1
RBE112a	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1565	1565	100%	0	99%	KX396569.1
RBR204b	<i>Bradyrhizobium</i> genosp. TUXTLAS-17 strain 10m 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	1482	1482	92%	0	100%	FJ970443.1
RBE135a	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1568	1568	100%	0	100%	KX396569.1
IAR195c	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain DTC9 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	1519	1519	100%	0	99%	FJ436375.1
RBE110a	<i>Bradyrhizobium arachidis</i> strain CCBAU 33067 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1411	1411	96%	0	99%	GU433587.1
IAR33b	<i>Bradyrhizobium</i> genosp. TUXTLAS-17 strain 10m 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	1482	1482	93%	0	100%	FJ970443.1
IAR191a	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain DTC9 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	1528	1528	100%	0	99%	FJ436375.1
IAE99b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolate CI-1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ile and tRNA-Ala genes, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1572	1572	100%	0	100%	KX396569.1
IAR191b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6053 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1592	1592	92%	0	99%	FJ391101.1
RBR209b	<i>Bradyrhizobium arachidis</i> strain CCBAU 33067 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1434	1434	95%	0	100%	GU433587.1
IAR167b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. TSA15y genes for 16S rRNA, 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, 23S rRNA, partial sequence, strain: TSA15y	1375	1375	100%	0	97%	AB542428.1
RBE110c	<i>Bradyrhizobium arachidis</i> strain CCBAU 33067 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1415	1415	95%	0	99%	GU433587.1

Anexo F. Primeiro hit no BLAST das sequências amplificadas do gene *nodC* dos isolados obtidos (continua)

Isolados	Hits	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
RBR134b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BR 3262 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1114	1114	99%	0	99%	KF828819.1
RBE39b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain CCBAU 61217 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1037	1037	93%	0	99%	FJ418731.1
IAE45a	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6208 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, complete cds	998	998	100%	0	96%	KP234521.1
IAR146b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain CCBAU 65893 nodulation protein C (<i>nodC</i>) gene, partial cds	961	961	100%	0	97%	GU433576.1
RBR6b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BR 3262 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1031	1031	99%	0	100%	KF828819.1
IAR33c	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain USDA 3203 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1037	1037	94%	0	99%	EF153407.1
IAR91c	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> strain SEMIA 6208 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, complete cds	939	939	100%	0	94%	KP234521.1
RBR179b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BR 3262 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1110	1110	100%	0	99%	KF828819.1
IAE174c	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ADU16 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1116	1116	100%	0	99%	KF933581.1
RBR129a	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain CCBAU 23174 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1011	1011	100%	0	97%	DQ010032.1
RBE40a	<i>Bradyrhizobium arachidis</i> strain CCBAU 33067 nodulation protein C (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1057	1057	93%	0	100%	GU433569.1
IAE71b	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> strain SEMIA 6208 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, complete cds	1016	1016	100%	0	97%	KP234521.1
IAE45b	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> strain SEMIA 6208 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, complete cds	1000	1000	100%	0	96%	KP234521.1
IAE123a	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> strain SEMIA 6208 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, complete cds	1094	1094	100%	0	99%	KP234521.1
IAE20b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ADU16 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1018	1018	100%	0	97%	KF933581.1
IAE71a	<i>Bradyrhizobium</i> sp. AG14 NodC (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1024	1024	91%	0	100%	KF196798.1
IAR59a	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain CCBAU 61217 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1033	1033	93%	0	99%	FJ418731.1

Anexo F. (continuação)

IAR91b	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> strain SEMIA 6208 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, complete cds	974	974	100%	0	95%	KP234521.1
IAE198b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain CCBAU 65893 nodulation protein C (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1018	1018	100%	0	99%	GU433576.1
IAR216a	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain CCBAU 23174 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1007	1007	99%	0	97%	DQ010032.1
IAE45c	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> strain SEMIA 6208 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, complete cds	1000	1000	100%	0	96%	KP234521.1
RBR109c	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ADU16 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1099	1099	100%	0	99%	KF933581.1
RBE112a	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> strain SEMIA 6208 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, complete cds	1038	1038	100%	0	97%	KP234521.1
RBR204b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. AG14 NodC (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1014	1014	100%	0	100%	KF196798.1
RBE135a	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BR 3262 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1105	1105	100%	0	99%	KF828819.1
IAR195c	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain CCBAU 23174 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1092	1092	98%	0	99%	DQ010032.1
RBE110a	<i>Bradyrhizobium arachidis</i> strain CCBAU 33067 nodulation protein C (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1037	1037	93%	0	99%	GU433569.1
IAR33b	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> strain SEMIA 6208 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, complete cds	1016	1016	100%	0	97%	KP234521.1
IAR191a	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain CCBAU 65668 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	961	961	100%	0	98%	EU622092.1
IAE99b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. P10-5 NodC (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1024	1024	91%	0	100%	KF196794.1
IAR191b	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain CCBAU 23174 N-acetylglucosaminyltransferase (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1007	1007	99%	0	97%	DQ010032.1
RBR209b	<i>Bradyrhizobium arachidis</i> strain CCBAU 33067 nodulation protein C (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1020	1020	93%	0	99%	GU433569.1
IAR167b	<i>Bradyrhizobium</i> sp. P11-1 NodC (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1014	1014	91%	0	99%	KF196796.1
RBE110c	<i>Bradyrhizobium arachidis</i> strain CCBAU 33067 nodulation protein C (<i>nodC</i>) gene, partial cds	1037	1037	93%	0	99%	GU433569.1