

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CIÊNCIA DO SOLO

TESE

**Ecologia e Taxonomia de Rizóbios de Mimosas do
Brasil: Diversidade e Interação com seus
Hospedeiros de Diferentes Biomas**

Alexandre Cardoso Baraúna

2017



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

**ECOLOGIA E TAXONOMIA DE RIZÓBIOS DE MIMOSAS DO
BRASIL: DIVERSIDADE E INTERAÇÃO COM SEUS HOSPEDEIROS
DE DIFERENTES BIOMAS**

ALEXANDRE CARDOSO BARAÚNA

Sob a orientação da professora
Veronica Massena Reis

e Co-orientação do professor
Jerri Édson Zilli

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de **Doutor** em
Agronomia, no Programa de Pós-
graduação em Agronomia, Área de
Concentração em Ciências do Solo.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Ficha catalográfica elaborada
com os dados pelo(a) autor(a)

B227e Baraúna, Alexandre Cardoso, 1987-
 Ecologia e Taxonomia de Rizóbio de Mimosas no
 Brasil: Diversidade e Interação com seus Hospedeiros de
 Diferentes Biomas/ Alexandre Cardoso Baraúna. - 2017.
 163 f.: il.

 Orientadora: Veronica Massena Reis.
 Coorientador: Jerri Édson Zilli.
 Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
 Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
 Agronomia - Ciência do Solo, 2017.

 1. Alfa e beta-rizóbio. 2. Nodulação. 3. Cupriavidus.
 4. Cerrado. I. Reis, Veronica Massena, 1961-, orient. II.
 Zilli, Jerri Édson, 1974-, coorient. III Universidade
 Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-
 Graduação em Agronomia - Ciência do Solo. IV. Título.

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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIAS DO SOLO

ALEXANDRE CARDOSO BARAÚNA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 22/02/2017.

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Luís Henrique de Barros Soares. Dr. Embrapa Agrobiologia

Marcia Reed Rodrigues Coelho. Dra. Embrapa Agrobiologia

Silvia Regina Goi. Dra. UFRRJ

Érika Flávia Machado Pinheiro. Dra. UFRRJ

*À Deus, que me guiou e deu forças, sabedoria e paciência para alcançar meus objetivos,
principalmente nas horas de desânimo e incertezas.*

*Aos meus pais, Rui e Nilva, que pela fé em Deus, sempre me deram orgulho e exemplo de
honestidade e perseverança, valores estes que me guiaram em busca dos meus sonhos.*

*À minha esposa Jomara e minha filha Sarah. Meus amores, personalização do meu maior
sonho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciências do Solo (UFRRJ), que por meio da coordenação e de seu corpo docente foi fundamental para minha formação acadêmica na área de agronomia.

À Embrapa Agrobiologia, por meio sua excelente equipe de pesquisadores, Veronica Massena Reis, Jerri Édson Zilli, Luc Felicianus Marie Rouws, Marcia Reed Rodrigues Coelho, Sergio Miana de Faria; Analista e técnicos, Karine Moura de Freitas, João Luiz Bastos, Wilson Cabral da Fonseca, Antônio Lúcio Gomes de Souza e Fernanda dos Santos Dourado; e suas estruturas laboratoriais que forneceram as condições necessárias para execução deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante todo o período letivo deste doutorado, cumprindo rigorosamente os pagamentos das bolsas de estudo, além de fomentar todo o projeto de pesquisa desta Tese por meio do Projeto 168/2012 (Pesquisador Visitante Especial) do Programa Ciências Sem Fronteiras, o qual foi executado pela equipe composta por Veronica Massena Reis, Fábio Lopes Olivares, Fábio Bueno dos Reis Junior, Silvia Regina Goi, Fátima Maria de Souza Moreira, Euan Kevin James, Eduardo Gross, Marcos Gervásio Pereira, Luc Felicianus Marie Rouws, Emanuel Malpendi de Souza, Rose Adele Monteiro, Claudia Martins Miranda; e colaboradores do projeto, Jerri Édson Zilli, Samuel Ribeiro Passos, Rafaela Eloi de Almeida Alves e Cândido Barreto de Novais. Agradeço também por todo suporte prestado a mim durante um ano de Doutorado Sanduíche na Escócia, onde tive a oportunidade de aprimorar minhas habilidades científicas, profissionais e pessoais.

À minha orientadora Dra. Veronica Massena Reis e co-orientador Dr. Jerri Édson Zilli que contribuíram, não só para o desenvolvimento da pesquisa, mas também para o aprendizado para a carreira de pesquisador, sempre com seriedade, respeito, humildade e dedicação.

Ao Instituto James Hutton, na Escócia, especialmente aos colegas pesquisadores Euan K. James e Pietro P. M. Iannetta que me receberam e proporcionaram as melhores condições de trabalho no instituto.

Ao Alojamento CNPAB, onde fiquei instalado em Seropédica durante o período do doutorado. Agradeço às pessoas que ali passaram, pelo convívio quase sempre amistoso, e as quais fiz grandes amizades, em especial aos meus amigos Leonardo Terra, Fabiano Gama, Jander Ferreira, Rafael Cassador, Danilo Silvestre, Lucero Sarsal, entre outros.

BIOGRAFIA

Alexandre Cardoso Baraúna, nascido em 17 de outubro de 1987, filho de Rui Antônio do Carmo Baraúna e Nilva Cardoso Baraúna, iniciou sua carreira acadêmica aos 17 anos quando saiu do terceiro ano do ensino médio da Escola Estadual Ana Libória em 2005 para ingressar no curso de graduação de Ciências Biológicas na Faculdade Cathedral durante 2 anos letivos. Em 2007 ingressou na Universidade Federal de Roraima (UFRR) no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Microbiologia, onde participou de diversos programas e eventos, os quais trilharam o início de sua história de pesquisa científica. Entre estes podem-se citar a participação do Programa de Ensino Tutorial de Biologia (PET-Bio), semanas acadêmicas de Ciências Biológicas, estágios voluntários no Laboratório de Micologia (UFRR) e no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa-RR, sob responsabilidade do pesquisador Dr. Jerri Édson Zilli. Durante este período, iniciou sua primeira participação em um projeto de pesquisa através do Programa de Iniciação Científica (PIC-UFRR) sob orientação da Dra Gilmara Maria de Duarte Pereira e Liamara Perin, trabalhando com Bactérias diazotróficas endofíticas de milho do Estado de Roraima. Finalizou a graduação em 2010 e logo em seguida ingressou no curso de Mestrado em Agronomia pelo Programa de Pós-graduação em Agronomia (POSAGRO) da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, sob orientação do Dr. Jerri Édson Zilli e co-orientação da Dra. Krisle da Silva. Juntos desenvolveram um estudo aprofundado sobre a diversidade e eficiência simbiótica de rizóbios associados ao pau-rainha (*Centrolobium paraense* Tul.) em Roraima, o qual foi a base estudos taxonômicos para a descobertas de novas espécies do gênero *Bradyrhizobium*. Em 2013 ingressou no curso de Doutorado em Agronomia pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo (UFRRJ), no Rio de Janeiro, sob a orientação da Dra. Veronica Massena Reis e co-orientação do Dr. Jerri Édson Zilli. Durante os quatro anos de doutorado pesquisou rizóbios associados a nódulos de mimosas em várias partes do Brasil, executando parte de sua pesquisa no instituto James Hutton, Escócia, ao lado do renomado pesquisador Dr. Euan K. James.

RESUMO GERAL

BARAÚNA, **Ecologia e taxonomia de rizóbios de mimosas do Brasil: Diversidade e interação com seus hospedeiros de diferentes biomas**. 163f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O Brasil é o principal centro de diversidade de mimosas no mundo e os Biomas Cerrados e Caatinga concentram cerca de metade das espécies descritas. Embora estas leguminosas estabeleçam simbiose predominantemente com Beta-rizóbios, membros da subclasse Alfaproteobacteria também nodulam efetivamente. No Brasil, a principal nodulação nas mimosas se dá por espécies do gênero *Paraburkholderia*, e até o momento, não incluem o gênero *Cupriavidus* e outros alfa-rizóbios como parceiros simbióticos nativos. Essa tese traz novas informações biogeográficas sobre estas interações, sendo dividida em dois capítulos: I - Um estudo ecológico e taxonômicos dos rizóbios de mimosas dos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica; e II - A descrição de nova espécie (*Rhizobium altiplani*) isolada de *Mimosa pudica* sob um solo antropizado de Brasília dentro do domínio Cerrado. O estudo foi baseado em 724 bactérias provenientes de nódulos de 16 espécies de mimosas invasivas e endêmicas coletadas de 25 locais de estudos, onde *M. pudica* constituiu a principal espécie estudada. Estes isolados foram caracterizados a partir de atributos fenotípicos e genotípicos, sendo observada a dominância de espécies de *Paraburkholderia*. Entretanto, pela primeira vez, foi constatada a presença de espécies de *Cupriavidus* nodulando mimosas, espontaneamente, em três dos quatro biomas estudados, enquanto que espécies do gênero *Rhizobium* foram bem representadas nos biomas Cerrado e Amazônia. Toda coleção foi agrupada a partir de perfis de Box-PCR ou por meio da comparação de perfis fenotípicos, sendo selecionadas 188 bactérias para a submissão ao postulado de Koch utilizando *M. pudica* como planta hospedeira. Deste total, 106 rizóbios foram capazes de formar nódulos com diferentes características de tamanho, coloração e atividade da enzima leg-hemoglobina dependendo das estirpes inoculadas. Com base nas sequências do gene 16S rRNA, 98 bactérias apresentaram homologias com 16 espécies de alfa e beta-rizóbios, consistindo *P. tuberum* o principal simbiote de mimosas do Brasil. As filogenias dos genes 16S rRNA e *recA* mostraram que a maioria dos isolados formaram clados distintos para cada espécie, sendo estes de baixa variabilidade intraespecíficas, com exceção dos isolados das espécies *P. nodosa* e *P. diazotrophica* que apresentaram diferenças entre as populações de diferentes localidades. Quanto aos genes simbióticos (*nifH* e *nodC*) foram observadas poucas evidências de eventos de transferência horizontal de genes, sendo a maior parte dos agrupamentos semelhantes aos observados nas filogenias dos genes conservados. As estirpes do gênero *Cupriavidus* apresentaram genes distintos das estirpes tipo e semelhantes as do Uruguai e Brasil, constituindo assim uma população Sul-americana. A partir deste estudo taxonômico inicial, cinco isolados do gênero *Rhizobium* do Distrito Federal mostraram-se distintos de qualquer outra estirpe tipo. Esta divergência também foi confirmada por meio de análises de sequências multilocus, comparação de genoma e testes fenotípicos, sendo confirmado o isolamento de uma nova espécie, nomeada *Rhizobium altiplani*. Por fim, a estirpe tipo de *R. altiplani* (BR 10423¹) foi transformada para a expressão do gene “repórter” GFP e submetida a experimento de inoculação cruzada. Os resultados mostraram que *R. altiplani* foi capaz de nodular *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, *Crotalaria juncea* e *Lupinus angustifolium* e *M. pudica*, no entanto, a efetividade da nodulação foi diferenciada entre as plantas hospedeiras.

Palavras-chave: Alfa e Beta-rizóbio. Nodulação. *Cupriavidus*. Cerrado.

GENERAL ABSTRACT

BARAÚNA, Alexandre Cardoso. **Ecology and taxonomy of mimosas of Brazil: Diversity and interaction with hosts from different biomes**. 163p. Thesis (Doctor in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Brazil is the main diversity center of mimosas in the world, with the Cerrado and Caatinga biomes concentrating about half of all the species described. Although these legumes establish symbiosis predominantly with Beta-rhizobia, members of the subclass Alpha-proteobacteria are also able to nodulate effectively. In Brazil, mimosas are predominantly nodulated by species of the genus *Paraburkholderia*, and to date, do not include the genus *Cupriavidus* and other alpha-rhizobia as native symbiotic partners. This thesis brings new biogeographic information about these interactions, and it is organized in two chapters: I. An ecological and taxonomic study of mimosas rhizobia of Amazon, Cerrado, Caatinga and Mata Atlântica biomes; and II. The description of a new species (*Rhizobium altiplani*) isolated from *Mimosa pudica* under an anthropic soil of Brasília within the Cerrado domain. The study was based on 724 bacteria derived from nodules of 16 invasive and endemic mimosas species collected from 25 study sites, where *M. pudica* constituted the main species studied. These isolates were characterized from phenotypic and genotypic attributes, where a dominance of *Paraburkholderia* species was demonstrated. However, for the first time, the presence of *Cupriavidus* nodulando mimosas species was observed spontaneously in three of the four biomes studied, while *Rhizobium* species were well represented in the Cerrado and Amazonian biomes. All collections were grouped from Box-PCR profiles or by comparing phenotypic characteristics profiles, and 188 bacteria were selected for submission to the Koch postulate using *M. pudica* as host plant. From this total, 106 rhizobia were able to form nodules with different size, color and leg-hemoglobin enzyme activity depending on the inoculated strains. Based on 16S rRNA gene sequences, 98 bacteria presented homologies with 16 alpha and beta-rhizobia species, consisting of *P. tuberum*, the main symbiont of mimosas in Brazil. The phylogenies of the 16S rRNA and *recA* genes showed that most of the isolates formed distinct clades for each species, being of low variability intraspecific, with the exception of the isolates of *P. nodosa* and *P. diazotrophica* species that showed differences among the populations of different localities. With respect to symbiotic genes (*nifH* and *nodC*), there was little evidence of horizontal gene transfer events, with most of the clusters similar to those observed in the conserved gene phylogenies. The strains of the genus *Cupriavidus* presented genes different from the type strains and similar to those found in Uruguay and Brazil, thus constituting a South American population. From this initial taxonomic study, five isolates belonging to the genus *Rhizobium* of the Federal District were distinct from any other type strain. This divergence was also confirmed by multilocus sequence analysis, genome comparison and phenotypic tests, and the isolation of a new species, *Rhizobium altiplani*, was confirmed. Finally, the *R. altiplani* type strain (BR 10423T) was transformed for expression of the GFP report gene and subjected to a cross inoculation experiment. The results showed that *R. altiplani* was able to nodulate *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, *Crotalaria juncea* and *Lupinus angustifolium* and *M. pudica*, however, the effectiveness of nodulation occurred differently among host plants.

Keywords: Alpha and Beta-rhizobia. Nodulation. *Cupriavidus*. Cerrado.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquematização do processo de nodulação dependente de Fator Nod. (Fonte: FRUGIER et al., 2008).5
- Figura 2.** Esquematização da organogênese de nódulos determinado (acima) e indeterminado (abaixo). (a) bactéria no ambiente rizosférico; (b) estabelecimento da simbiose; (1, i) Zona meristemática do nódulo; (2, ii) Modificação dos rizóbios em bacteróides; (3, iii) Células totalmente infectadas e fixando N₂; (4, iv) Inativação dos bacteróides; (c) Senescência do nódulo e liberação de bactérias indiferenciadas ao solo (Fonte: SCHUMPP; DEAKIN, 2010).9
- Figura 3.** Subdivisão do filo Proteobacteria a partir da filogenia do gene 16S rRNA. Alfaproteobacteria (☐); Beta-proteobacteria (☐); Delta-proteobacteria (☐); Gamaproteobacteria (☐); Ípsilon-proteobacteria (☐). Em destaque negrito algumas bactérias nodulíferas (MOLLIN et al., 2001)..13
- Figura 4.** Esquematização das propriedades benéficas/danosas e versatilidade molecular/funcional do gênero *Burkholderia* (VANDAMME et al., 2007).16
- Figura 5.** Sítios de coleta de nódulos de mimosas e solos em diferentes ambientes. A e B) *M. pudica* próximos a residências; C) *M. quadrivalvis* sobre áreas de pasto abandonado; D e E) *Mimosa* sp. dentro perímetro urbano de Boa Vista, RR; E) Nódulos de *Mimosa* sp.37
- Figura 6.** Experimento de “planta isca” aos 21 dias após inoculação (DAI). Os tratamentos indicados pelas numerações 2617, 2616 e 417 foram inoculados com suspensões de solos de Lavras-MG e Seropédica-RJ, respectivamente.....38
- Figura 7.** Experimento de autenticação dos isolados representativos dos grupos de Box-PCR e Matriz de similaridade. A) Sistema de cultivo com iluminação controlada; B) Sistema de cultivo em tubos contendo vermiculita e solução nutritiva estéril.40
- Figura 8.** Distribuição das bactérias isoladas de espécies de mimosas no Brasil segundo a capacidade de alteração de pH do meio de cultura YMA. Barras com listras diagonais (pH ácido); Barras com listras verticais (pH neutro); Barras preenchidas em preto (pH alcalino).....49
- Figura 9.** Mudanças de *M. pudica* aos 45 DAI inoculadas com diferentes espécies de bactérias. Da esquerda para direita: Controle negativo; *C. taiwanensis* (LMG 19424^T); MIM 125 (isolado não nodulífero); MIM 78 (*Rhizobium* sp.); MIM 175 (*P. tuberum*); MIM 332 (*C. taiwanensis*).54
- Figura 10.** Caracterização dos nódulos de *M. pudica* inoculada com alfa e beta-rizóbios. Tamanho dos nódulos: Pequeno (< 4 mm); Médio (2 – 4 mm); Grande (> 4 mm).....55
- Figura 11.** Proporção relativa dos padrões de nodulação de 106 tratamentos nodulíferos.57
- Figura 12.** Padrões de nodulação de diferentes isolados (A, B, C, D e E) aos 45 DAI em *M. pudica*. Sendo: A) Pequeno/Claro/Ativo; B) Pequeno/Claro/Inativo; C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo; D) Pequeno/Claro e Escuro/Ativo; E) Médio/Claro/Ativo. Abaixo de cada amostra observa-se as micrografias de secções dos nódulos com diferentes padrões de infecção.....59
- Figura 13.** Padrões de nodulação de diferentes isolados (F, G, H, I e J) aos 45 DAI em *M. pudica*. Sendo: F) Médio/Claro/Inativo; G) Médio/Claro/Ativo e Inativo; H) Médio/Claro

- e Escuro/Ativo; I) Médio/Escuro/Ativo; J) Grande/Claro/Ativo. Abaixo de cada amostra observa-se as micrografias de secções dos nódulos com diferentes padrões de infecção. 60
- Figura 14.** Imagens de microscopia óptica das secções de nódulos de *Mimosa*. A e B – Secções de nódulos de escuro e claro, respectivamente, com as diferentes zonas de infecção. (*) Indicam as zonas de FBN, com bactérias transformadas em bacteroides; (m) Zonas de meristemáticas. C e D – Detalhes dos nódulos efetivos com células plenamente infectadas. E e F – Detalhes de nódulos inefetivos com várias células sem infecção. (→) destacam as diferentes.61
- Figura 15.** Árvore filogenética Maximum-likelihood baseada em sequências concatenadas dos gene 16S *rRNA* e *recA* mostrando a relação entre os isolados deste estudo (Identificação MIM) com outras estirpes de α e β -rizóbios. (▲) Estirpes de *Rhizobium altiplani*; (Δ) destaque para estirpe MIM 139 distinta de todas as demais. A significância de cada ramo filogenético está indicada pelos valores de bootstrap (quando maiores que 50%) gerados a partir de 1000 repetições. Barra: representa a escala de divergência entre as sequências (5 substituições por 100 nucleotídeo). Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo D.65
- Figura 16.** Árvore filogenética Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *nifH* mostrando a relação entre os isolados deste estudo e outros α e β -rizóbios do mundo. A significância de cada ramo filogenético está indicada pelos valores de bootstrap (quando maiores que 50%) gerados a partir de 1000 repetições. Barra representa a escala de divergência entre as sequências (5 substituições por 100 nucleotídeo). Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo D.68
- Figura 17.** Árvore filogenética Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *nodC* mostrando a relação entre os isolados deste estudo (Identificação MIM) com outras estirpes de α e β -rizóbios. A significância de cada ramo filogenético está indicada pelos valores de bootstrap (quando maiores que 50%) gerados a partir de 1000 repetições. Barra representa a escala de divergência entre as sequências (5 substituições por 100 nucleotídeo). Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo D.71
- Figura 18.** Localização das áreas de estudo com suas respectivas distribuições relativa dos gêneros de rizóbios isolados de *Mimosa* spp. Os quadros abaixo de cada gráfico indicam os dados referentes à quantidade sítios de coleta (sítio), número de espécies de mimosas hospedeiras coletadas (hosp), quantidade de bactérias representantes com sequências de 16S rRNA utilizada com base de cálculo dos gráficos de distribuição (repre), percentagem de indivíduos representados com base na análise de agrupamento (%); e faixa de pH encontrada em cada estado.75
- Figura 19.** Perfis de Box-PCR das dez estirpes utilizadas na caracterização molecular de *R. altiplani*. Linhas 1, 9, 14 e 15 são os marcadores 1 kb plus ladder. Linha 13 constitui o controle negativo das reações. Linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 e 12 perfis de bandas gerado a partir de colônias com e sem dimorfismo.91
- Figura 20.** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de célula de *R. altiplani*. As setas indicam a presença de três flagelos polarizados. Barra de escala 0,5 μ m.91
- Figura 21.** Filogenia Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene 16S rRNA mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp. nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está

- indicada pelos valores de bootstrap (< 60%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo J.....97
- Figura 22.** Filogenia Maximum-likelihood baseada em sequências parciais concatenadas dos genes *recA*, *glnII* e *rpoB* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (< 70%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos.....98
- Figura 23.** Filogenia Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *nodC* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (< 60%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 5 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo J.....101
- Figura 24.** Filogenia Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *nifH* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (< 50%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo J.....102
- Figura 25.** Testes da capacidade nodulífera da estirpe de BR 10423^T em diferentes plantas hospedeiras de leguminosas após 16 dias de inoculação. A – E: *Mimosa pudica*; B – F: *Phaseolus vulgaris*; C – G: *Vigna unguiculata*; D – H: *Crotalaria juncea*. As imagens foram obtidas a partir de fotografias convencionais e microscópio LSM700 (Zeiss) após a excitação de espécimes com um laser de 488 nm. Painéis inferiores mostram imagens integradas de luz transmitida (tons de cinza) e fluorescência verde (bacteróides). Tamanho das barras: 100 μm.104
- Figura 26.** Mudanças de *Phaseolus vulgaris* nodulada pela estirpe BR 10423^T (*R. altiplani*) aos 16 DAI. A) Raiz amplamente nodulada com significativo efeito sobre a parte aérea; B) Imagem confocal dos nódulos mostrando efetivo processo de infecção das células vegetais; C) Imagem confocal mostrando detalhes das células vegetais ocupadas por bacteróides. As setas destacam as características de nodulação e processo de colonização efetivos.105
- Figura 27.** Filogenia Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *recA* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp. nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (<50%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo K.161
- Figura 28.** Filogenia Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *glnII* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp. nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (<50%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra

de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo J.....162

Figura 29. Filogenia Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *rpoB* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp. nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (<50%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo J.....163

ÍNDICE DE FIGURAS

Tabela 1. Biomas brasileiros e suas dimensões.....	24
Tabela 2. Uso da terra do bioma Cerrado.	26
Tabela 3. Abrangência do bioma Mata Atlântica em diferentes estados brasileiros.....	29
Tabela 4. Ocorrência de mimosas hospedeiras nos diferentes estados brasileiros. (+) Espécie encontrada nos sítios de coleta.	43
Tabela 5. Distribuição bactérias isoladas de mimosas nos diferentes estados brasileiros.....	46
Tabela 6. Principais perfis morfológicos dos isolados de mimosas do Brasil.	50
Tabela 7. Resumo dos resultados de autenticação dos grupos de simbiontes em <i>Mimosa pudica</i>	58
Tabela 8. Distribuição de α e β -rizóbios nodulíferos de espécies de mimosas do Brasil. Biomas: 1. Amazônia; 2. Cerrado; 3. Mata Atlântica; 4. Caatinga.	63
Tabela 9. Estirpes de <i>Rhizobium altiplani</i> utilizadas para a caracterização polifásica para a descrição da espécie.....	82
Tabela 10. Análise química do solo onde foram coletados os nódulos de <i>Mimosa pudica</i> utilizados para e isolamento de estirpes de <i>Rhizobium altiplani</i>	89
Tabela 11. Perfis fisiológicos de estirpes de <i>Rhizobium altiplani</i> e estirpes tipo de <i>R. grahamii</i> e <i>R. mesoamericanum</i> sob diferentes faixas de temperatura, pH e concentrações de NaCl após 5 dias de cultivo. 1 = BR 10423 ^T ; 2 = BR 10424; 3 = BR 10427; 4 = BR 10432; 5 = CCGE 501 ^T ; 6 = CCGE 502 ^T	92
Tabela 12. Resumo das características fenotípicas diferenciais entre as estirpes de <i>Rhizobium altiplani</i> e estirpes tipo de espécies correlacionadas. 1 = BR 10423 ^T ; 2 = BR 10424; 3 = BR10427; 4 = BR 10432; 5 = CCGE 501T (<i>R. mesoamericanum</i>); 6 = CCGE502 ^T (<i>R. grahamii</i>).....	94
Tabela 13. Comparação do genoma de <i>Rhizobium altiplani</i> (BR 10423 ^T) com estirpes tipo de <i>Rhizobium mesoamericanum</i> (CCGE 501 ^T), <i>Rhizobium grahamii</i> (CCGE 502 ^T) e <i>Rhizobium tibeticum</i> (CCBAU 85039 ^T) a partir do método de ANI.....	99
Tabela 14. Capacidade nodulífera da estirpe da <i>R. altiplani</i> BR 10423 ^T com sua hospedeira original e cinco leguminosas de diferentes tribos após 16 dias de cultivo.	103
Tabela 15. Dados de localização, características e análise química do solo dos sítios de coleta.	132
Tabela 16. Resultado da autenticação dos isolados representantes da coleção em <i>M. pudica</i> aos 45 dias de cultivo. Sendo: NBR = Número de bactérias representadas; NN = Número de nódulos; † Isolados selecionados para a caracterização molecular estão destacados em negrito; ‡ Padrões de nodulação de acordo com a Figura 12; Nódulo: Pequeno (< 2mm), Médio (2 - 4 mm), Grande (> 4mm).	133
Tabela 17. Protocolos de amplificação dos marcadores moleculares utilizado na caracterização dos isolados.	138
Tabela 18. Número de acesso das sequências utilizadas no estudo taxonômico das bactérias isoladas de nódulos de mimosas do Brasil.	140
Tabela 19. Capacidade de estirpes de <i>Rhizobium altiplani</i> , <i>R. grahamii</i> e <i>R. mesoamericanum</i> oxidar fontes de carbono isoladas em microplacas Biolog GN2. Resultados obtidos a partir dos valores médios de três repetições após 72h de incubação a 28°C (+ = Reação	

positiva; F = Reação fraca; – = Reação negativo). As categorias de fontes de carbono estão dispostas de acordo com Garland & Mills (1991). 1 = BR 10423^T; 2 = BR 10424; 3 = BR 10427; 4 = BR 10432; 5 = CCGE 501^T; 6 = CCGE 502^T.....147

Tabela 20. Comparação dos perfis de ácidos graxos entre estirpes de *Rhizobium altiplani* estirpes tipo de *R. mesoamericanum* (CCGE 501^T) e *R. grahamii* CCGE 502^T).149

Tabela 21. Comparação dos perfis de sensibilidade a antibióticos entre estirpes de *Rhizobium altiplani* estirpes tipo de *R. mesoamericanum* (CCGE501^T) e *R. grahamii* CCGE502^T).149

Tabela 22. Comparação dos perfis de atividade enzimática entre estirpes de *Rhizobium altiplani* estirpes tipo de *R. mesoamericanum* (CCGE 501^T) e *R. grahamii* CCGE 502^T).150

Tabela 23. Protocolos utilizados para a caracterização molecular das estirpes de *Rhizobium altiplani*.151

Tabela 24. Número de acesso no GenBank dos genes usados para a descrição de *Rhizobium altiplani*.152

Tabela 25. Similaridade entre a estirpe tipo de *Rhizobium altiplani* (BR 10423^T) e outras estirpes tipo de espécies de *Rhizobium* baseadas em sequências dos genes 16S rRNA, *housekeeping* e simbióticos.156

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas	4
2.2. Gênero <i>Mimosa</i>	9
2.3. Taxonomia de Rizóbios Simbiontes de <i>Mimosa</i>	12
2.3.1. Gênero <i>Burkholderia</i>	15
2.3.2. Gênero <i>Cupriavidus</i>	18
2.3.3. Gênero <i>Rhizobium</i>	20
2.4. Caracterização Polifásica de Rizóbios	21
2.5. Biomas Brasileiros	23
2.5.1. Bioma Amazônia.....	24
2.5.2. Bioma Cerrado	25
2.5.3. Bioma Caatinga.....	27
2.5.4. Bioma Mata Atlântica	28
3. CAPÍTULO I SIMBIONTES DE MIMOSAS EM DIFERENTES BIOMAS BRASILEIROS.....	32
3.1. RESUMO.....	33
3.2. ABSTRACT	34
3.3. INTRODUÇÃO.....	35
3.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.4.1. Amostragem e isolamento.....	37
3.4.2. Seleção de bactérias representativas	38
3.4.3. Autenticação dos isolados em <i>Mimosa pudica</i>	39
3.4.4. Microscopia dos nódulos.....	40
3.4.5. Caracterização molecular	40
3.4.6. Biodistribuição dos simbiontes de mimosas	41
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.5.1. Distribuição das plantas hospedeiras e características de fertilidade do solo	42
3.5.2. Simbiontes de mimosas do Brasil	45
3.5.3. Agrupamento e seleção dos isolados.....	51
3.5.4. Nodulação de Alfa e Beta-rizóbios em <i>Mimosa pudica</i>	52
3.5.5. Taxonomia dos rizóbios	62
3.5.6. Reconstrução filogenética dos rizóbios de <i>Mimosa</i>	64
3.5.7. Filogenia dos genes simbióticos.....	67
3.5.8. Biogeografia dos simbiontes de mimosas do Brasil	73
3.6. CONCLUSÕES	76
4. CAPÍTULO II <i>RHIZOBIUM ALTIPLANI</i> SP. NOV. ISOLADO DE NÓDULOS EFETIVOS EM <i>MIMOSA PUDICA</i> CRESCIDAS EM ATÍPICO SOLO ALCALINO NO BRASIL CENTRAL.....	77
4.1. RESUMO.....	78
4.2. ABSTRACT	79
4.3. INTRODUÇÃO.....	80
4.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	82
4.4.1. Área de coleta e análise solo	82

4.4.2. Caracterização morfológica e fisiológica.....	82
4.4.3. Caracterização bioquímica.....	83
4.4.4. Antibiograma.....	84
4.4.5. Caracterização de ácidos-graxos.....	84
4.4.6. Caraterização das estruturas celulares.....	85
4.4.7. Caracterização molecular.....	86
4.4.8. Experimento de inoculação cruzada com <i>Rhizobium altiplani</i> marcada com gene GFP.....	87
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
4.5.1. <i>Mimosa pudica</i> do Cerrado são noduladas por Alfa-rizóbios.....	89
4.5.2. Propriedades fenotípicas de estirpes de <i>R. altiplani</i>	90
4.5.3. Filogenia da espécie <i>R. altiplani</i>	96
4.5.4. Filogenia de genes simbióticos da espécie <i>Rhizobium altiplani</i>	99
4.5.5. Experimento de inoculação cruzada de isolados de <i>Rhizobium altiplani</i>	102
4.5.6. Descrição da espécie <i>Rhizobium altiplani</i>	106
4.6. CONCLUSÕES.....	107
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	108
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
7. ANEXOS.....	132

1. INTRODUÇÃO GERAL

Rizóbio é um termo atribuído às bactérias fixadoras de nitrogênio com capacidade induzir nodulação em leguminosas. Esta associação simbiótica é uma das principais vias de entrada de N nos sistemas naturais, com estimativa de contribuição de 120 - 200 milhões de toneladas de N por ano (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; BURNS; HARDY, 1975 *apud* GRAHAM, 2008), sendo que 25 a 90 milhões são provêm da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em sistemas naturais. Deste modo a FBN é considerada, depois da fotossíntese o processo biológico mais importante do planeta (HOWIESON et al., 2008; MARCHETTI et al., 2011).

Em virtude disso, diversos centros de pesquisas no mundo vêm trabalhando para descobrir a diversidade destes organismos e seus respectivos potenciais agrícolas, bem como seus papéis nos sistemas naturais. Sob o ponto de vista agrônomo e biotecnológico a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em leguminosas pode representar uma estratégia economicamente viável e ecologicamente sustentável, tendo em vista a redução da aplicação de fertilizantes minerais, que são onerosos e potencialmente prejudiciais ao ambiente quando manejados inadequadamente (STRALIOTTO, 2005; FRANCO; CAMPELO, 2005; HUNGRIA, et al., 2007; CARVALHO et al., 2010).

A inoculação de leguminosas com rizóbios é uma prática principalmente aplicada à produção de grãos, seja para atender a demanda do consumo humano ou para a alimentação animal, como por exemplo, a soja e feijão, entre outras culturas (HUNGRIA, et al., 2007, ZILLI et al., 2009a; ZILLI et al., 2009b; URANO et al., 2006). Esta tecnologia também pode ser empregada em múltiplos usos, tais como na produção de mudas para programas de reflorestamento, produção de lenha, madeira; recuperação de áreas degradadas e biorremediação do solo (COSTA et al., 2004; FRANCO; CAMPELO, 2005; CHEN et al., 2008a; SAFRONOVA et al., 2012). Portanto os estudos exploratórios da biodiversidade de leguminosas e seus parceiros simbióticos assumem um papel fundamental para a maximização dos benefícios desta biotecnologia.

De acordo com os últimos levantamentos, a família *Leguminosae* é constituída por aproximadamente 19.000 espécies (LEWIS et al., 2005). Embora seja assumido que a maioria das leguminosas sejam nodulíferas, pouco mais que 20% do total de espécies e 57% dos gêneros de leguminosas foram estudadas (SPRENT, 1995; BERRADA; FIKRI-BENBRAHIM, 2014). Dentre estas leguminosas, *Mimosa* está entre os maiores gêneros nodulíferos com cerca de 536 espécies, englobando plantas de porte herbáceo, arbustivo e arbóreo (SIMON et al., 2011). Além disso, o gênero possui grande adaptação a diferentes habitats, crescendo em florestas tropicais de terras baixas, savanas, florestas secas tropicais e subtropicais, desertos, campos abertos e terras alagadas (SIMON et al., 2011).

Mimosas são naturalmente encontradas nas regiões tropicais da América do Sul, América Central, e em menor proporção, no Sudeste da África e Sudoeste do continente asiático (SIMON et al., 2011; ANDAM et al., 2007; LIU et al., 2011; GEHLOT et al., 2013). Verifica-se também a ocorrência em regiões não nativas, em consequência de disseminações recentes intencionais ou não (KLONOWSKA et al., 2012; GUAN et al., 2006). Quando em condições favoráveis, geralmente em campos abertos e antropizado, estas plantas podem assumir um comportamento invasivo e dominante, levando riscos às espécies vegetais nativas (KLONOWSKA et al., 2012) ou causando transtornos em áreas urbanas, lavouras e pecuária (LOWE et al., 2000; EKHATOR et al. 2007). Contudo somente poucas espécies como *M. pudica*, *M. pigra* e *M. diplotricha* são bastante adaptadas a diferentes condições

edafoclimáticas apresentando distribuição pan-tropical (SIMON et al. 2011; LOWE et al., 2000). Uma possível hipótese para o sucesso da dispersão destas espécies pode estar relacionada a capacidade delas se associarem às comunidades rizobianas nativas de diferentes ambientes e localidades.

Diferentemente da maioria das espécies de leguminosas nodulíferas, as mimosas são noduladas predominantemente por bactérias da subclasse Beta-proteobacteria, incluído espécies de *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* (MISHRA et al., 2012; LIU et al., 2011). A descoberta destes novos rizóbios foi realizada há pouco mais de 15 anos, quando Moulin et al. (2001) e Chen et al. (2001) isolaram *Paraburkholderia tuberum* e *Cupriavidus taiwanensis* de nódulos de *Aspalathus carnosa* e *Mimosa pudica*, respectivamente. Desde então, uma série de trabalhos comprovaram que os beta-rizóbios são importantes simbiontes nodulíferos de diversas leguminosas do mundo (TAULÉ et al., 2012; CHEN et al., 2003b; ADAM et al., 2007; PLATERO et al. 2016; DOS REIS JUNIOR et al., 2010; BONTEMPS et al., 2010).

A simbiose entre mimosas e beta-rizóbio (Beta-proteobacteria nodulíferas) é um fato bastante consistente, o que para Simon et al. (2011) pode estar ligado aos primeiros eventos durante o surgimento das mimosas nas Américas. De acordo com esta teoria, a cerca de 28 milhões de anos atrás, mimosas rapidamente se associaram com a comunidade de *Paraburkholderia* nativas, as quais já eram predominantes nestes solos tropicais.

Embora beta-rizóbios sejam os simbiontes predominantes para várias espécies de mimosas, as espécies endêmicas do México e da Índia apresentam comportamentos bastante diferentes e se associam basicamente com alfa-rizóbios dos gêneros *Rhizobium* e *Ensifer* (BONTEMPS et al., 2016; GEHLOT et al., 2013). Para estes autores, as características dos solos (alcalino) em conjunto com genótipos das plantas (linhagens mais recentes) poderiam estar favorecendo um processo de co-evolução mais recente com as comunidades microbianas locais. Alfa-rizóbios também são encontrados em simbiose com mimosas disseminadas, as quais possuem um maior espectro de parceiros em relação as espécies endêmicas. Contudo, os nódulos formados por estes simbiontes geralmente são inefetivos (KLONOWSKA et al., 2012), mas existe exceção, como é o caso observado com estirpes de *R. etli* (ELLIOTT et al., 2009).

Apesar das diferenças filogenéticas entre Alfa e Beta-proteobacteria, os mecanismos de nodulação e fixação de nitrogênio são essencialmente os mesmos (CHEN et al., 2003a) e as evidências evolutivas da nodulação indicam uma origem comum, havendo pontuais eventos de transferências horizontais de genes (MOULIN et al., 2001). Tais eventos poderiam explicar a origem da capacidade simbiótica do gênero *Cupriavidus*, os quais apresentam genes *nodA* e *nifH* bastante próximos de *P. caribensis* (ANDAM et al., 2007).

O Brasil é o maior centro de diversidade de mimosas do mundo, abrangendo mais da metade das espécies descritas em todo mundo (DUTRA; MORIM, 2015). Entre as espécies nodulíferas estudadas, verifica-se uma maciça dominância de rizóbios do gênero *Paraburkholderia*, sobretudo entre as espécies endêmicas dos biomas Cerrado e Caatinga (BONTEMPS et al., 2010; DOS REIS JUNIOR et al., 2010). Por outro lado, as presenças de *Cupriavidus* e alfa-rizóbios em mimosa constituem eventos muito mais raros no Brasil havendo somente poucos registros de nodulação, seja em condições artificiais de viveiro (SILVA et al., 2012) ou em ambientes naturais (DALL'AGNOL et al., 2017). Curiosamente, estes simbiontes já foram encontrados em nódulos de mimosas nativas da Guiana Francesa (MISHRA et al., 2012), e expressivamente em mimosas do Uruguai (PLATERO et al., 2016).

Portanto é evidente a necessidade de esclarecimentos de algumas questões para melhor compreensão da ecologia desta simbiose, por exemplo: Será possível que outras populações de rizóbios além do gênero *Paraburkholderia* sejam capazes de estabelecer simbiose com mimosas nativas do Brasil? As distribuições dos rizóbios têm relação com as condições

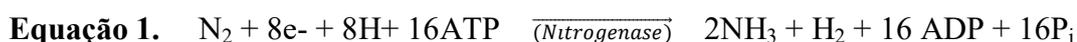
edafoclimáticas dos diferentes biomas brasileiros? As diferentes espécies de mimosas hospedeiras afetam a dinâmica intraespecífica dos rizóbios? Esta tese foi realizada sob a perspectiva de hipótese afirmativa, considerando que os estudos com estas abordagens ainda são muito recentes. Além disso o Brasil apresenta dimensões continentais, contendo não só uma grande diversidade de plantas e microrganismos, mas também uma grande riqueza de solos, o que poderia proporcionar a ocorrência de diferentes simbioses.

O objetivo do estudo foi expandir o conhecimento da diversidade de rizóbios associados a nódulos de mimosas do Brasil, bem como investigar a influência de fatores edáficos nas estruturas das populações. Para isso foram levantados dados referentes aos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica e organizados em dois capítulos: I. Alfa e beta-proteobacteria são capazes de nodular mimosas em diferentes biomas brasileiros; e II. *Rhizobium altiplani* sp. nov. isolado de nódulos efetivos em *Mimosa pudica* crescidas em solo alcalino atípico no Brasil central.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante na atmosfera com proporção estimada entre 76 a 78% na forma de dinitrogênio (N₂). Estas moléculas são formadas a partir de uma tripla ligação covalente tornam-nas extremamente estáveis e praticamente não assimiláveis para a maioria dos organismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Entretanto um grupo de organismos procarióticos, denominados diazotróficos, são capazes de converter estas moléculas em compostos amoniacais, em um processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN). Para isso as bactérias possuem um complexo metaloenzimático denominado nitrogenase que, por sua vez, realiza uma série de reações de redução do N₂ até a formação de duas moléculas de NH₃, as quais são mais reativas (NUNES et al., 2003). A síntese de NH₃ requer um alto custo energético em forma de ATP por parte das bactérias e pode ser resumidamente descrita pela seguinte reação (equação 1):



Para as poucas espécies de bactérias autotróficas e diazotróficas, como a *Anabaena azollae*, a energia necessária para a fixação de N deriva diretamente dos carboidratos produzidos na fotossíntese (WALSBY, 2007). No entanto, a maioria das bactérias diazotróficas são quimioheterotróficas, ou seja, não produzem suas próprias fontes de carbono e, portanto, a energia deve ser obtida a partir de fontes externas.

Nos sistemas terrestres, as bactérias diazotróficas podem apresentar diferentes estilos de vida, destacando-se o de vida livre, endofítico (associativo) e simbiótico. De acordo com Moreira e Siqueira (2006) grande parte das bactérias diazotróficas são de vida livre. Estes microrganismos geralmente são saprofíticos e utilizam-se de fontes de carbono disponíveis na região rizosférica e da matéria orgânica do solo (MOS) para a realização de seus metabolismos, incluindo a FBN. Já as bactérias associativas e simbióticas conseguem colonizar tecidos vegetais e o suprimento de carbono ocorre através dos fotossintatos assimilados das plantas hospedeiras, seja de forma direta ou indiretamente. A capacidade dessas bactérias permanecerem dentro das plantas de forma harmoniosa, conferem a elas vantagens em relação as demais bactérias do solo, entre estas: a redução da competição por recursos, proteção contra estresses ambientais e a maior eficiência da FBN.

Um grupo de bactérias simbióticas, denominado genericamente de rizóbio, se especializou na FBN estabelecendo parceria com plantas da família *Leguminosae*, sendo esta uma das mais eficientes. Segundo Moreira e Siqueira (2006), esta simbiose constitui a principal forma de fixação de N nos sistemas terrestres, com estimativa de contribuição de cerca de 140 toneladas de N por ano, sendo portanto, o tipo de FBN mais bem estudada devido a sua grande importância ecológica e usos nos sistemas agrícolas.

Diferentemente das bactérias associativas, os rizóbios penetram e colonizam o córtex radicular desenvolvendo uma estrutura especializada em fixar N, o nódulo. Trata-se de um órgão vegetal desenvolvido ao longo da história evolutiva da simbiose, onde ambos os parceiros são beneficiados: As bactérias fornecem o nitrogênio necessário para as plantas se desenvolverem, e em contrapartida, as plantas abrigam as bactérias dentro de seus tecidos e fornecem carboidratos translocados da parte aérea para as raízes (SANTOS; REIS, 2008).

A nodulação é um processo complexo, e embora seja bastante estudada em todo o mundo, existe uma série de mecanismos de interação entre plantas e bactérias, dos quais muitos ainda são desconhecidos (KOBAYASHI; BROUGHTON, 2008).

Convencionalmente a nodulação pode ser dividida em três etapas: 1. Pré-nodulação, subentendendo os eventos de reconhecimento dos parceiros simbióticos incluindo sinalização química/molecular e susceptibilidade da planta hospedeira (DÁVILA; PALACIOS, 2006); 2. Infecção, onde as bactérias penetram o tecido radicular em direção ao córtex; 3. Desenvolvimento do nódulo propriamente dito, que ocorre por meio do estabelecimento e multiplicação das bactérias no córtex radicular provocando uma hipertrofia do tecido vegetal em formato nodular (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; ANGUS; HIRSCH, 2010). Para cada uma dessas etapas existem mecanismos reguladores da nodulação, tanto por parte da planta hospedeira quanto dos microssimbionte envolvidos (FRUGIER et al., 2008).

Markmann et al. (2008) demonstraram que receptores de simbiose Kinase (SIMRK) são essenciais para iniciar o processo de infecção das plantas. Para a maioria das leguminosas, estes receptores localizam-se nas extremidades dos pelos radiculares e atuam decifrando os perfis de proteínas, glicoproteínas e ácidos graxos da parede celular das bactérias, bem como assinaturas como os picos dos íons de Ca^{2+} característicos (OLDROYD; DOWNIE, 2004; BROUGHTON et al., 2003; FRUGIER et al., 2008 - figura 1). Após o reconhecimento das bactérias, a citocinina é produzida estimulando assim um efeito em cascata de expressão gênica, tornando a planta susceptível ao estabelecimento da simbiose.

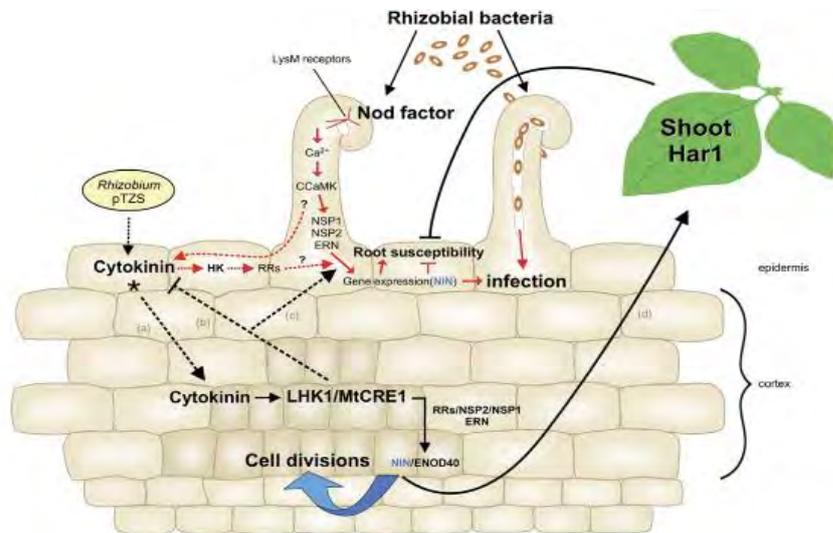


Figura 1. Esquematização do processo de nodulação dependente de Fator Nod. (Fonte: FRUGIER et al., 2008).

Ao longo do processo de reconhecimento e infecção existem centenas de genes sendo expressos simultaneamente por ambos os parceiros simbióticos (SANTOS; REIS, 2008). Por parte das leguminosas pode-se destacar as rotas de produção e a exsudação de flavonóides, chalconas, betaínas e isoflavonóides conjugados para o solo, que atuam na quimiotaxia dos rizóbios e estimulando o crescimento microbiano na região rizosférica. Nos microssimbionte, verifica-se a expressão de genes de nodulação (ex. genes *nodABCIIJ*), e conseqüentemente, a produção dos fatores Nod (lipoquitoligossacarídeos) que é o principal elemento utilizado para reconhecimento dos microssimbiontes (SAMAC; GRAHAM, 2007).

A nodulação das leguminosas geralmente ocorre pela infecção dos pelos radiculares e na presença dos fatores de nodulação. Quando a radiação da infecção ocorre através da via simplástica, os rizóbios passam a liberar enzimas celulolíticas sob os pelos radiculares formando uma espécie de “túnel” através das células, conhecido como cordão de infecção, por onde os rizóbios avançam em direção ao córtex radicular (SANTOS; REIS, 2008; ANGUS;

HIRSCH, 2010). Alternativamente, Faria et al. (1988) constataram que *Mimosa scabrella*, crescidas em ambientes inundados são capazes de nodular através das fissuras provocadas pela emissão de raízes laterais, “pulando” as etapas de pré-nodulação. Nestes casos, as bactérias colonizam os espaços intercelulares em direção ao córtex, onde se estabelecem e infectam as células vegetais dando origem aos nódulos primordiais (FARIA et al., 1988).

Dentro do tecido vegetal, os rizóbios passam a se multiplicar e infectar novas células adjacentes, formando envoltórios dentro da célula denominado simbiossomo. O rizóbios então modificam suas características morfológicas e fisiológicas transformando-se em bacteróides, cuja a função é a FBN (BROUGHTON et al., 2006). Para que a FBN de fato ocorra, os bacteróides precisam de um ambiente microaerofílico para que o complexo enzimático nitrogenase permaneça ativo na função de redução do nitrogênio atmosférico a amônia (SANTOS; REIS, 2008). Esta função protetora é realizada principalmente pela atividade do complexo enzimático Leg-hemoglobina (*hemo*, proveniente da bactéria; *globina*, proveniente da planta) que tem alta afinidade com o O₂ e atua na redução dos níveis de oxigênio dentro dos nódulos. Por outro lado, a parede do nódulo é semipermeável e as camadas corticais controlam o fluxo de entrada e saída de ar (SCHUMPP; DEAKIN, 2010).

Independente das rotas de infecção dos rizóbios, as leguminosas possuem mecanismos de controle (autorregulação) dos simbiossomas durante todo o processo de nodulação. Segundo Samac e Graham (2007), leguminosas utilizam mecanismos similares para identificar rizóbios e organismos patogênicos. Nas etapas iniciais, receptores localizados nos pelos radiculares, como por exemplo, LysM, são responsáveis por discriminar potenciais parceiros rizóbios de microrganismos patogênicos (FRUGIER et al., 2008). Para os rizóbios, estes receptores detectam principalmente as moléculas de Nod características, além outros elementos celulares como exopolissacarídeos (EPS), proteínas, lipopolissacarídeos (LPS) (BROUGHTON et al., 2003; LOPEZ-LARA et al., 1993; PERRET et al., 2000).

Para ambas as condições, os organismos envolvidos induzem a ativação de sistemas de defesas das plantas (SAMAC; GRAHAM, 2007). No entanto, os rizóbios são capazes de interagir com essas defesas através dos MAMPs (Microbial Associated Molecular Patterns - Padrões Moleculares Microbianos de Associação) e se estabelecer no interior das raízes para a formação dos nódulos (SCHUMPP; DEAKIN, 2010). Segundo os mesmos autores alguns MAMPs de rizóbios foram modificados provavelmente para evitar a detecção por receptores vegetais, como uma espécie de “camuflagem” às reações de defesa das plantas.

A nodulação também pode ser regulada após a formação dos nódulos. Neste caso, as leguminosas são capazes de detectar e responder à presença de rizóbios ineficazes na FBN aplicando medidas repressivas (SCHUMPP; DEAKIN, 2010). Estas "punições" provavelmente ocorrem através do controle ativo da permeabilidade das células corticais das raízes para o oxigênio, limitando assim o crescimento de nódulos ineficientes (SCHUMPP; DEAKIN, 2010). Adicionalmente, as leguminosas podem utilizar outras vias de autorregulação, como por exemplo, a exsudação de compostos voláteis como o jasmonato (JA), que na nodulação, tem efeito promotor ou repressor da nodulação dependendo da concentração deste composto (HAUSE; SCHAARSCHMIDT, 2009). No primeiro caso as leguminosas liberam quantidades ajustadas de JA para a região rizosférica estimulando a produção de Fatores Nod nos rizóbios. De forma antagônica, as altas concentrações de JA reduz significativamente a expressão dos Fatores Nod, prejudicando o reconhecimento das bactérias pelos receptores Kinase nas células vegetais (HAUSE; SCHAARSCHMIDT, 2009). De acordo com os estudos conduzidos por Sun et al. (2006), as concentrações de JA acima de 10µM reduzem significativamente a expressão de Fatores Nod nas bactérias, bem como altera as características dos picos de cálcio. Adicionalmente, os mesmos autores verificaram que o aumento de JA afeta a responsividade das raízes aos fatores Nod, assim, são requeridas

maiores concentrações de Fator Nod para a indução das assinaturas de picos de Ca^{+2} (SUN et al., 2006). Efeitos semelhantes também podem ser observados com o aumento da síntese de etileno nas raízes de leguminosas (OLDROYD et al., 2001).

Tanto a produção de JA quanto a de etileno parecem compor um sistema de autorregulação a partir de respostas de feedback que limitam a quantidade de infecção bem sucedidas, evitando assim um fenótipo de hipernodulação (HAUSE; SCHAARSCHMIDT, 2009; SEO et al., 2007).

Leguminosas apresentam níveis variados de eficiências dependendo da espécie de rizóbio. De modo geral, as leguminosas específicas, como o próprio nome sugere, são noduladas por um grupo restrito de simbioses e tendem a apresentar um melhor rendimento da FBN, pois a especificidade é resultado de um processo de co-evolução mais restritivo, selecionando os parceiros que conferem maiores vantagens no ambiente. *Sesbania virgata*, por exemplo, é uma espécie com alto grau de especificidade com estirpes de *Azorhizobium doebereineriae* (FLORENTIANO et al., 2015). Em um estudo baseado em amostras ambientais, Florentino et al. (2009) constataram que 96% de 80 bactérias isoladas de nódulos de *S. virgata* pertenciam a *A. doebereineriae*. Adicionalmente eles verificaram que os isolados proporcionaram alto rendimento no desenvolvimento de mudas, contrastando com o tratamento inoculado com a espécie *A. caulinodans*, que induziu pseudo-nódulos. As leguminosas promíscuas, por outro lado, são capazes de nodular com várias espécies e gêneros diferentes. *Phaseolus vulgaris*, por exemplo, é capaz de nodular com várias espécies pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), *Microvirgas* (RADL et al., 2014), bem como algumas espécies de beta-rizóbios, incluindo os gêneros *Paraburkholderia* (MARTÍNEZ-AGUILAR et al., 2013) e *Cupriavidus* (SILVA et al., 2012). As plantas com esta característica frequentemente apresentam nódulos ineficazes ou com baixo rendimento da FBN, porém são mais bem sucedidas em se tratando da distribuição biogeográfica.

Embora grande parte da especificidade da simbiose seja liderada pelas plantas hospedeiras, os rizóbios também podem conter características determinantes para a nodulação com diferentes hospedeiros. Segundo Lopez-Lara et al. (1993) e Perret et al. (2000), a síntese e arranjo de determinados tipos de EPS pelo microssimbionte está ligado à sua gama de leguminosas hospedeiras, bem como à efetividade do processo de infecção de células dentro dos nódulos, dependendo do tipo de ontogenia do nódulo (determinado ou indeterminado). No nível molecular, a síntese da N-acetilglucosaminatransferase a partir da expressão do gene *nodC* tem papel essencial na especificidade com hospedeiros. Esta molécula atua controlando o aumento da cadeia de oligoquitossacarídeos característicos (Fatores Nod), que são reconhecidos pelas plantas hospedeiras (KAMST et al., 1998; PERRET et al., 2000).

Além dos fatores intrínsecos da nodulação, o processo pode sofrer influências dos fatores ambientais bióticos e abióticos. Sob o ponto de vista dos fatores biológicos, Jesus et al. (2005) e Faria et al. (2005) demonstraram que leguminosas, fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e rizóbios podem estabelecer uma relação de sinergismo, onde o processo de nodulação e FBN são maximizados em função de uma maior disponibilidade de outros nutrientes essenciais para inicialização e manutenção da simbiose. De fato, Pontes et al. (2012) observaram que mudas de *M. caesalpiniiifolia* co-inoculadas com *Paraburkholderia sabiae* (BR3405) e *Glomus etunicatum* resultou em um aumento de 50% no peso seco dos nódulos em comparação com mudas inoculadas somente com o rizóbio.

As variáveis abióticas como, por exemplo, o pH, a umidade, temperatura e o teor de matéria orgânica do solo podem influir positiva ou negativamente dependendo das variações de cada uma delas, seja durante a formação dos nódulos ou na manutenção (HARA; OLIVEIRA, 2004; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Na associação leguminosas-rizóbios o

microssimbionte é o parceiro mais afetado pela acidez do solo e altas concentrações de Al^{3+} livre, podendo estes atributos, impedir ou reduzir a nodulação (FERNANDES JUNIOR; REIS, 2008). Limitações também podem ocorrer nas etapas de reconhecimento dos parceiros simbiotes, onde nas plantas há uma redução da exsudação de compostos fenólicos (flavonóides, chalconas e betaínas) na região da rizosfera, o que por consequência afetam a expressão de genes responsáveis pela nodulação (grupo *nod*) nas bactérias (SANTOS; REIS, 2008).

Adicionalmente, a elevação da temperatura próximos dos 40°C pode alterar a conformação das células bacterianas provocando alterações no perfil de proteínas da superfície celular, prejudicando as fases iniciais de nodulação (MERCANTES et al., 1998). As células bacterianas podem apresentar um espessamento da parede celular, como estratégia de formar uma barreira protetora contra a perda de água (KULKARNI; NAUTIYAL, 2000), o que poderia inibir o reconhecimento dos microssimbiontes pelas suas respectivas plantas parceiras. De acordo com Lopez-Lara et al. (1993), a síntese e arranjo de determinados tipos de EPS, um dos principais componentes extracelulares das bactérias, são determinantes para o reconhecimento das leguminosas, além determinar a efetividade do processo da infecção.

Além disso, Goormachtig et al. (2004) sugerem que quando as plantas hospedeiras encontram-se sob estresse térmico/hídrico os sítios de nodulação tendem a sofrer uma drástica redução em consequência da diminuição da emissão de pelos radiculares. Os mesmos autores complementam que um outro mecanismo que poderia estar atuando seria a bloqueio da síntese de leg-hemoglobina resultando no abortamento dos nódulos já formados ou em processo de formação.

Os atributos de pH e disponibilidade de N, que sofrem forte influência da matéria orgânica do solo (MOS), podem favorecer ou inibir a nodulação dependendo dos níveis em que cada um se encontra no solo (DOS REIS JUNIOR et al., 2010). Para a manutenção dos nódulos as leguminosas despendem de grande quantidade de energia nas formas de carboidratos cedidos aos bacteróides. Em uma condição em que o N esteja prontamente disponível no solo, as leguminosas emitem resposta negativa à nodulação a partir das partes aéreas das plantas (feedback negativo), bloqueando a formação de nódulos (FERGUSON; MATHESIUS, 2003). Contudo, quando N é escasso no solo, a nodulação é altamente requerida e, dependendo da fonte de nitrogênio predominante, diferentes grupos de rizóbios podem ser favorecidos (ELLIOTT et al., 2009).

O pH, por sua vez, tem papel importante na dinâmica de retenção de liberação de macro e micronutrientes requeridos na nodulação e FBN, como por exemplo, o Ca, Mg, além do Fe e Mo. De acordo com Fontes et al. (2001), nos solos bastante evoluídos e intemperizados, como a maioria dos solos tropicais, os cátions são retidos majoritariamente sítios de troca de minerais secundários que tem carga dependente do pH. Quando o pH se encontra em torno de 6 as hidroxilas funcionais das caulinitas apresentam-se desprotonadas, gerando cargas negativas que atraem os cátions para os colóides. A baixo deste pH, estas hidroxilas contribuem com cargas positivas repelindo os cátions e favorecendo o processo de lixiviação das bases e, simultaneamente, a fixação de P. Neste sentido, os recursos nutricionais das plantas e microrganismos tornam-se mais escasso e tende a desfavorecer a nodulação.

Com relação de anatomia dos nódulos, estes podem ser classificados em determinados ou indeterminados (Figura 2), sendo estas características intrínsecas das plantas e definida a partir de seu comportamento de crescimento. Nos nódulos determinados todas as células do interior do nódulo estão plenamente infectadas por bacteróides (rizóbios transformados para fixar nitrogênio no nódulo) em um mesmo estado fisiológico. Este tipo de nódulo pode ser encontrado, por exemplo, em raízes de *P. vulgaris*, *V. unguiculata* e *Glycine max*. Estes nódulos são mais sensíveis às variações ambientais, pois quando seus hospedeiros entram em

um estado prolongado de estresse, seja pela temperatura, elementos de solos, ou outros fatores limitantes, as plantas podem ativar mecanismos de defesa que atuam na senescência dos nódulos como estratégia de reduzir os gastos energéticos (FERNÁNDEZ-LUQUEÑO; ESPINOSA-VICTORIA, 2008).

Os nódulos indeterminados, por sua vez, são caracterizados pelo seu crescimento por tempo indefinido. Esta habilidade está vinculada a manutenção de parte dos rizóbios na sua forma indiferenciada, o que permite que novas células do nódulo sejam infectadas em um outro momento. Deste modo, estes nódulos são mais resistentes aos estresses ambientais, podendo apresentar um estado de inativação temporária e outro de restabelecimento da FBN. De acordo com Fernández-Luqueño e Espinosa-Victoria, (2008), os eventos de senescência temporária dos nódulos podem ser observados na base de inserção nas raízes como um tecido escurecido e lignificado (Figura 2 – iv).

De modo geral os nódulos indeterminados podem ser subdividido em quatro zonas de acordo com as estruturas celulares presentes, o processo de infecção, e atividade da FBN, sendo estas: zona meristemática (i), local de intensa divisão celular e alongamento do nódulo; zonas de transição (ii), as células do nódulo estão em processo de infecção pelos rizóbios ainda indiferenciados; zona infectada (iii), as células do nódulo encontram-se inteiramente infectada pelos rizóbios transformados em bacteróides (zona de FBN);e (iv) zona senescência, localizado na base dos nódulos (figura 2).

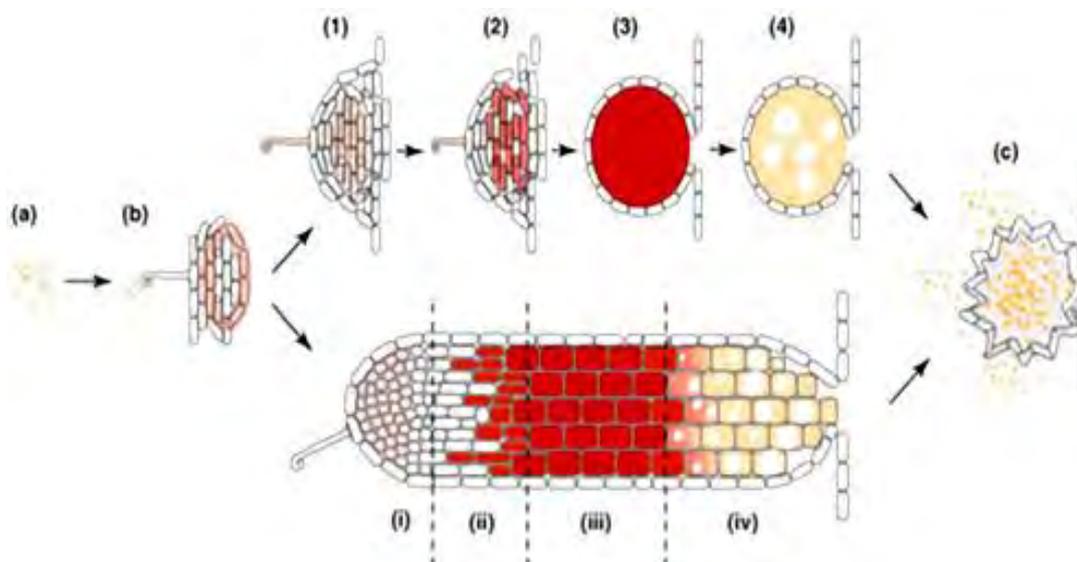


Figura 2. Esquemática da organogênese de nódulos determinado (acima) e indeterminado (abaixo). (a) bactéria no ambiente rizosférico; (b) estabelecimento da simbiose; (1, i) Zona meristemática do nódulo; (2, ii) Modificação dos rizóbios em bacteróides; (3, iii) Células totalmente infectadas e fixando N₂; (4, iv) Inativação dos bacteróides; (c) Senescência do nódulo e liberação de bactérias indiferenciadas ao solo (Fonte: SCHUMPP; DEAKIN, 2010).

2.2. Gênero Mimosa

Leguminosae é uma família com distribuição cosmopolita que a abrange cerca de 730 gêneros e 19.300 espécies divididas em três subfamílias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae* (LEWIS et al., 2005). Destes gêneros, *Mimosa* é um dos maiores com cerca de 536 espécies descritas (LEWIS et al., 2005) que podem ser encontradas sob diferentes

condições de clima, relevo e tipos de solo, ocupando savanas, terras altas, regiões áridas, semiáridas e sob influência de inundações (SIMON et al., 2011; BONTEMPS et al., 2016; GEHLOT et al., 2013).

Além do número de espécies, o gênero *Mimosa* possui uma grande diversidade morfológica, anatômica e fisiológica, sendo encontrada com porte herbáceo, arbustivo e arbóreo. Muitas destas características evoluíram em respostas aos ambientes específicos, resultando em elevados números de espécies endêmicas. Segundo Simon e Proença (2000) mais de um quarto das espécies estudadas no Brasil e a maior parte das mimosas de terras altas no México são endêmicas.

Geograficamente, estas plantas estão situadas na região neotropical, compreendida entre os trópicos de Capricórnio e de Câncer. Contudo, estudos realizados ao sul dos Estados Unidos e no Uruguai evidenciaram a presença destas plantas também em regiões subtropicais (PLATERO et al., 2016; ANDAM et al., 2007). Um dos principais centros de diversidade localiza-se no Brasil, mais especificamente nos biomas Cerrado e Caatinga que detêm aproximadamente 364 espécies, sendo 269 endêmicas (DUTRA; MORIM, 2015), seguido pelo México com aproximadamente 100 espécies (SIMON et al., 2011). Também foram encontradas espécies de mimosas nativas em outros países da América do Sul como Guiana Francesa e Uruguai (MISHRA et al., 2012; PLATERO et al., 2016). Esta riqueza de espécies é bastante discrepante com o cenário de baixa diversidade de mimosas no velho mundo, onde são encontradas apenas trinta e seis espécies, das quais trinta e quatro são provenientes da ilha de Madagascar e duas da Índia (SIMON et al., 2011 e GEHLOT et al., 2013). Por esse motivo acredita-se que a América seja o centro de origem do gênero *Mimosa*.

Simon et al. (2011) verificaram que a filogenia de mimosas do novo e velho mundo é estruturada em um grande clado monofilético, onde as mimosas do novo mundo estão posicionadas nas partes basais da árvore (mais antigas), e deram origem a outras linhagens encontradas no velho mundo. Estes autores sugerem a teoria da dispersão transatlântica de mimosas, onde em um dado período geológico, por volta de 6 a 10 milhões de anos atrás, linhagens de mimosas originárias da América do Sul chegaram ao continente africano e a Ásia, passando a colonizar e dar origem a novas espécies adaptadas aos novos biomas. Gehlot et al. (2013) e Elliott et al. (2007) verificaram que uma de mimosas nativas da Índia (*M. himalayana*), que é especializada em nodular com o gênero *Ensifer*, retém características ancestrais que permitem a nodulação por rizóbios de solos rizosféricos de mimosas do Cerrado brasileiro (*Paraburkholderia* spp.), o que evidencia uma ligação entre as mimosas do novo e velho mundo. Dentro do continente americano, as barreiras biogeográficas como, por exemplo, florestas, cordilheiras, climas diversificados e também os solos, podem ter sido os principais fatores para os isolamentos entre as populações ancestrais que desencadeou o surgimento de novas espécies. De acordo com Wallace (1852), os grandes rios da Amazônia, teve grande influência no processo da formação da biodiversidade local atuando na separação das populações e propiciando a especiação de animais, e provavelmente de outros organismos.

Embora o gênero seja bem sucedido na dispersão em várias partes do mundo, somente poucas espécies como, por exemplo, *M. pudica*, *M. pigra* e *M. diplotricha* são amplamente disseminadas e podem ser encontradas em vários países exercendo os papéis de espécies nativas ou exóticas (SIMON et al., 2011; LOWE et al., 2000; EKHATOR et al. 2007). Estas plantas apresentam uma grande adaptabilidade a diferentes tipos de solos e climas, e parte desta habilidade está ligada à versatilidade da simbiose com várias populações de rizóbios. Na China onde não há espécies nativas de mimosas, Liu et al. (2012) observaram que *M. pudica* estabeleceu simbiose tanto com espécies de *Paraburkholderia* quanto com *C. taiwanensis*, apresentando nódulos efetivos. A nodulação por estes simbiossiontes também foi constatada em vários outros países e regiões onde mimosas não ocorrem naturalmente, como em Taiwan,

Nova Caledônia, Filipinas (CHEN et al., 2005b, CHEN et al., 2006; KLONOWSKA et al., 2012; ANDAM et al., 2007). Barrett e Parker (2012) mostram que existe uma grande similaridade entre os microssimbiontes encontrados no velho mundo com rizóbios das Américas. Isto levanta indícios de que tanto a planta hospedeira quanto seus parceiros microssimbionte foram carregados para estes ambientes, em um dado período da história, e então se estabeleceram (BARRETT; PARKER, 2012). De fato, Klonowska et al. (2012) e Klonowska et al. (2017) verificaram que *M. pudica* foi introduzida no início do século 19 na Nova Caledônia (NC) e, então se propagou invadindo ambientes naturais colocando em risco a diversidade de plantas nativas endêmica. Neste mesmo estudo os dados de ocupação nodular revelaram uma ampla dominância de estirpes de *C. taiwanensis* (98%) e poucas estirpes de *Rhizobium mesoamericanum*, ambas com alta similaridade genética com estirpes americanas, sugerindo uma migração deste isolados para a ilha. Vale ressaltar que *R. mesoamericanum* é um simbiote eficiente de *Phaseolus vulgares*, siratro, feijão-caupi e *M. pudica* no México (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2012; MISHRA et al., 2012) e não havia sido registrado nenhum caso de leguminosa nativa da NC nodulada por *R. mesoamericanum* (KLONOWSKA et al., 2012).

A nodulação parece ser uma característica comum a todas as espécies de mimosa, porém cada uma apresenta sua própria amplitude de parceiros simbiotes (SPRENT, 2009). Algumas evoluíram de forma a apresentar um alto grau de especificidade, como por exemplo, a *M. hamata* no Deserto de Thar na Índia, que desenvolveu a incomum nodulação com a comunidade local de *Ensifer* sp. No Brasil as espécies endêmicas do Cerrado e Caatinga nodularam quase que exclusivamente com *Paraburkholderia* (DOS REIS et al., 2010; BONTEMPS et al., 2010) e esta relação pode estar ligada às características ácidas e de baixa fertilidade dos solos brasileiros, favorecendo rizóbios com mecanismos de resistência às adversidades ambientais. Por outro lado, mimosas invasivas são capazes de nodular com espécies de *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* e *Rhizobium* (MISHRA et al., 2012; ELLIOTT et al., 2009; LIU et al., 2012; KLONOWSKA et al., 2012).

Além da importância ecológica, seja como plantas fixadoras de N, ou pela atuação na melhoria das condições do solo através da ciclagem de nutrientes, estruturação e proteção do solo a partir da cobertura vegetal, algumas espécies de mimosas também são indicadas ao plantio para múltiplos-usos, representando assim, uma alternativa de fonte de renda e recurso biotecnológico ainda pouco explorado.

Segundo Barbosa et al. (2008), *M. caesalpiniiifolia* possui característica adequadas para produção de lenha e carvão, moirões, estacas de alta durabilidade, cercas vivas, quebra vento, além de poder ser produzida forragem para alimentação animal a partir da folhagem de alto valor nutricional (17% de proteína). Esta espécie, nativa do Bioma Caatinga, apresenta um rápido crescimento, resistência a estresse hídricos, capacidade de se desenvolver em solos compactados e pobres em nutrientes (DIAS, 1996). Tais características tornaram desta espécie uma das mais utilizada para a implementação de programas de recuperação de áreas degradadas com objetivos de estabilização do solo susceptíveis a erosão em encostas e topos de morros, reflorestamento com sucessão vegetal, além de recuperação de funções e associações ecológicas com a fauna local (DIAS 1996, FRANCO et al., 1992; RABASKI et al., 2003).

Adicionalmente, a sucessão vegetal a partir do plantio ou regeneração natural de mimosas podem trazer benefícios para atividades apicoarias, uma vez que abelhas melíferas usam o néctar durante a floração das mimosas para a produção de mel. Martins et al. (2011) mostraram a importância de *M. caesalpiniiifolia* e *M. pudica* na apicultura com fontes de néctar e pólen para abelhas da espécie *Melipona fasciculata*, sobretudo durante o período de seca quando estes recursos são mais escassos, podendo contribuir com até 82% da produção em um único mês. Estes autores ressaltam ainda que outras espécies de mimosas são

igualmente importantes à produção de mel, destacando as espécies *M. scabrella*, *M. bimucronata*, *M. invisia*, *M. dalleoides* e *M. velloziana*. Em um outro estudo com espécies de *Mimosa* da Caatinga, Lima (2007) revelou que *M. lewisii*, *M. misera* e *M. filipe* também contribuem significativamente para dieta de abelhas das espécies *Trigonistica* sp. e *Apis mellifera*, o que se refletiu na produção melífera. Segundo Martins et al. (2011), a explicação disso está no fato de que as espécies de *Mimosa* são plantas ruderal (plantas que se desenvolvem em ambiente fortemente perturbado pela ação humana), prolifera, ocorrendo em abundância em vários locais, com floração quase todo o ano.

Outras espécies de *Mimosa* como, por exemplo, *M. pudica*, agregam habilidades biotecnológicas sendo estudadas como alternativas para a biorremediação de solos contaminados com metais pesados (CHEN et al., 2008a). Estas plantas quando inoculadas com estirpes de *Cupriavidus* nodulíferos (*C. necator* e *C. taiwanensis*), que também tem metabolismo de absorção de metais pesados, são capazes de acumular em seus tecidos altas concentrações de metais pesados sabidamente danosos à biota do solo, como é o caso dos derivados de Cd, Co, Zn, Cu, Pb, Ni, Hg e Cr. Em estudo de bioabsorção de metais pesados, Chen et al. (2008a) demonstram que *M. pudica* inoculadas com estirpe TJ208 de *C. taiwanensis* proporcionou o incremento a absorção de Pb, Cu e Cd na ordem de 86, 12 e 70%, respectivamente, em relação absorção destas bactérias isoladamente, o que correspondeu a um acúmulo de 485, 25 e 43 mg/g de cada elemento na planta, respectivamente.

2.3. Taxonomia de Rizóbios Simbiontes de Mimosa

O gênero *Rhizobium* foi o primeiro a ser descrito (FRANK, 1889) e reunia todas as bactérias capazes de induzir nodulação em leguminosas. Com a evolução das técnicas microbiológicas e bioquímicas foram observadas uma série de inconsistências relacionadas, principalmente, ao metabolismo de crescimento e a reação do pH em meio de cultura, que levaram a criação do gênero *Bradyrhizobium*, para comportar os rizóbios de crescimento lento (JORDAM, 1982). Embora as diferenças entre estes dois clados viessem a ser confirmadas anos mais tarde com base em dados genéticos, a classificação de procariotos baseada meramente em informações fenotípicas se mostrou frágil, devidos às variações decorrentes do comportamento bactérias a diferentes ambientes e pelos muitos atributos subjetivos, passando a ser complementada com análises genotípicas, a qual é mais estável e remontam às relações filogenéticas (STACKEBRANDT, 2006). Stackebrandt et al. (1988) utilizaram a filogenia do gene 16S rRNA para propor a criação da classe Proteobacteria composta por seis subclasses: Alfa, Beta, Gama, Delta, Epsilon e Zetaproteobacteria (figura 3) (MADIGAN et al., 2016).

A partir desta classificação diversos gêneros foram realocados ou criados, porém todas as bactérias nodulíferas foram agrupadas dentro da subclasse α -proteobacteria. Deste modo, acreditava-se que a nodulação era uma habilidade exclusiva dos membros desta subclasse, representada principalmente pelos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Allorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium* (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2005a).

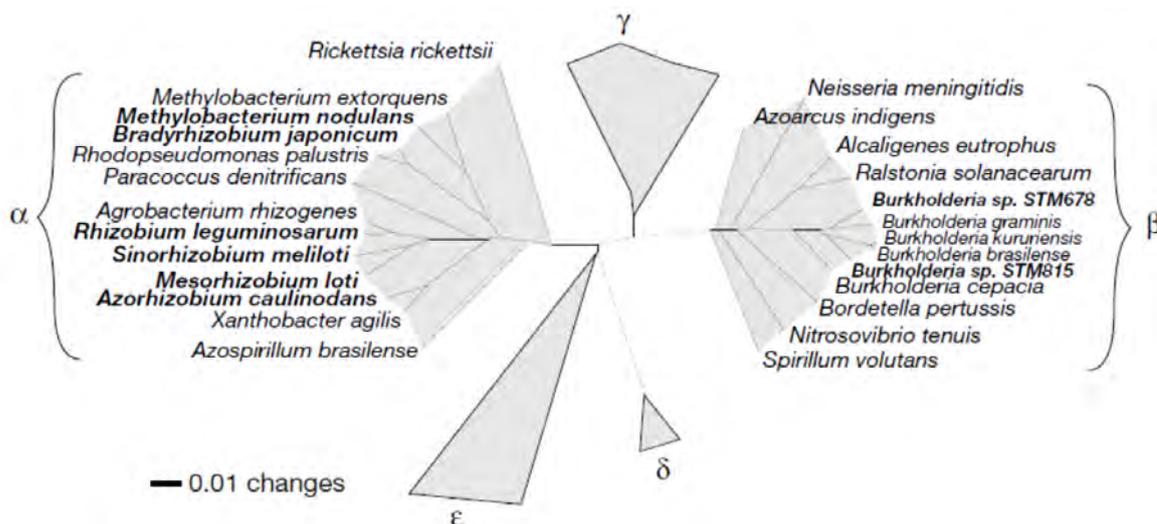


Figura 3. Subdivisão do filo Proteobacteria a partir da filogenia do gene 16S rRNA. *Alfaproteobacteria* (α); *Beta-proteobacteria* (β); *Delta-proteobacteria* (δ); *Gamaproteobacteria* (γ); *Ípsilon-proteobacteria* (ϵ). Em destaque negrito algumas bactérias nodulíferas (MOLLIN et al., 2001).

A descoberta de que bactérias da subclasse β -proteobacteria poderiam formar nódulos semelhantes aos rizóbios convencionais (α -proteobacteria) só foi realizada em 2001, quando Moulin et al. (2001) conseguiram isolar as estirpes STM 678^T (*P. tuberum*) e STM815^T (*P. phymatum*) de nódulos das leguminosas *Aspalathus carnosa* e *Machaerium lunatum*, respectivamente, provenientes da África do Sul e Guiana Francesa. Estes autores utilizaram a espécie *Macroptilium atropurpureum* (Siratro) como leguminosa hospedeira e observaram a formação de nódulos, porém estes se mostraram inefetivos. Simultaneamente Chen et al. (2001) conseguiram isolar oito estirpes de *Ralstonia taiwanensis* (reclassificada como *Cupriavidus taiwanensis*) de nódulos de *Mimosa pudica* e *Mimosa diplotricha* na região sudeste da ilha de Taiwan. A partir de então, Moulin et al. (2001) propuseram a utilização do termo beta-rizóbios para diferenciar dos rizóbios convencionais (Alfa-rizóbios). A prova definitiva que membros da subclasse β -proteobacteria poderiam induzir a nodulação veio com os resultados de microscopia eletrônica e confocal realizado por Chen et al. (2003a), utilizando a estirpe LMG 19424^T (*C. taiwanensis*) marcada com gene “repórter” GFP (Green Fluorescent Protein) para monitorar o processo de nodulação. Neste estudo *C. taiwanensis* foi capaz de penetrar nas raízes de *M. pudica* e *M. diplotricha* pela via dos pelos radiculares e formar nódulos em um processo semelhante ao observado em Alfa-rizóbios. Adicionalmente foi comprovada a FBN dentro dos bacteróides do nódulo a partir da localização de proteínas nitrogenase utilizando microscopia eletrônica de transmissão.

Segundo Sprent et al. (2017), o número de rizóbios cresce anualmente e atualmente corresponde aproximadamente a 148 espécies distribuídas em 16 gêneros, incluindo: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer*, *Neorhizobium*, *Allorhizobium*, *Pararhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* e *Shinella*, pertencentes a subclasse das α -proteobacteria; *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* dentro da subclasse das β -proteobacteria.

Pseudomonas é um gênero da subclasse Gamaproteobacteria que vem sendo reportado como um simbionte nodulífero de leguminosa. Shiraishi et al. (2010) isolaram e autenticaram estirpes de *Pseudomonas* sp. de nódulos de *Robinia pseudoacacia*, e sustentaram estes resultados com a presença de genes nodulíferos (*nodA* e *nodC*) e de fixação de nitrogênio

(*nifH* e *nifHD*). Neste estudo, os autores constataram que havia uma alta similaridade entre genes obtidos de *Pseudomonas* sp. e de *Paraburkholderia* sp., sugerindo uma transferência lateral de genes no ambiente rizosférico. Entretanto, *Pseudomonas* não é amplamente aceito pela comunidade científica como um gênero nodulífero, devido a inconsistência dos resultados. A principal crítica sobre a inclusão de novos gêneros de outras subclasses está na possibilidade de resultados falsos-positivos provenientes da utilização de culturas mistas com outras espécies de rizóbios. Valverde et al. (2003) publicaram um trabalho citando um isolado de *Herbaspirillum lusitanum* como um simbiote nodulífero de *Phaseolus vulgaris*. Embora este isolado tenha sido obtido do interior de nódulo, o mesmo não completou o postulado de Koch, indicando que mesmo se tratava de uma bactéria endofítica ou oportunista de nódulos.

O nódulo representa um ambiente rico em nutrientes, propício para a colonização de outras bactérias oportunistas, mas que são incapazes de induzir a nodulação, incluindo o gênero *Pseudomonas*. Entretanto a nodulação é uma habilidade com múltiplas origens, e que pode ser adquirida por transferência lateral de genes (MOULIN et al., 2001; ANDAM et al., 2007). Inclusive, esta é a principal hipótese para a origem da capacidade nodulífera das espécies do gênero *Cupriavidus* (ANDAM et al., 2007).

Berrada e Fikri-Benbrahim (2014) ressaltam que do total de 19.000 espécies de leguminosas do mundo, somente 23% foram estudadas quanto a associação com bactérias nodulíferas. Portanto, o número de novas bactérias nodulíferas tende a crescer expressivamente nos próximos anos, sobretudo na era da biologia molecular baseada no sequenciamento do genoma das bactérias. De modo geral, as espécies do gênero *Mimosa* são capazes de nodular tanto com β -rizóbios quanto por α -rizóbios (MISHRA et al., 2012; BARRETT; PARKER, 2006; KLONOWSKA et al., 2012), havendo uma alternância de dominância em função da biogeografia, das condições ambientais (solos) e genótipo de ambos dos parceiros envolvido (BONTEMPS et al., 2016; MELKONIAN et al., 2014).

A simbiose entre as mimosas e beta-rizóbios é bastante consistente, e ao que tudo indica, isso remonta ao passado evolutivo do gênero, a cerca de 28 milhões de anos atrás (SIMON et al., 2011). Para Simon et al. (2011), quando as primeiras linhagens de mimosas surgiram, no continente americano, encontraram no solo uma rica comunidade rizobiana composta majoritariamente de espécies de *Paraburkholderia*, e então, estabeleceram uma simbiose de forma específica, ou pelo menos de forma preferencial com *Paraburkholderia*. A medida que o gênero *Mimosa* se expandiu em número de espécies e ocupação territorial, novas relações simbióticas foram estabelecidas com outras populações locais predominantes.

Embora beta-rizóbios sejam preferidas por espécies de *Mimosa*, alfa-rizóbios também são capazes de nodular mimosas. Esta simbiose é mais incomum, e por vezes ocorre de modo efetiva ou inefetivas (GEHLOT et al., 2013; BONTEMPS et al., 2016; ELLIOTT et al., 2009; KLONOWSKA et al., 2012). Na Nova Caledônia, onde isolados pertencentes à espécie *C. taiwanensis* predominam em nódulos de *M. pudica*, foi constatado a presença de nódulos formados a partir de *Rhizobium mesoamericanum* (KLONOWSKA et al., 2012), assim como na Costa Rica, Guiana Francesa e México (BARRETT; PARKER 2006; MISHRA et al., 2012). Estes nódulos foram inefetivos e apresentaram baixo contribuição no crescimento das plantas, por isso, para Klonowska et al. (2012) *R. mesoamericanum* é um rizóbio oportunista de mimosas amplamente distribuído.

Alfa-rizóbios também podem se comportar como simbiote predominante em mimosas no México e Índia, principalmente em se tratando de espécies endêmicas (BONTEMPS et al., 2016; GEHLOT et al., 2013). Na Índia duas espécies mimosas endêmicas de terras altas (*M. hamata* e *M. himalayana*) possuem uma incomum especificidade com bactérias pertencentes ao gênero *Ensifer* (GEHLOT et al., 2013). Enquanto *M. hamata* é uma espécie endêmica do deserto de Thar e é, essencialmente

nodulada por estirpes de *Ensifer* local. *M. himalayana* é uma espécie mais disseminada na Índia, associando-se com espécies de *Ensifer* e outros alfa e beta-rizóbios frequentemente associados às mimosas invasivas da região (*M. pudica*). Contudo, a compatibilidade de simbioses entre estas duas espécies ocorre de forma unidirecional, ou seja, *M. hamata* pode se beneficiar da nodulação por estirpes de *Ensifer* simbioses de *M. himalayana*, mas o contrário não é possível, pois *Ensifer* simbióticas de *M. hamata* desenvolveram uma sequência de gene *nodA* muito específica para com seu hospedeiro de origem. Estes resultados evidenciam que a compatibilidade de rizóbios entre diferentes espécies de mimosas depende do reconhecimento específicos, incluindo os fatores de nodulação (Fatores Nod).

No México, Bontemps et al. (2016) também verificaram que a maioria das mimosas endêmicas são colonizadas predominantemente por *Rhizobium* e *Ensifer*, e associaram este fato ao ambiente (solo neutro-alcálico) favorecendo a especificidade mimosas-alfa-rizóbios. Bontemps et al. (2016) sugerem que a cerca de 20 milhões de anos atrás, linhagens do gênero *Mimosa* se separaram de seus descendentes e co-evoluíram com a comunidade rizobiana local, sendo *Paraburkholderia* o gênero predominante no Brasil, e *Rhizobium/Ensifer* no México. Adicionalmente, também ficou evidenciado que embora *M. affinis* possa ser nodulada por beta-rizóbio, esta espécie tem preferência por alfa-rizóbio, ou seja, trata-se de uma seleção de organismos mais adaptados às condições ambientais, realizando um “ajuste fino” da simbiose.

Atualmente é assumido que grande parte destas espécies de mimosas apresenta a capacidade de estabelecer simbiose com rizóbios e fixar N através da nodulação (SPRENT, 2009; GYANESHWAR et al., 2011). Porém, as eficiências da FBN entre as espécies de mimosas diferem em função dos rizóbios envolvidos na nodulação. *M. pudica* apresenta uma nodulação abundante e efetiva quando inoculada com estirpes de *P. phymatum*, *P. tuberum* e *C. taiwanensis* (KLONOWSKA et al., 2012; MISHRA et al., 2012). Entretanto, quando inoculada com *P. sabiae* e *P. phenoliruptrix* apresentam desenvolvimento limitado, com folhas amareladas, claramente indicando deficiência em nitrogênio (*dados desta tese*). Segundo Cunha et al. (2014) a espécie *P. phenoliruptrix* é altamente específica e eficiente em nodular *M. floculosa*, mas também é capaz de nodular outras espécies de leguminosas de modo ineficiente.

Em resumo, atualmente mimosas estabelecem simbiose nodulífera com 16 espécies de rizóbios representantes de 4 gêneros, incluindo as espécies *Paraburkholderia caribensis* (CHEN et al., 2003b), *P. mimosarum* (CHEN et al., 2006), *P. nodosa* (CHEN et al., 2007), *P. phymatum* (ELLIOTT et al., 2007), *P. sabiae* (CHEN et al., 2008b), *P. symbiotica* (SHEU et al., 2012), *P. tuberum* (MISHRA et al., 2012), *P. diazotrophica* (SHEU et al., 2013), *P. phenoliruptrix* (CUNHA et al., 2012), *Cupriavidus taiwanensis* (CHEN et al., 2001), *C. necator* (PLATERO et al., 2016), *R. mesoamericanum* (MISHRA et al., 2012), *R. etli* (ELLIOTT et al., 2009), *R. leucaenae*, *R. tropici* (BONTEMPS et al., 2016) e *Ensifer* sp. (GEHLOT et al., 2013; BONTEMPS et al., 2016).

2.3.1. Gênero *Burkholderia*

A descoberta da primeira *Burkholderia* sp. foi realizada em 1942 por Walter H. Burkholder ao verificar bactérias fitopatogênicas, sendo esta inicialmente classificada como *Phytomonas caryophylli* (COMPANT et al., 2008). No final dos anos 40, Burkholder descreveu outra bactéria, *Pseudomonas cepacia*, a qual foi obtida a partir de bulbos de cebolas. Por muito tempo estes indivíduos foram agrupados dentro no gênero *Pseudomonas*, até que Palleroni et al. (1973), com base nos resultados da técnica de hibridização rRNA-DNA verificaram importantes divergências que separavam o gênero em cinco grupos. Com base nestes

agrupamentos, Yabuuchi et al. (1992) realizaram uma caracterização polifásica mais detalhada em sete bactérias do grupo II e verificaram que estas possuíam filogenia e atributos metabólicos muito divergente com relação ao gênero *Pseudomonas*. Deste modo foi criado o gênero *Burkholderia* para acomodar as espécies *Pseudomonas caryophylli*, *P. cepacia*, *P. solanacearum*, *P. pickettii*, *P. gladioli*, *P. mallei* e *P. pseudomallei*.

Nos últimos vinte anos, inúmeras espécies de *Burkholderia* foram descritas, e sem dúvida representa um dos gêneros de bactérias mais ricos, constituído por aproximadamente 117 espécies (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature – www.bacterio.net, PARTES, 2018). Estes microrganismos apresentam uma grande versatilidade funcional e molecular que se mostra muito útil para ocupação de diferentes nichos ecológicos e disseminação em diversas partes do mundo (Figura 4).

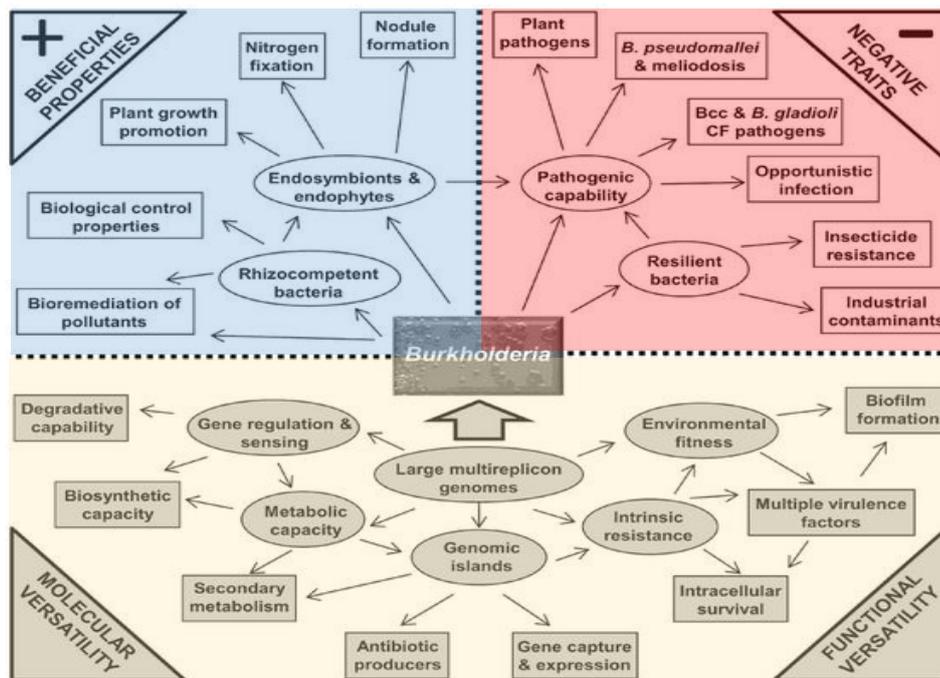


Figura 4. Esquematização das propriedades benéficas/danosas e versatilidade molecular/funcional do gênero *Burkholderia* (VANDAMME et al., 2007).

Com relação ao modo obtenção de recursos nutritivos, verifica-se que as espécies apresentam comportamentos saprofíticos, simbiótico, associativo, além de incluir importantes espécies patogênicas de animais e plantas (COMPANT et al., 2008, PERIN et al., 2006b). Muitas vezes as espécies apresentam mais de um comportamento, os quais se alternam de acordo com as condições ambientais favoráveis. As espécies fitopatogênicos, por exemplo, se mantêm ativos no solo vivendo saprofiticamente, até que encontrem um hospedeiro compatível do qual possam suprir suas necessidades nutricionais. As espécies simbióticas não são diferentes, e isso é uma importante característica para dominar vários ambientes. De acordo com Compant et al. (2008) a capacidade de *Burkholderia* spp. estabelecerem diversas relações ecológicas com plantas, animais, insetos e fungos, é reflexo da magnitude de seus genomas (em média quatro vezes maior que de um *E. coli*) que contém um arsenal de genes capazes de responder a diferentes nichos, estresses ambientais e condições de oportunismo.

Algumas espécies são reconhecidamente capazes de infectar humanos. Estas bactérias compõem o complexo *Burkholderia cepacia* (BCC) que são correlacionadas a graves infecções bacterianas (fibrose cística), principalmente em indivíduos imuno-vulneráveis, sendo

potencialmente letais (SAWANA et al., 2014). A capacidade de infectar humanos estão relacionados aos fatores de virulência das *Burkholderia*, que parecem ser transmitidos verticalmente entre os membros do gênero. Mesmo as espécies que não são patogênicas apresentam homologies genéticas com espécies do complexo BCC. Zuleta et al. (2014) realizaram um estudo comparativo do genoma de *B. phenoliruptrix* com outras espécies de *Burkholderia*, incluindo *Burkholderia* spp. patogênicas, e verificaram que *B. phenoliruptrix* apresenta 71% de homologies dos genes patogênicos. Com tudo, *B. phenoliruptrix* constitui uma espécie ambiental, associada a simbiose com leguminosas e sem histórico de infecções humanas ou de outros animais.

Apesar do risco, estas bactérias podem ser encontradas naturalmente nos ambientes estabelecendo uma relação neutra ou mesmo desempenhando funções ecologicamente benéficas. *Burkholderia cepacia*, por exemplo, é reconhecidamente uma espécie do grupo BCC capaz de promover crescimento de milho, melhorar o rendimento das plantas e exercer controle sobre organismos fitopatogênicos (CHIARINI et al., 1998; PEIX et al., 2001). A atividade antagônica não é exclusiva da espécie *B. cepacia*, na verdade trata-se de uma habilidade compartilhada com muitas outras espécies do gênero como, *B. cenocepacia*, *B. ambifaria*, *B. pyrrocinia*, *B. vietnamiensis* e *B. phytofirmans*, que atuam contra o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos *Fusarium* sp., *Phytophthora capsici* e *Rhizoctonia solani* (LARKIN; FRAVEL, 1998; SALLES et al., 2006; RECEPE et al., 2009; SOPHEARETH et al., 2013). Adicionalmente, ainda é possível observar espécies com o papel de controlar protozoários e nematoides (CAIN et al., 2000; MEYER et al., 2000).

Algumas espécies de *Burkholderia* vão além da colonização rizosférica, e são capazes de penetrar o córtex radicular de gramíneas, passarem pelo o feixe vascular e se estabelecerem em diversos órgãos vegetais. Estas bactérias são conhecidas como endofíticas e podem estabelecer diversas relações com a planta hospedeira incluindo o mutualismo, comensalismo ou mesmo assumir um comportamento parasitário (PERIN et al., 2006b). O fato é que as relações ecológicas entre estes organismos ainda não são bem claras, porém, há evidências que algumas espécies estimulam o crescimento de seus hospedeiros realizando a produção de ácido Idol-acético, ácido giberélico e FBN (ESTRADA et al., 2002; PERIN et al., 2006a; BALDANI et al., 2000).

No Entanto, sem dúvida uma das grandes descobertas dentro do gênero *Burkholderia* foi a existência de espécies com capacidade de nodular leguminosas e promover a FBN. Moulin et al. (2001) foram os primeiros a constatar esta simbiose ao isolar duas estirpes de *B. tuberum* de nódulos de *Aspalathus carnosa* originárias da África do Sul. Atualmente, existem pelo menos 13 espécies de burkholderias nodulíferas (atualmente reclassificadas para *Paraburkholderia*), incluindo: *P. caribensis* (CHEN et al., 2003b), *P. mimosarum* (CHEN et al., 2006), *P. nodosa* (CHEN et al., 2007), *P. phymatum* (ELLIOTT et al., 2007), *P. sabiae* (CHEN et al., 2008), *P. symbiotica* (SHEU et al., 2012), *P. tuberum* (MISHRA et al., 2012), *P. diazotrophica* (SHEU et al., 2013), *P. phenoliruptrix* (CUNHA et al., 2012), *P. piptadeniae*, *P. ribeironi* (BOURNAUD et al., 2013), *P. rhynchosiae* (DE MEYER et al., 2013a) e *P. sprengiae* (DE MEYER et al., 2013b). Apesar de conter poucas representantes nodulíferos em relação a outros gêneros de alfa-rizóbios, estes simbioses constituem um grupo bastante disseminado e contendo uma ampla gama de hospedeiros. Entretanto existe uma afinidade especial com as leguminosas da tribo *Mimosoideae* (BARRETT; PARKER, 2005), incluindo o gênero *Mimosa* (LIU, et al., 2012; CHEN et al., 2003a; CHEN et al., 2005a; CHEN et al., 2006; BONTEMPS et al., 2010; DOS REIS JUNIOR et al., 2010).

Geograficamente, estes simbioses estão localizados principalmente na região tropical, sendo o Brasil e a África os principais centros de diversidade no mundo. Nestes ambientes, *Burkholderia* geralmente estabelecem uma relação de dominância em relação aos outros

rizóbios, e parte disso se dá pela capacidade de resiliência e adaptação às condições desfavoráveis, sobretudo em solos altamente intemperizados. Na América do Sul, por exemplo, onde o pH é geralmente ácido, as temperaturas são mais elevadas e há uma baixa disponibilidade de nutrientes, as espécies de *Burkholderia* estão bem representadas e muitas vezes constituem a população dominante (BOMTENPS et al., 2010; DOS REIS JUNIOR et al., 2010; MISHRA et al., 2012).

Desde que Yabuuchi et al. (1992), propuseram o gênero *Burkholderia*, todas espécies, incluindo espécies patogênicas e ambientais, foram colocadas no mesmo clado. Devido ao risco de propagação de organismos potencialmente causadores de infecções, muitos países, incluindo o Brasil, impõem medidas de restrição para produção e liberação de *Burkholderia* spp. no ambiente (VANDAMME et al., 2007). Embora esta medida preventiva tenha como objetivo a segurança epidemiológica, também implica uma restrição da utilização de espécies com grandes potenciais biotecnológicos, com por exemplo, no controle biológico de patógenos de plantas, biorremediação de xenobióticos recalcitrantes (COENYE; VANDAMME, 2003), promoção do crescimento em plantas (ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001), e fixação biológica do nitrogênio (BALDANI et al., 2000).

Entretanto, novas evidências científicas baseadas em análises filogenéticas de múltiplos genes conservados mostram uma clara distinção entre espécies patogênicas humanas e espécies de *Burkholderia* ambientais, associativas e simbióticas (SAWANA et al., 2014). Neste sentido os mesmos autores propuseram a divisão do gênero e criação do novo gênero, *Paraburkholderia*, para abrigar as espécies não-patogênicas. O gênero *Paraburkholderia* é atualmente composto por 70 espécies, incluindo todas as espécies de nodulíferas.

2.3.2. Gênero *Cupriavidus*

O gênero *Cupriavidus* foi descrito por Makkar e Casida (1987) a partir bactérias do solo com comportamento predador facultativo de outras bactérias Gram-positivas e negativas. A origem do nome vem do latim (“*cuprum*” = cobre; “*avidus*” = ávido) em referência a afinidade de algumas espécies por metais pesados como o cobre, cádmio, chumbo entre outros (CHEN et al., 2008a; FERREIRA et al., 2012). O gênero é atualmente composto por 16 espécies, sendo a maior parte originária de reclassificações de membros do gênero *Ralstonia* (*Wautersia*) (VANDAMME; COENYE, 2004).

Assim como algumas espécies de *Burkholderia*, alguns membros do gênero *Cupriavidus* são capazes de infectar seres humanos e podem provocar graves quadros septicemia (infecção generalizada), como é caso da espécie *C. gilardii* (KARAFIN et al., 2010). Vale ressaltar que as infecções bacterianas provocadas por *Cupriavidus* são raras, e geralmente acometem pessoas imuno-debilitadas. Já as capacidades de nodular leguminosas e fixar nitrogênio foram detectadas apenas nas espécies *C. taiwanensis* e *C. necator* (PLATERO et al., 2016; LIU et al., 2012; CHEN et al., 2003a). Mais recentemente, estirpes de *C. pinatubonensis* foram isoladas de nódulos de mimosas do Uruguai, contudo, até o momento não foram realizados estudos mais aprofundados para confirmação da capacidade nodulífera.

Embora tenham sido descobertas apenas duas espécies nodulíferas, estas podem ser encontradas em diferentes partes do mundo. *C. taiwanensis* constitui uma espécie nodulífera cosmopolita, havendo registros de ocorrência na América, Ásia, e Oceania (LIU et al., 2012; KLONOWSKA et al., 2012; MISHRA et al., 2012; CHEN et al., 2003a; CHEN et al., 2003b), enquanto que *C. necator* apresenta uma distribuição mais restrita ao continente Americano,

principalmente, no Uruguai e Brasil (SILVA et al., 2012; PLATERO et al., 2016; DALL AGNOL et al., 2017).

Estudos filogenéticos realizados com estirpes de *Cupriavidus* de diferentes origens revelam uma grande homologia de genes conservados e simbióticos, condizentes com um processo de disseminação recente. Interessantemente, a distribuição de *C. taiwanensis* se confunde com a disseminação de *M. pudica*, uma leguminosa altamente adaptada a diversos ambientes que a se alastrou sobre as regiões tropicais e algumas subtropicais, e a qual representa o principal parceiro simbiótico de *C. taiwanensis*. Sob esta visão, alguns autores acreditam que a disseminação de *Cupriavidus* no mundo tenha sido mediada pelas ações humanas, seja de forma intencional ou não (KLONOWSKA et al., 2012).

Ao contrário do que se observa em outras leguminosas, *Cupriavidus* é capaz de induzir a nodulação efetiva e promover uma FBN eficiente com espécies de mimosas. Esta forte e ajustada relação pode ser observada em diversos estudos, seja em ambientes nativos ou exóticos (KLONOWSKA et al., 2012; MISHRA et al., 2012; PLATERO et al., 2016). Entretanto este fenômeno não ocorre para todas as espécies de *Mimosa*, ao invés disso, as associações quase sempre envolvem mimosas invasivas, com destaque para *M. pudica* (LIU et al., 2012; GEHLOT et al., 2013; KLONOWSKA et al., 2012; MISHRA et al., 2012), *M. pigra* (CHEN et al., 2005b), *M. quadrivalvis*, *M. invisa* e *M. strigillosa* (ANDAM et al., 2007). De fato esta relação simbiótica é bastante estreita, e em alguns lugares no mundo há casos de dominância destes rizóbios, como pode ser verificado no Uruguai (PLATERO et al., 2016), Nova Caledônia (KLONOWSKA et al., 2012) e Taiwan (CHEN et al., 2003b).

Além das mimosas, *Cupriavidus* também são capazes de infectar e nodular outras leguminosas. Silva et al. (2012) a partir de um experimento com mudas de leguminosas cultivada em viveiro, conseguiram isolar *C. necator* de *M. caesalpiniiifolia*, *L. leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum*, *P. vulgaris* e *Vigna unguiculata*. Mais recentemente Dall Agnol et al. (2017) isolou estirpes de *C. necator* de *P. vulgaris* e *M. pudica* no estado do Rio de Janeiro. Adicionalmente, Taulé et al. (2012) verificaram que estirpes de *Cupriavidus* estão presentes em nódulos de *Parapiptadenia rígida*. Em todos os casos verifica-se que as leguminosas eram de comportamento promiscuo e de ampla ocupação territorial, o que é condizente com a teoria de que estes simbiotes utilizam-se de seus parceiros como via de propagação e disseminação.

Além da capacidade FBN, *C. taiwanensis* e *C. necator* conseguem bioacumular metais pesados, como Pb, Cu e Cd (CHEN et al., 2008a; FERREIRA et al., 2012), abrindo a perspectiva para utilização biotecnológica de biorremediação do solo. Segundo Chen et al. (2008a), estirpes de *C. taiwanensis* conseguem retirar do sistema aproximadamente 50, 19, e 20 mg/g de Pb, Cu, e Cd, respectivamente. Quando associado as mimosas esta contribuição é ainda maior, alcançando cerca de 485, 25 e 43 mg/g dos mesmos metais, respectivamente, representando um aumento de 86, 12, 70% da capacidade absorviva em relação às plantas não inoculadas (CHEN et al., 2008a).

A ecologia destes microrganismos ainda precisa ser melhor esclarecida, pois não existe um consenso a respeito das condições edáficas necessárias para a ocorrência deles. Para muitos autores o pH alcalino do solo é cotado como um dos principais atributos que favorecem a ocorrência de *Cupriavidus*. De fato, a maioria dos isolados de *Cupriavidus* foram obtidos a partir de plantas crescendo em solos de pH alcalinos ou próximo da neutralidade (KLONOWSKA et al., 2012; MISHRA et al., 2012; ANDAM et al., 2007). Esta tendência foi confirmada pela análise canônica realizada por Dall Agnol et al. (2017). Entretanto, Liu et al. (2012) e Platero et al. (2016) isolaram *Cupriavidus* de mimosas locais de pH ácido próximo de 5,6. Portanto, somente o pH não é capaz de limitar ou favorecer a presença destes simbiotes.

Assim como o pH, a disponibilidade de nutrientes, em especial o nitrogênio do solo, tem sido objeto de estudo para descrever a capacidade competitiva destes simbiontes em associação com *Mimosa*. A partir de ensaios em laboratórios Elliott et al. (2009), verificaram que as estirpes de *Cupriavidus* tendem a ser mais competitiva na presença de diferentes fontes de N (KNO_3 e $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$). De fato, as amostras de solo utilizadas nos estudos de Platero et al. (2016) e Liu et al. (2012) apresentavam altas porcentual de MOS, em média 2,8%. Contudo não se sabe se a fonte nitrogenada afeta a densidade de *Cupriavidus* de vida livre no solo ou se a planta absorve esse N e por alguma rota metabólica favoreça infecção por *Cupriavidus*.

2.3.3. Gênero *Rhizobium*

A etimologia do nome deste gênero provém dos radicais em latim “*Rhizo*” e “*bios*”, o que significa aquilo que vive dentro da raiz, em menção às bactérias diazotróficas capazes de infectar e colonizar o córtex radicular de leguminosas formando estruturas denominadas nódulos. *Rhizobium leguminosarum* foi a primeira descrita (FRANK, 1889), apresentando características comuns a maioria das demais espécies, tais como: bactéria Gram-negativa de crescimento rápido, temperatura ótima de crescimento entre 25-30°C, pH ótimo entre 6-7, colônias brancas ou bege de formato circular, convexa, com diâmetro de 2 a 4 mm, semi-translúcida ou opaca, com moderada ou abundante produção de EPS.

Inicialmente a capacidade de induzir a nodulação em leguminosas era um atributo importante para classificação das espécies de *Rhizobium*. Deste modo, muitas espécies que atualmente foram reclassificadas em outros gêneros, outrora integravam o gênero *Rhizobium*, mesmo apresentando perfis morfológicos e fisiológicos completamente distintos. O exemplo mais claro disso se deu na reclassificação da espécie *Rhizobium japonicum* para *Bradyrhizobium japonicum* para acomodar os rizóbios de crescimento lento (JORDAN, 1982). Mais tarde, *Rhizobium loti*, *R. huakuii*, *R. ciceri*, *R. mediterraneum*, e *R. tianshanense* foram transferidas para o gênero *Mesorhizobium*, sendo estas espécies caracterizadas pelo crescimento intermediário (JARVIS et al., 1997). Com o advento da biologia molecular e os avanços das técnicas tradicionais de microbiologia as classificações destes microrganismos ficaram muito mais precisas, o que refletiu na redução das inconsistências filogenéticas. Atualmente o gênero *Rhizobium* é composto por 115 espécies, incluindo espécies simbióticas, endofíticas e saprofíticas (PARTE, 2018).

A biogeografia do gênero *Rhizobium* consiste em uma ampla disseminação por todos os continentes, com exceção da Antártica. Algumas espécies, como *R. arenae*, são capazes de ocupar nichos ecológica, praticamente inóspitos para a maioria dos microrganismos, tais como areias de deserto (ZHANG et al., 2017). Já outras espécies, como *R. undicola*, *R. alvei* e *R. aquaticum*, conseguem colonizar ambientes aquáticos e, as vezes, estabelecem simbioses nodulíferas com leguminosas aquáticas (YOUNG et al., 2001; SHEU et al., 2015; MÁTHÉ et al. 2018).

A diversidade de ambientes ocupados por estes microrganismos é enorme, assim como a sua versatilidade metabólica. Neste gênero ainda pode-se verificar a existência de espécies xenobióticas, produtoras de N_2O (BEHRENDT, et al., 2016), fitopatogênicos (YOUNG, 2004), endofíticos (CELADOR et al., 2017; ZHANG et al., 2015) entre outros comportamentos interessantes, tanto no aspecto ecológico como também biotecnológico. Por exemplo, os organismos xenobióticos (microrganismos capazes de crescer em ambientes contendo substâncias químicas sintetizada pelo homem) podem ser utilizados nas estratégias de descontaminação de ambientes, caracterizando as técnicas de biorremediação. Recentemente duas espécies (*R. naphthalenivorans* e *R. petrolearium*) apresentaram

capacidade de degradar compostos fenólicos e hidrocarboneto (KAIYA et al., 2012; ZHANG et al., 2012). Já as espécies endofíticas, embora algumas detêm a capacidade nodular leguminosas, não se conhece seus papéis dentro das plantas não-leguminosas, uma vez que a FBN convencional destes microrganismos ocorre dentro dos nódulos. As espécies *R. endophyticum* (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2010), *R. oryzicola* (ZHANG et al., 2015), *R. oryzae* (PENG et al., 2008) e *R. zea* (Celador et al., 2017) são algumas espécies de *Rhizobium* que foram encontradas colonizando tecidos de plantas não-leguminosas.

Contudo, mais da metade das espécies de *Rhizobium* (66 espécies – PARTE, 2018, revisão LPSN) são nodulíferas e se associam com ampla gama de hospedeiros. Considerando somente os hospedeiros originais são pelo menos 53 espécies de leguminosas. Esta radiação do gênero em relação as várias tribos de leguminosas explica, em parte, o sucesso da colonização global por estes organismos. Alguns hospedeiros como *Phaseolus vulgaris* (hospedeiro promíscuo) são nodulados por várias espécies de *Rhizobium*, tais como, *R. aethiopicum*, *R. azibense*, *R. ecuadorensis*, *R. esperanzae*, *R. lusitanum*, *R. mesoamericanum*, *R. paranaense* e *R. phaseoli* (MNASRI et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015; CORDEIRO, et al., 2017; ASERSE et al., 2017; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2012; VALVERDE et al., 2006; DALL'AGNOL et al., 2014). Entre os membros do gênero *Mimosa* a associação com *Rhizobium* spp. possui um comportamento variável. Espécies de comportamento invasivo, tal como *M. pudica*, pode ser noduladas uma gama maior de espécies de *Rhizobium* em relação as endêmicas. Um dos parceiros simbióticos que tem se tornado cada vez mais frequentes é *R. mesoamericanum*, cujo a presença já foi detectada em nódulos de *M. pudica* na Nova Caledônia (KLONOWSKA et al., 2012), Guiana Francesa (MISHRA et al., 2012), e Brasil (*Esta tese*). *M. pudica*, *M. pigra* e *M. diplotricha* também conseguem nodular efetivamente em parceria com *R. etli* e *R. tropici* (ELLIOTT et al., 2009).

Em geral, a especificidade é uma característica mais associada às espécies de mimosas endêmicas, cujo as condições ambientais tende a selecionar os organismos mais adaptados as condições locais, considerando os fatores edoclimáticos (pH, nutrientes, entre outros) e genéticos das plantas hospedeiras (BONTEMPS et al., 2016; GEHLOT et al., 2013). De acordo com os resultados de Elliott et al. (2009) *M. affinis* possui uma especificidade com *R. etli*. Mais recentemente Bontemps et al. (2016) realizou um estudo com mimosas endêmicas do México onde se verificou que possuem uma maior afinidade as espécies de *Rhizobium*.

Assim como ocorre para as leguminosas, as espécies de *Rhizobium* também podem assumir comportamentos promíscuo ou mais específico. Por exemplo, as espécies *R. grahamii*, *R. mesoamericanum*, *R. multihospitium* e *R. vignae* (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2012; HAN et al., 2008; REN et al., 2011) nodulam com pelo menos quatro parceiro de gêneros diferentes, enquanto que *R. sophorae* e *R. sophoriradicis*, até o momento, só nodulam *Sophora flavescens* e *Phaseolus vulgaris* (JIAO et al., 2015).

2.4. Caracterização Polifásica de Rizóbios

Rizóbio é um termo que se convencionou para todas as bactérias que compartilham a capacidade de induzir a formação de nódulos em leguminosas, incluindo gêneros dentro das classes α -proteobacteria e β -proteobacteria. Alguns destes gêneros, por vezes, podem ser facilmente reconhecidos com base em características culturais e morfológicas em meios de cultura seletivos. No entanto, estas características podem apresentar variações decorrentes de fatores ambientais, podendo implicar na identificação equivocadas de gêneros de rizóbios. Além da subjetividade, os isolados bacterianos a medida que são sucessivamente replicadas em meios de cultura podem acumular alterações nas suas estruturas celulares e arranjo de

colônias (polimorfismo). Apesar das limitações, esta caracterização morfológica é uma das primeiras a ser obtidas e pode servir para a seleção de morfogrupos. Os principais atributos amplamente utilizados são relacionados ao metabolismo de crescimento, coloração e formas das colônias, produção de EPS e alteração do pH do meio de cultura (STACKEBRANDT, 2006).

A taxonomia atual de procariotos tem suas bases consolidadas com o advento das tecnologias modernas de genética e biologia molecular. As primeiras tentativas de utilização das informações do DNA foram baseadas no percentual das bases nitrogenadas do DNA G+C de diferentes bactérias. Entretanto, as variações entre organismos próximos eram pouco perceptíveis. Mais tarde, verificou-se a necessidade de uma técnica mais robusta, quando surgiu a técnica de hibridização DNA-DNA, a qual é utilizada até hoje para descrição de novas espécies (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001).

Com o surgimento da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) vieram diversos tipos de marcadores e técnicas de biologia molecular que detectam polimorfismos genéticos diretamente do DNA, o que permitiu ampliar a capacidade de distinção intra e interespecíficas (FALEIRO, 2007). Entre estas técnicas pode-se destacar RAPD (Random amplified polymorphic DNA), a amplificação de sequências *fingerprinting* e rep-PCR (repetitive-sequence-based-PCR) (HUNGRIA et al., 2008). Todas elas são baseadas no princípio da amplificação de sequências únicas de cada estirpe, análogo a uma “impressão digital da bactéria”. A técnica de Box-PCR é um tipo de rep-PCR, que utiliza um único primer para amplificação de sequências de diferentes partes do genoma (em ambas as fitas de DNA) com tamanhos variados, gerando assim um perfil de bandas, após a realização da eletroforese e revelação em luz ultravioleta. Segundo Hungria et al. (2008) os elementos Box são geralmente encontrados nos espaços intergênicos, e os altos polimorfismos podem ser decorrente de mutações silenciosas ocasionadas pelo ambiente. As comparações destes perfis são utilizadas para discriminação das bactérias de forma muito precisa.

Embora estas técnicas sejam bastante úteis para distinção de bactérias, nenhuma delas fornecem informações quanto ao histórico evolutivo e as relações filogenéticas entre diversos grupos de bactérias. Para isso, o gene ribossomal 16S rRNA, foi eleito como o marcador universal para os estudos taxonômicos de procariotos. Este gene apresenta algumas características, pelas quais foi escolhido, das quais destacando-se: a ubiquidade e a constância funcional, ancestralidade comum, a estabilidade genética, tamanho apropriado, além do fato da evolução da molécula ocorrer de forma independente em diferentes domínios (STACKEBRANDT, 2006). Consequentemente foi formada uma ampla base de dados deste gene, o que contribuiu para comparação de bactérias em todo mundo, incluído os rizóbios (RIVAS et al., 2009). Trata-se de um gene com aproximadamente 1600 pares de base (bp) codificante para o RNA componente da menor subunidade dos ribossomos dos organismos procariotos, sendo essencial para manutenção das funções vitais das células bacterianas. Em geral, o 16S rRNA contém regiões conservadas e nove "regiões hipervariáveis" que são mais informativas para os estudos taxonômicos (CHAKRAVORTY et al., 2007).

Embora o 16S rRNA venha sendo utilizado como base de estudos taxonômicos, estudos recentes trazem evidências que, em alguns casos, a análise filogenética também podem apresentar distorções em virtude da ocorrência de múltiplas cópias de um mesmo gene, até mesmo no operon de RNA ribossomal de um mesmo genoma bacteriano (ACINAS et al., 2004). Adicionalmente, Rivas et al. (2004) ressaltam a possibilidade de haver transferências laterais de genes e recombinações gênicas, as quais podem comprometer a filogenia baseada exclusivamente no 16S rRNA.

Além do mais, segundo Menna et al. (2009), a capacidade de distinção do gene 16S rRNA é limitada em se tratando de organismo muito próximos. Alternativamente, novas

abordagens taxonômicas baseadas em outros marcadores moleculares vêm sendo amplamente utilizadas para cobrir as limitações da filogenia do gene 16S rRNA. Genes como *recA*, *gyrB*, *rpoB* e *glnII* têm ganhado destaque em estudos de taxonomia de rizóbios (CHANG et al., 2011; RIBEIRO et al., 2009; BINDE et al., 2009; RIVAS et al., 2009; MENNA et al., 2009). Isto porque estes genes possuem estabilidade genética, porém apresentam maiores divergências genéticas em relação ao 16S rRNA (RIBEIRO et al., 2009; MENNA et al., 2009). Dados extraídos do trabalho de Menna et al. (2009) mostraram que as sequências dos genes housekeeping têm em médias 15% mais sítios de variações em relação ao 16S rRNA.

Este grupo de genes funcionais são denominados “housekeeping” devido a importância na manutenção das funções vitais das células bacterianas. O gene *recA* está relacionado à síntese da enzima recombinase A, a qual é responsável pelos processos de recombinação de sequências de DNA complementar e permite a troca de fragmentos de DNA; o *gyrB*, codifica para uma topoisomerase II, envolvida no desenovelamento do DNA durante a replicação do cromossomo bacteriano; o *rpoB*, é o gene responsável pela síntese de elementos essenciais na transcrição do DNA para mRNA; o *glnII* codifica para glutamina sintetase, fundamental para incorporação de nitrogênio em componentes celulares como amino ácidos e bases nitrogenadas do DNA.

Quando analisados de forma conjunta (análise de sequência multilocus – MLSA) detém um alto poder de resolução das relações filogenéticas. Segundo Rivas et al. (2009) a lógica por trás da combinação de genes está no nivelamento de sinais conflitantes entre as análises individuais dos mesmos, revelando agrupamentos mais coerentes. Por este motivo, a MLSA é uma ferramenta bastante empregada em estudos de espécies próximas e descrição de novas espécies de rizóbios (RIVAS et al., 2009; WANG et al., 2013a; WANG et al., 2013b).

Além das filogenias baseadas em genes housekeeping, a evolução dos métodos e equipamentos de biologia molecular tornaram o sequenciamento do genoma completo uma prática muito mais acessível aos laboratórios de todo o mundo. Com isso a comparação de genomas completos entre espécies vem sendo utilizada em substituição as técnicas gold-standard, como a hibridização DNA-DNA (GORIS et al., 2007). A técnica de ANI (average nucleotide identity) consiste na comparação dos genomas entre espécies correlacionadas, sendo aceita para descrições de novas espécies. Além da praticidade, a principal vantagem deste método é o acesso às variações contidas no genoma em regiões não codificantes e/ou pouco estudadas, as quais podem fornecer um maior poder de discriminação de organismos proximamente relacionados.

Embora as informações genéticas possam determinar separação das diferentes linhagens de bactérias, a descrição de uma nova espécie envolve uma série de outras caracterizações fenotípicas, englobando aspectos de desenvolvimento celular (perfil de ácidos-graxos, aspectos em meios de cultura, estruturas celulares) e bioquímicos (perfil de absorção de fontes de carbono, perfil metabólico, sensibilidade a diferentes elementos e resistência a antibióticos).

2.5. Biomas Brasileiros

O conceito de Bioma é amplamente difundido em muitos materiais bibliográficos e oficializado pelo IBGE (2004a) como um conjunto de vida (animal e vegetal) agrupados em um contínuo de vegetação em uma escala regional, com condições geoclimáticas e mudanças semelhantes, que resultam em uma diversidade biológica característica. Contudo, com o passar do tempo e evolução de outros campos da ciência naturais, como por exemplo, a

pedologia, o termo incorporou diversos outros atributos importantes para reunir ecossistemas como uma unidade. Assim, para Coutinho (2006) o termo deve considerar:

“... uma área do espaço geográfico, com dimensões de até mais de um milhão de quilômetros quadrados, que tem por características a uniformidade de um macroclima definido, de uma determinada fitofisionomia ou formação vegetal, de uma fauna e outros organismos vivos associados, e de outras condições ambientais, como a altitude, o solo, alagamentos, o fogo, a salinidade, entre outros ...”.

Segundo o mesmo autor tais características, conferem estrutura, funcionalidade e ecologia própria, das quais são reconhecidas como um bioma.

O Brasil é subdividido em seis biomas (tabela 1): Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampa e Pantanal, sendo os quatro primeiros os maiores em extensão, abrangendo aproximadamente 96,17% do território brasileiro (IBGE, 2004a).

Tabela 1. Biomas brasileiros e suas dimensões.

Biomas continentais brasileiros	Área Aproximada (km²)	Área / Total Brasil (%)
Amazônia	4.196.943	49,29
Cerrado	2.036.448	23,92
Mata Atlântica	1.110.182	13,04
Caatinga	844.453	9,92
Pampa	176.496	2,07
Pantanal	150.355	1,76
Área Total Brasil	8.514.877	-

Fonte: IBGE, 2004a.

2.5.1. Bioma Amazônia

Amazônia é o maior bioma do Brasil (IBGE, 2004a) estendendo-se por toda região norte, parte dos estados do Maranhão e do Mato Grosso, correspondendo quase a metade de todo território brasileiro. Embora a maior parte deste bioma seja coberto por florestas ombrófilas densas e abertas, típicas da região, pode-se encontrar florestas estacionais, florestas de igapó, campos alagados, várzeas, savanas, refúgios de montanhas, campinaranas e formações pioneiras (Serviço Florestal Brasileiro – SFB, 2016). Essa grande variedade florística abriga uma das maiores diversidades de animais e também de microrganismos (IBGE, 2004a).

Este bioma é formado por um grande conjunto de ecossistemas dispostos em mosaicos, que segundo Vale Junior et al. (2011), é decorrente da combinação de fatores geológicos, geomorfológicos, vegetação e clima, iniciado a partir do mesozoico, durante o plioceno até os dias atuais. Segundo os mesmos autores, eventos ocorrido como soerguimentos e fraturamentos (ex. Cordilheira dos Andes), inversão de todo sistema de drenagem (ex. inversão do curso do rio Amazonas), mudanças climáticas e expansão das áreas de cerrado nos períodos secos foram determinantes para formação das feições atuais.

De modo geral o clima amazônico é fortemente condicionado pela latitude próxima a linha do equador, o que implica em altas temperaturas durante quase todo o ano, com de média entre 24 e 26°C (FISCH et al., 2017). O bioma é marcado por apresentar uma

precipitação, que está intimamente ligada a alta umidade decorrente dos fenômenos de evapotranspiração das florestas, e deslocamento de massas de ar úmidas advindas do oceano atlântico. Segundo Loureiro et al. (2014) os principais sistemas atmosféricos que atuam no tempo e no clima da região Amazônia são: a Zona de Convergência Intertropical (ZCIT), Zona de Convergência do Atlântico Sul (ZCAS), Linhas de Instabilidade (LI), Complexos Convectivos de Mesoescala (CCM), Ondas de Leste e as Brisas terrestre e marítima. Porém, a precipitação pluviométrica é distribuída de forma heterogênea, por exemplo, no estado de Roraima, onde encontra-se uma extensa área de savana (43.358 Km²), a precipitação pode alcançar médias de aproximadamente 1700 mm/ano (\pm 400 mm) (ARAUJO et al. 2001), contrastando com as médias de outras zonas da Amazônia onde a precipitação varia entre 2500 e 3000 mm/ano. Deste modo, de acordo com a classificação de Koppen, a Amazônia apresenta três climas: Af, Am, Aw, subentendidos climas equatoriais ou tropical úmido (ALVARES et al., 2014).

Segundo Vale Junior et al.(2011), a geologia da Amazônia é, essencialmente, um a bacia sedimentar formada durante o período arqueano até o holoceno (3,8-2,5 bilhões de anos até os dias atuais), com a presença marcante de formações antigas como os Escudos Cristalinos brasileiros que proveram o material de origem, predominantemente de rochas graníticas e gnaisses.

O relevo remete a uma região pouco influenciada pelas atividades sísmicas recentes, apresentando em sua maior parte, superfícies aplainadas ou levemente onduladas de baixa altitude, além de planícies fluviais, fluvi-marinhas, relevos residuais (Serras), planalto, planalto rebaixado e depressões (VALE JUNIOR et al., 2011).

Os fatores pedogenéticos (material de origem: rochas ácidas; clima: quente e úmido; relevo: aplainado em uma bacia sedimentar) foram essenciais para a formação dos solos amazônicos atuais, dos quais são predominantemente das Classes Latossolo, Argissolo, Plintossolo e Espodossolo, essencialmente de carácter distrófico. Outras classes de solos e carácter eutrófico são mais raras. De modo geral os solos da Amazônia são caracterizados por serem naturalmente pobres em nutrientes, com elevada saturação por alumínio, densidade do solo elevada, com adensamento e com susceptibilidade de compactação e erosão (VALE JUNIOR et al., 2011).

2.5.2. Bioma Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro ocupando cerca de 24 % de todo o território, estendendo-se desde a zona litorânea do estado do Maranhão até o sudoeste do estado de Mato Grosso do Sul (IBGE, 2004a), englobando parte dos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo e Tocantins, além do Distrito Federal (SANO et al., 2008).

O clima dessa região é do tipo tropical sazonal, com um período chuvoso que dura de outubro a março, seguido por um período seco (COUTINHO, 2002), caracterizando-se do tipo As e BSh, segundo a classificação de Koppen (ALVARES et al., 2014). A precipitação média anual fica entre 1200 e 1800 mm concentrando as chuvas durante a primavera e verão. A precipitação cai durante os meses de maio a setembro podendo atingir índices pluviométrico de 0 mm (COUTINHO, 2002). Esta baixa precipitação resulta em níveis muito baixos de umidade (15% ou menos) durante a estação seca coincidindo com o período que são registradas as maiores ocorrências de queimadas no Cerrado (MIRANDA et al., 2009).

A temperatura do Cerrado é mais amena em relação àquelas proveniente dos biomas Amazônia e Caatinga, obtendo média anual em torno de 22 e 23°C. Apesar disso a amplitude térmica pode apresentar uma grande variação em função da latitude, onde as máximas podem

alcançar 40°C nos estados mais ao norte, e mínimas próximas de 0°C na porção mais ao sul do bioma (COITINHO, 2002).

Segundo Sano et al. (2008) o bioma Cerrado é composto por um conjunto vegetacional caracterizados por três formações: 1. Florestais, com formação de dossel contínuo ou descontínuo e predomínio de espécies arbóreas; 2. Savânicos, com presença de áreas com árvores e arbustos espalhados sobre uma vegetação graminácea, sem a formação de dossel contínuo; 3. Campestre, compreendendo um predomínio de espécies herbáceas e algumas arbustivas, mas sem a presença de árvore na paisagem.

Embora menosprezado por programas de conservação, o Cerrado, é o segundo bioma mais biodiverso do Brasil. Segundo Klink e Machado (2005) o Cerrado contém a mais rica savana tropical do mundo, abrigando uma grande biodiversidade de plantas e animais, dos quais muitos são endêmicos do Cerrado. Segundo os mesmos autores, considerando somente a diversidade de plantas existe cerca de 7.000 espécies, e destas, 44% são endêmicas, incluído espécies do gênero *Mimosa* (SIMON et al., 2010).

Além da importância ecológica, a diversidade do Cerrado tem um grande potencial biotecnológico, levando em consideração, por exemplo, os diversos princípios ativos contidos em espécies de plantas e animais para a fabricação de fármacos, ou a obtenção de variedades de plantas resistentes às condições de estresse hídrico, ou a obtenção de microrganismos promotores de crescimento vegetal. Entretanto, estima-se que cerca de 45% da área do Cerrado original tenha sido alterado para diferentes usos da terra, destacando a substituição da vegetação nativa por pastagens (Tabela 2) (MACHADO et al., 2004).

Tabela 2. Uso da terra do bioma Cerrado.

Uso da Terra	Área (Ha)	% da área central do bioma
Área Nativa	70.581.162	44,53
Pastagem Plantada	65.874.145	41,56
Agricultura	17.984.719	11,35
Florestas Plantadas	116.760	0,07
Áreas Urbanas	3.006.830	1,90
Outros	930.304	0,59
Total	158.493.921	-

Fonte: Machado et al. (2004).

Para Klink e Machado (2005) um dos principais motivos pelo qual o Cerrado encontra-se em constante pressão está na disposição do código florestal brasileiro, que obriga a preservação de somente 20% das áreas nativas dentro das propriedades rurais, enquanto nas áreas de florestas são exigidos 80%. Machado et al. (2004) estimam que restam menos da metade (44%) de áreas nativas do Cerrado, incluindo algumas unidades de conservação como Parque Nacional das Emas, Parque Nacional Grande Sertão Veredas, Parque Nacional da Chapada dos Guimarães Parque Nacional da Serra da Canastra, Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, o Parque Nacional de Brasília, e terras indígenas (COUTINHO, 2016).

Os solos do Cerrado foram originados a partir de sedimentos do período terciário, constituindo-se solos bastante evoluídos, principalmente das classes Latossolo e Argissolo (CARVALHO, 2011). A textura dos solos é predominada pela fração areia e em seguida por argila, predominando as classes texturais arenosas, areno-argilosa, e ocasionalmente argilosa. Assim, apesar de apresentar muitos poros, estes solos apresentam baixa capacidade de retenção de água (ALLEONI; CAMARGO, 1995). Outra característica marcante destes solos são as altas concentrações dos elementos Fe e Al nas formas dos minerais oxihidróxido de Fe

(hematita e goethita) e Al (gibbsita), conferindo uma coloração avermelhada ou amarelada (CORRÊA et al., 2008). Além da coloração, estes minerais estão associados à baixa troca catiônica (CTC), intensa fixação de fósforo (carga negativa), lixiviação de cátions como Mg^{+2} , Ca^{+2} , K^{+} , alta saturação por Al^{+3} e pH ácido, predominando assim, o caráter distróficos (CORRÊA et al. 2008). Muitas dessas características estão correlacionados com o comportamento anfitero destes minerais com PCZ (ponto de carga zero) próximo ao pH 7 e a acidez natural destes solos, resultando em um balanço de cargas essencialmente positivas (ALLEONI; CAMARGO, 1995). Por este motivo, a matéria orgânica do solo (MOS) (contribuição com cargas negativas), tem grande contribuição para o aumento da fertilidade, principalmente pela retenção e ciclagem dos nutrientes, os quais são utilizados no desenvolvimento vegetal e microbiano, mesmo em valores de pH baixo. Simultaneamente, a MOS também atua em importantes propriedades físicas do solo, como por exemplo, retenção de água através do aumento da microporosidade e estruturação do solo (BAIDA et al., 2011).

Embora o Cerrado apresente muitas limitações de fertilidade à implementação da agricultura, os atributos físicos dos solos associados com o relevo plano propiciaram uma fácil mecanização para o preparo do solo, correção da acidez, aplicação de fertilizantes e plantio. Assim, segundo Machado et al. (2004) mais da metade das áreas do Cerrado original foram convertidos em sistemas agrícolas de pecuária (Tabela 2).

2.5.3. Bioma Caatinga

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, com aproximadamente 850.000 Km^2 , se estende por todos os Estados do nordeste e uma pequena porção do Estado de Minas Gerais, fazendo fronteiras com as porções norte dos biomas Cerrado e Mata Atlântica (IBGE, 2004a). O termo Caatinga tem origem Tupi-guaraní que significa mata branca, em menção ao tipo de vegetação encontrada neste Bioma (PRADO, 2003).

Geologicamente, pode-se observar diversas feições, das quais foram formadas a partir do processo de intemperismo de rochas do cristalino pré-cambriano (granito, gnaisses e xisto) e sedimentos do terciário (AB'SÁBER 1974 *apud* QUEIROZ, 2009), formando oito ecorregiões (DAMASCENO, 2007): Complexo da Chapada Diamantina; Complexo de Campo Maior; Complexo Ibiapaba (Araripe); Depressão Sertaneja Meridional; Depressão Sertaneja Setentrional; Dunas do São Francisco; Planalto da Borborema; e, Raso da Catarina.

Com relação ao clima, a Caatinga apresenta muitas características extremas, entre elas destaca-se a alta radiação, baixa nebulosidade, altas temperaturas e baixa umidade, o que segundo Trovão et al. (2007) potencializa o processo de evapotranspiração. Segundo Prado (2003), uma outra característica marcante deste bioma são as precipitações com regimes irregulares e a altamente sazonal, onde verifica-se que a maior parte do bioma (50-70%) apresenta períodos chuvosos de três meses consecutivos, geralmente iniciando durante o mês de fevereiro e se estendendo até março. Segundo os mesmos autores, 50% das regiões da Caatinga recebe cerca de 750mm anuais, sendo observado regiões com precipitações mais elevadas (1200mm) a leste do bioma, compreendendo as formações de chapadas e serras. A precipitação também pode atingir índices menores que 500mm nas porções mais a oeste do Estado de Pernambuco.

Parte dos baixos índices pluviométricos, e conseqüentemente da aridez deste bioma, se deve ao efeito orográfico, imposto pelas formações montanhosas litorâneas, que estende desde o Estado de Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, fazendo com que grande parte a umidade vinda do oceano Atlântico se precipite em forma de chuva na faixa litorânea, correspondendo o bioma Mata Atlântica (PRADO, 2003). Segundos os mesmos autores, a Caatinga é abastecida principalmente pelas chuvas provenientes das Zonas de Convergências

Intertropical e Zona equatorial levando umidade dos oceanos para o continente, correspondendo o período chuvoso. De acordo com Moura (2017), as médias anuais de temperatura variam entre 23 e 27°C. Contudo, variações significativas podem ser observadas em áreas de maior altitude como nos estados do Ceará, Bahia e Pernambuco, onde as temperaturas ficam em torno de 23 e 25°C. No semiárido as temperaturas tendem a ser mais elevadas, podendo atingir médias de 27,5°C. De acordo com todas as características apresentadas o clima do cerrado, em sua maior parte é do tipo Aw de acordo com a classificação de Köppen (ALVARES et al., 2014).

Segundo Prado (2003) a vegetação do Bioma, pode ser genericamente caracterizada com florestas estacionárias de baixo porte com dossel descontínuo e com árvores ramificadas espinhosas e aculiosas. Entretanto, Queiroz (2009) ressalta a que esta classificação genética não contempla toda a diversidade de espécies e estruturas vegetacionais do Bioma, podendo ser observados pelo menos três tipos de vegetação na Caatinga, sendo elas a caatinga, as florestas estacionais e serranas, e o carrasco. A caatinga é a vegetação típica do bioma, constituindo-se de plantas de baixo porte (3 a 7m) com comportamento semidecíduo durante o período de escassez hídrica, apresentando troncos finos e folhas pequenas. Neste tipo de vegetação ainda constam cactáceas, bromélias terrestres, bem como gramíneas rasteiras durante o período de chuvas. As florestas estacionais e serranas são associadas às regiões mais ao leste, sob influência das zonas com maiores índices de precipitação e solos mais férteis. Estas características se refletem sobre a fisionomia vegetal, podendo observar árvores de grande porte (10 a 20m) com formação de dossel. Em adição, a maior parte das plantas são caducifólias, não se distinguindo muito das vegetações da Mata Atlântica. Outras plantas sub-bosque também compõem este tipo de vegetação, destacando-se cipós, cactos e epífitas. Por fim, o Carrasco, que é composta por plantas do semiárido de porte médio, com estrato arbóreo-arbustivo muito denso, geralmente encontrado sob areia quartzosa no Estado do Ceará.

De acordo com LEAL et al. (2003) os solos do bioma Caatinga podem ser comparados a um grande mosaico. Contudo, nota-se uma predominância de solos mais rasos, pedregosos e desprovido de muitos nutrientes nas regiões de afloramento da rocha matriz. Estes são solos litólicos. Por outro lado, nas regiões mais aplainadas verifica-se a ocorrência de Latossolo, sendo estes profundos, bem drenados, ácidos e de baixa a moderada fertilidade. Pode-se verificar a ocorrência de solos vérticos em detrimento do processo de evolução do solo e um clima mais seco. As principais características destes solos é a presença de argila de alta atividade, como montmorilonita (2:1). Além disso estes apresentam maior teor de bases, ao mesmo tempo que contêm teores elevados de sódio, o que os tornam propensos ao processo de salinização.

2.5.4. Bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica é o terceiro maior bioma do Brasil com cerca de 1.110.182 km² se estendendo desde o estado do Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, passando pelos estados do Piauí, Ceará, Pernambuco, Paraíba, Sergipe, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Santa Catarina e Paraná (IBGE, 2004a; IBF, 2017). Destes estados apenas os estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Santa Catarina estão integralmente contidos no bioma Mata Atlântica, os demais estados apresentam de 3 a 98% do bioma (Tabela 3). De acordo com Rizzini (1997) a área principal da Mata Atlântica está nas grandes Serras do Mar e da Mantiqueira, abrangendo os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo.

Tabela 3. Abrangência do bioma Mata Atlântica em diferentes estados brasileiros.

Estados Brasileiros	Abrangência
Alagoas	53%
Bahia	33%
Ceará	3%
Espírito Santo	100%
Goiás	3%
Mato Grosso do Sul	18%
Minas Gerais	46%
Paraíba	12%
Paraná	98%
Pernambuco	18%
Piauí	9%
Rio de Janeiro	100%
Rio Grande do Norte	6%
Rio Grande do Sul	48%
Santa Catarina	100%
São Paulo	68%
Sergipe	54%

Fonte: (IBF, 2017).

Embora a grande parte deste bioma encontra-se altamente degradados acredita-se que nos anos de 1500 a Mata Atlântica formava um grande contínuo de florestas, predominantemente ombrófila. Atualmente estima-se que menos de 10% apresentam-se preservados, sendo as florestas remanescente distribuídas em aproximadamente 232.939 fragmentos, dos quais apenas 18.397 são maiores que cem hectares 1 km² (IBF, 2017). Grande parte das áreas preservadas encontram-se dentro de áreas de preservação incluindo 131 unidades de conservação federais, 443 estaduais, 14 municipais e 124 privadas, com distribuição por dezesseis estados (IBF, 2017). A degradação da Mata Atlântica foi potencializada a partir do processo histórico de colonização do Brasil que se deu principalmente nas regiões litorâneas, com a criação das grandes cidades, e também da intensificação progressiva das atividades humanas sobre os ecossistemas destacando-se as atividades agropecuária, como por exemplo, a implantação da cafeicultura e os canaviais nas regiões sudeste e nordeste; e o extrativismo predatório da madeira nobres, entre estas o pau-brasil.

Além disso, no atual cenário, cerca de 70% da população brasileira vive no território da Mata Atlântica. Este adensamento populacional sem uma cultura de preservação do ambiente ameaça a sustentabilidade dos ecossistemas pelo uso irracional dos recursos naturais tais como a água, o solo, a vegetação, entre outros. A exemplo do que já ocorreu com as matas, os recursos hídricos vem sofrendo drásticas mudanças tanto na quantidade quanto na qualidade, principalmente pela liberação de dejetos e substâncias agressivas a vida de animais e plantas (SOS MATA ATLÂNTICA, 2016; IBF, 2017).

A Mata Atlântica é constituída principalmente de ecossistemas costeiros, morros e serras, situados em meio a nove grandes bacias hidrográficas do Brasil, alimentadas pelos rios São Francisco, Paraíba do Sul, Doce, Ribeira de Iguape e Paraná (Instituto Brasileiro de

Florestas – IBF, 2017). Nela está contida uma grande variedade de animais, plantas e microrganismos, muitos dos quais só são endêmicos (TABARELLI et al., 2005). A partir do Decreto Federal 750/93 foi definido que os ecossistemas que compõem a Mata Atlântica são as florestas ombrófilas (densa, aberta e mista), florestas estacionais (decidual e semidecidual), mangues e restingas. Adicionalmente pode-se incluir ecossistemas associados como os campos de altitude, brejos interioranos e ilhas oceânicas no litoral.

As florestas ombrófilas são caracterizadas por uma vegetação de grande porte estabelecida ao longo da cordilheira atlântica, condicionada pelas altas temperaturas e umidade. A composição vegetal passa a incluir florestas de araucárias e pinheirais a medida que o relevo aumenta nos planaltos (SOS Mata Atlântica, 2018). Já as florestas estacionais compreendem-se vegetações transicional entre as florestas de encostas litorâneas para as formações abertas, as quais são influenciadas pelo carácter sazonal bem definido de períodos chuvosos e de secas. Esta fitofisionomia é caracterizada pela presença de árvores de comportamento decidual ou semi-decidual (desprendimento da folhagem na estação seca) que podem compor de 10 a 80% da paisagem (SOS Mata Atlântica, 2016). As florestas de tabuleiros, por sua vez, se desenvolveram em planícies oriunda dos sedimentos de terciário, apresentando suaves ondulações a 20-200 m em relação ao nível do mar. De acordo com Rizzini (1979) *apud* SOS Mata Atlântica (2018), de modo geral a vegetação que ocorrem nas proximidades do litoral se distinguem daquelas encontradas mais no interior do continente, e isso é decorrente de um gradiente climático/topográfico. No interior do nordeste ainda pode-se observar presença dos brejos de altitude, o qual é caracterizado pela formação de ilhas de florestais (florestas ombrófilas) geradas a partir do efeito orográfico do relevo mais elevado (superior a 600m) sobre as massas de ar vindo oceano Atlântico, resultando em uma precipitação média superior a 850 mm. Um outro ecossistema marcante são as restingas, sendo estas caracterizadas por vegetação crescendo nas planícies sedimentares, geralmente dando acesso as áreas de desembocaduras fluviais (GOMES, 1995).

Esta heterogeneidade dos ecossistemas está interligada com a grande extensão longitudinal que cobre uma grande variedade de zonas climáticas. De acordo com IBGE (2004a) há um predomínio do clima quente (equatorial ou tropical) que se estende do Rio Grande do Norte ao Espírito Santo, com estação seca variando de um a três meses no ano. Nestas regiões a temperatura média é superior a 18°C. Nas mediações dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo apresentam-se zonas de transição para os climas subquente e mesotérmico brando com média de temperatura entorno de 15 a 18°C e 10 a 15 °C, respectivamente. A medida que se avança para o sul do Brasil o clima mesotérmico ganha maior expressão, começando no estado de São Paulo e se estendendo para os estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. De acordo com a classificação de Koppen a Mata Atlântica possui 7 diferentes climas, sendo estes: Af, Aw, As, Cfa, Cfb, Cwa, Cwb (ALVARES et al. 2014). Em meio a todas estas diferenças inerente a cada região, uma característica as une como um bioma, o ar úmido proveniente do oceano Atlântico que proporcionam índices pluviométricos de até 4000 mm em algumas regiões da Serra da Mantiqueira (TABARELLI et al., 2005).

Um outro fator importante na diversificação dos ecossistemas da Mata Atlântica é em relação ao relevo e geologia, que por sua vez estão interligados com a formação de solos de naturezas bastante discrepantes. Quanto a geologia, verifica-se um predomínio de material de origem do escudo cristalino (formação pré-cambriana), seguido de sedimentos recentes e antigos dos períodos cenozoico e paleozoico, respectivamente, e do derrame do basalto. Destas formações geológicas, o escudo cristalino é o que abrange a maior parte da Mata Atlântica, se estendendo do Paraná até a região do semiárido nordestino. Devido sua constituição ser composta basicamente de rochas antigas graníticas e gnaisses, os solos

formados a partir destes materiais tendem a apresentar carácter ácido e baixa disponibilidade de nutrientes, como por exemplo, Argissolos e Latossolos de carácter distróficos nas porções médias e bem drenadas das paisagens; Planossolo e Gleissolo nas áreas de baixadas; e Cambissolo nas faces mais escarpadas de serras e montanhas. Pode-se observar a presença marcante de feições montanhosas ao longo do litoral Atlântico decorrente de dobramentos recentes e pouco desgastados dando-lhes formatos de “meias laranjas”. Estes dobramentos foram definidos pelo professor Aziz N. Ab'Sáber como “mar de morro” em alusão as ondas do mar.

Ao sul do Brasil existe uma grande mancha de rochas de natureza basáltica decorrente de um evento vulcânico recente (Período Cretáceo) e que se espalhou a longo da bacia do Paraná (LEINZ, 1949). Estas rochas são naturalmente constituídas por minerais básicos, o que proporcionam a formação de solos mais ricos em nutrientes, como por exemplo, Nitossolo e Latossolo eutrófico. Na planície litorânea do Brasil o que se observa é a presença sedimentos do período terciário, que por natureza são pobres em nutrientes. Nesta formação encontram-se os tabuleiros costeiros e as falésias, onde pode-se notar as diferentes deposições de materiais ao longo das formações das paisagens (SOS Mata Atlântica, 2016). De acordo com Magnago et al. (2010) no Espírito Santo pode-se identificar quatro principais classes, as quais estão correlacionadas com relevo e a drenagem. Nas posições mais baixas, há um predomínio da classe Gleissolos, enquanto que nas áreas sob influência da floresta também pode-se identificar a classe Organossolo. Nas porções mais drenadas foram identificadas as classes de textura mais arenosa, como Spodossolo e principalmente Neossolo. Este cenário também pode ser observado no litoral paulista, onde os solos foram essencialmente de textura arenosa, apresentando sedimentos provenientes do mar ou sedimentos coluviais das encostas (COELHO et al., 2010).

3. CAPÍTULO I

SIMBIONTES DE MIMOSAS EM DIFERENTES BIOMAS BRASILEIROS

3.1. RESUMO

A nodulação de mimosas por beta-rizóbios tem sido alvo de muitas pesquisas ao redor do mundo. No Brasil, os estudos prévios mostram uma completa supremacia de *Paraburkholderia* associadas as espécies de mimosas disseminadas e endêmicas do Cerrado e do Caatinga. Entretanto a diversidade em outros biomas ainda é um mistério. Este estudo se propôs trazer a luz a diversidade destes simbioss nos quatro maiores biomas brasileiros, através de técnicas de microbiologia convencional, microscópica e de biologia molecular. Foram isoladas 724 rizóbios de 16 espécies de mimosas invasivas e endêmicas, perfazendo 25 sítios dentro dos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica. A maioria destes isolados apresentou rápido crescimento, reação alcalina em meio de cultura, e colocação variando entre creme e amarela. Uma coleção de 188 isolados representativos foi selecionada com base na técnica de Box-PCR e nos perfis fenotípicos, para os testes de nodulação onde verificou-se que 106 (55%) induziram nodulação e representaram cerca de 80% da coleção geral. Estes isolados induziram diferentes fenótipos de nodulação dependendo da espécie e estirpe inoculada, destacando a variação da coloração, a quantidade e os tamanhos dos nódulos produzidos. Entre os isolados que exibiram capacidade nodulífera, 98 foram utilizados nos estudos filogenéticos utilizando os genes 16S rRNA e *recA*, bem como a filogenia dos genes simbióticos (*nifH* e *nodC*). Os beta-rizóbios, incluindo *Paraburkholderia* e *Cupriavidus*, foram os principais simbioss encontrados, e os estados da Bahia, Goiás e Paraná foram os únicos que obtiveram uma dominância completa por isolados do gênero *Paraburkholderia*. *Cupriavidus* apresentou ampla distribuição sendo encontrado em todos os biomas analisados, exceto no Cerrado. Neste bioma, *Paraburkholderia* spp. foram dominantes nos ambientes naturais, enquanto que em uma condição de solo alterado (pH 7) observou-se uma mudança na dominância, em que *Rhizobium* sp. constituiu o principal simbioss de *Mimosa pudica* em Brasília. Estes isolados posicionaram-se separadamente de qualquer outra espécie relacionada, indicando se tratar de uma nova espécie. O gênero *Rhizobium* também esteve presente em nódulos de mimosas dos estados do Ceará, Minas Gerais e Rio de Janeiro, mas as proporções não passaram de 2%. Já em Roraima estes simbioss representaram quase 40% dos isolados. Com base nas árvores filogenéticas dos genes *nodC* e *nifH* foi possível observar poucas incongruências intraespecíficas. Entre os isolados do gênero *Cupriavidus* houve uma distinção entre genes dos isolados provenientes da América do Sul e de outros simbioss de regiões vizinhas.

Palavras-chave: Beta-rizóbios. Bioma. *Cupriavidus*. América do Sul.

3.2. ABSTRACT

The nodulation of mimosas by beta-rhizobia has been the subject of much research around the world. In Brazil, the previous studies show a complete supremacy of *Paraburkholderia* associated with the species of disseminated and endemic mimosas of Cerrado and Caatinga. However, diversity in other biomes is still a mystery. This study aims to bring to light the diversity of these symbionts in the four largest Brazilian biomes, using conventional microbiology, microscopic and molecular biology techniques. 724 rhizobia from 16 invasive and endemic mimosas species were isolated, making up 25 sites within the Amazon, Cerrado, Caatinga and Mata Atlântica biomes. Most of these isolates presented rapid growth, alkaline reaction in culture medium, and placing varying between cream and yellow. A collection of 188 representative isolates was selected based on the Box-PCR technique and phenotypic profiles for nodulation tests where 106 (55%) induced nodulation and accounted for about 80% of the overall collection. These isolates induced different nodulation phenotypes depending on the species and inoculated strain, highlighting the color variation, quantity and size of the nodules produced. Among the isolates that exhibited noduliferous capacity, 98 were used in phylogenetic studies using the 16S rRNA and *recA* genes, as well as the phylogeny of symbiotic genes (*nifH* and *nodC*). Beta-rhizobia, including *Paraburkholderia* and *Cupriavidus*, were the main symbionts found, and the states of Bahia, Goiás and Paraná were the only ones that obtained complete dominance by isolates of the genus *Paraburkholderia*. *Cupriavidus* presented a wide distribution being found in all biomes analyzed, except in the Cerrado. In this biome, *Paraburkholderia* spp. were dominant in natural environments, whereas in a modified soil condition (pH 7) a change in dominance was observed, in which *Rhizobium* sp. was the main symbiont of *Mimosa pudica* in Brasília. These isolates were positioned separately from any other related species, indicating whether it was a new species. The genus *Rhizobium* was also present in mimosas nodules from the states of Ceará, Minas Gerais and Rio de Janeiro, but the proportions did not exceed 2%. In Roraima, these symbionts represented almost 40% of the isolates. Based on the phylogenetic trees of the *nodC* and *nifH* genes, few intraspecific incongruities could be observed. Among the isolates of the genus *Cupriavidus* there was a distinction between genes from isolates from South America and other symbionts from neighboring regions.

Key words: Beta-rhizobia. Biome. *Cupriavidus*. South America.

3.3. INTRODUÇÃO

Mimosa constitui-se um dos mais maiores gêneros de leguminosas no mundo com cerca de 536 espécies descritas (LEWIS et al., 2005). Sendo essencialmente plantas tropicais, elas ocorrem naturalmente na América do Sul, América central, na porção Sul da América do norte, Sudeste a África e Sul da Ásia (DOS REIS JUNIOR et al., 2010; BONTEMPS et al., 2010; BONTEMPS et al., 2016; PLATERO et al., 2016; ANDRUS et al., 2012; SIMON et al., 2011; GEHLOT et al., 2013). Embora não se saiba o centro de origem do gênero *Mimosa*, as evidências mostram que as espécies mais antigas são provenientes da América tropical (SIMON et al., 2011).

Neste cenário o Brasil é o país com o maior número de espécies de mimosas 358 (DUTRA; MORIM, 2015). Só no bioma Cerrado estima-se existir mais de 269 espécies, das quais muitas destes são endêmicas, e que evoluíram em terras altas do planalto central brasileiros e sob solos ácidos e pobre em nutriente (DUTRA; MORIM, 2015). Enquanto o Cerrado e a Caatinga foram os principais alvos de pesquisas relacionados a diversidade de mimosas e seus parceiros simbióticos, os outros biomas brasileiros foram pouco estudados e ainda não se conhece a real diversidade, podendo conter espécies de mimosas e rizóbios totalmente novas. A heterogeneidade de ecossistemas é fator evolutivo importante para o processo de especiação, pois as características intrínsecas de cada solo, bem como as fitofisionomias, relevo e clima, exercem pressões ambientais necessárias para a seleção e perpetuação das diferentes linhagens de organismo mais bem adaptadas as condições.

Os estudos mostram que mimosas brasileiras, sobretudo as do Cerrado e Caatinga, são noduladas majoritariamente por rizóbios do gênero *Paraburkholderia*, que pertencem a subclasse β -proteobacteria (DOS REIS JUNIOR et al., 2010; BONTEMPS et al., 2010). O gênero *Cupriavidus*, que também pertence a subclasse das β -proteobacteria, possui dois representantes nodulíferos com grande afinidade com mimosas, havendo relatos de ocorrência em várias partes do mundo (PLATERO et al., 2016; MISHRA et al., 2012; CHEN et al., 2003a; LIU et al., 2012). Recentemente, estirpes de *Cupriavidus* foram isoladas de *M. pudica* no Rio de Janeiro (DALL'AGNOL et al., 2017). Adicionalmente, Silva et al. (2012) evidenciaram que estirpes de *Cupriavidus necator* nativas do Brasil são capazes de nodular leguminosa como *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Leucena leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum* e *Phaseolus vulgaris*. Apesar disso a ecologia e a biogeografia deste simbionte no Brasil permanece uma questão a ser esclarecida.

Estudos mostram que *Cupriavidus* estão presentes na América do sul em países como o Guiana Francesa e Uruguai (MISHRA et al., 2012; PLATERO et al., 2016), sob diferentes características de solo, clima e mimosas hospedeiras. Estes resultados mostram que *Cupriavidus* é um simbionte de mimosas cosmopolita assim como *Paraburkholderia*, ressaltando ainda mais a necessidade de explorar a diversidade de rizóbios de mimosas em outros biomas do Brasil.

Com relação a rizóbios de mimosas da subclasse α -proteobacteria, os dados mostram que estes simbiontes não são expressivos na América do sul, e são encontrados eventualmente em nódulos de mimosas invasivas, como por exemplo, *Mimosa pudica* e *M. xanthocentra* (MISHRA et al., 2012; DOS REIS JUNIOR et al., 2010; BONTEMPS et al., 2010). Estes resultados se contrapõem, por exemplo, com os cenários encontrados no México e Índia, onde estes não só estão presentes como também são dominantes (BONTEMPS et al., 2016, GEHLOT et al., 2013). Segundo estes autores isso pode ter sido reflexo de um processo de co-evolução relativamente recente (10 M.a.), em que as características dos solos mais alcalinos, juntamente com os genótipos dos hospedeiros, favoreceram/selecionaram o estabelecimento desta simbiose. Diante disto, alguns questionamentos devem ser elucidados

para uma melhor compreensão da biogeografia e ecologia destes organismos, como: Qual a real diversidade de rizóbios de mimosas do Brasil? Qual sua relação com o ambiente e hospedeiro? E por fim, que ligação eles teriam com os simbioses de outros centros de diversidade de mimosas?

Portanto, este estudo procurou contribuir para um novo panorama de simbiote de mimosas no Brasil a partir de um estudo taxonômico de rizóbios em diferentes estados brasileiros dentro dos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica, e elucidar fatores associados a ocorrência dos grupos de rizóbios em cada um deles.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Amostragem e isolamento

Os nódulos foram coletados das raízes de 16 espécies de mimosas crescendo espontaneamente nos estados de Roraima (RR), Ceará (CE), Bahia (BA), Goiás (GO), Espírito Santo (ES), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), Paraná (PR) e Distrito Federal (DF) perfazendo um total 25 sítios de coletas dentro dos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Anexo A). Estes nódulos foram armazenados em recipientes contendo sílica-gel (máximo 30 dias) até o isolamento das bactérias.

Em cada localidade também foram coletadas amostras de solo na camada de 0-20 cm da região rizosférica das mimosas, procedendo o armazenamento em sacos plásticos e o transporte para a sede da Embrapa Agrobiologia, onde foram avaliados os atributos de pH e fertilidade do solo, segundo metodologia descrita em Embrapa (2011).

Os rizóbios foram isolados a partir de duas metodologias:

1) Isolamento de amostras coletadas *in situ*: Os nódulos obtidos diretamente de espécies de mimosas em campo (Figura 5) e em seguida foram submetidos às etapas de reidratação dos nódulos (1h em água destilada), desinfestação (5 min em hipoclorito de sódio 5%), maceração do nódulo sobre o meio de cultura YMA contendo indicador vermelho congo à 0,25% (FRED; WAKSMAN, 1928) e estriamento do extrato dos nódulos sobre a superfície do meio de cultura. As placas foram incubadas (B.O.D.; 10 dias; 28°C) e as colônias crescidas com aspecto esbranquiçado foram sucessivamente repicadas no meio YMA com indicador azul de bromotimol (5 mL L⁻¹ à 0,05%) até a sua purificação.



Figura 5. Sítios de coleta de nódulos de mimosas e solos em diferentes ambientes. A e B) *M. pudica* próximos a residências; C) *M. quadrivalvis* sobre áreas de pasto abandonado; D e E) *Mimosa* sp. dentro perímetro urbano de Boa Vista, RR; E) Nódulos de *Mimosa* sp.

2) Extração de rizóbios de solo: Amostras de solo de Lavras-MG e Seropédica-RJ, onde haviam evidências da ocorrência de estirpes de bactérias do gênero *Cupriavidus* nodulífero (SILVA et al., 2012; Euan K. James, *Comunicação pessoal*), foram utilizadas em um

experimento de “plantas iscas” (figura 6). Para isso, sementes de quatro leguminosas que tem afinidade tanto com Alfa-rizóbios quanto com Beta-rizóbios (*Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus vulgaris*, *Mimosa pudica* e *Sesbania virgata*) foram pré-germinadas em meio de cultura ágar-água (1%), e após três dias, foram plantadas em vasos de PVC preenchidos com vermiculita e solução nutritiva de Noris estéreis. As sementes de *M. pudica* e *S. virgata* foram inicialmente tratadas com ácido sulfúrico concentrado (10 min) para a quebra da dormência.

Posteriormente as plântulas foram inoculadas com 1 mL da suspensão de solo (5g de solo em 45 mL de destilada estéril) sobre as raízes e mantidos em câmara de propagação vegetal sob sistema de iluminação controlada (sistema Leds Tecnal ajustado para fotoperíodo de 12h de luz) e temperatura ambiente (28°C) durante 45 dias para formação dos nódulos. Os rizóbios foram isolados destes nódulos executando as mesmas etapas detalhadas na primeira metodologia. Para selecionar apenas os simbiossomas de mimosas. Todos estes rizóbios foram autenticados em *M. pudica* utilizando a metodologia descrita no item 3.2.3.



Figura 6. Experimento de “planta isca” aos 21 dias após inoculação (DAI). Os tratamentos indicados pelas numerações 2617, 2616 e 417 foram inoculados com suspensões de solos de Lavras-MG e Seropédica-RJ, respectivamente.

Ao final do isolamento e purificação, cada bactéria foi morfológicamente caracterizada em meio de cultura YMA_(bromotimol), considerando os seguintes atributos: tempo de crescimento, pH do meio de cultura, coloração da colônia, forma da colônia, perfil da colônia e produção de muco. Parte da massa celular de cada isolado foi utilizada para formação de uma suspensão em solução crioprotetora (água-glicerol 50%), que por sua vez foi transferida para microtubos de 2 ml e armazenados em freezer a -20°C e -80°C.

3.4.2. Seleção de bactérias representativas

Os isolados foram selecionados a partir das análises de agrupamento baseados em perfis de BOX-PCR. Para isso foi preparada uma suspensão bacteriana de cada isolado adicionando uma alçada da cultura pura em microtubo de 0,6 ml contendo 100 µl de água ultrapura estéril. Uma alíquota de 1 µl desta suspensão foi adicionada em cada reação de BOX-PCR contendo o primer BOX A1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'), reagentes de PCR (Anexo C) e amplificada procedendo as etapas de uma desnaturação inicial

(95°C por 5 min), seguida de 30 ciclos de amplificação (94°C por 1 min; 53°C por 1 min; 65°C por 8 min) e uma etapa de extensão final (65°C por 16 min).

Os perfis de BOX foram obtidos através de eletroforese ajustada para 300 min à 90 V em gel de agarose 2%. Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo por 10 seg, descorado em água destilada por 1 h e fotodocumentado em sistema com transluminador UV. Os perfis foram analisados utilizando a programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.7.1) adotando o coeficiente de Jaccard (JACCARD,1912) e algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, SNEATH; SOKAL, 1973). Alternativamente, para as bactérias as quais não foram possíveis a obtenção dos perfis de BOX-PCR (26% da coleção) utilizou-se os perfis baseados em atributos morfológicos como critério de agrupamento.

Para a análise de agrupamento por Box-PCR foi adotado o limite de similaridade de 70% para a separação dos grupos, os quais foram identificados com as siglas dos estados de origem e numerações sequenciais (ex. Grupo 1 do Rio de Janeiro = RJ-G1). De cada grupo foi selecionado pelo menos um isolado para ser autenticado em *M. pudica* e proceder a caracterização molecular.

3.4.3. Autenticação dos isolados em *Mimosa pudica*

Cada isolado selecionado foi submetido ao postulado de Koch para a confirmação da sua capacidade nodulífera, bem como para caracterização dos nódulos. Foram utilizadas *M. pudica* como planta hospedeira, por se trata-se de uma espécie de ampla distribuição no Brasil e ser capaz de nodular com alfa e beta-rizóbios (KLONOWSKA et al., 2012; MISHRA et al., 2012).

As sementes foram escarificadas (10 min em ácido sulfúrico concentrado) desinfestadas (30 seg em álcool 97,4%; 5 min em peróxidos de hidrogênio; sucessivas lavagens com água destilada estéril), pré-germinadas em placas de Petri contendo ágar-água 1% e incubadas em estufa B.O.D à 28°C por 48h. As plântulas, então, foram transplantadas para tubos de ensaio (200x30 mm) contendo vermiculita estéril (GEHLOT et al., 2013) e solução nutritiva de Noris (sem fontes de nitrogênio) ajustada para pH 6,8 (NORRIS e T'MANNETJE, 1964) (Figura 7). As plântulas foram inoculadas a partir das raízes adicionando 1 ml de cultura pura dos isolados selecionados e crescidos em meio YM por 72h. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado dentro de câmara de propagação vegetal e condições controladas (28°C e fotoperíodo de 16h de luz).

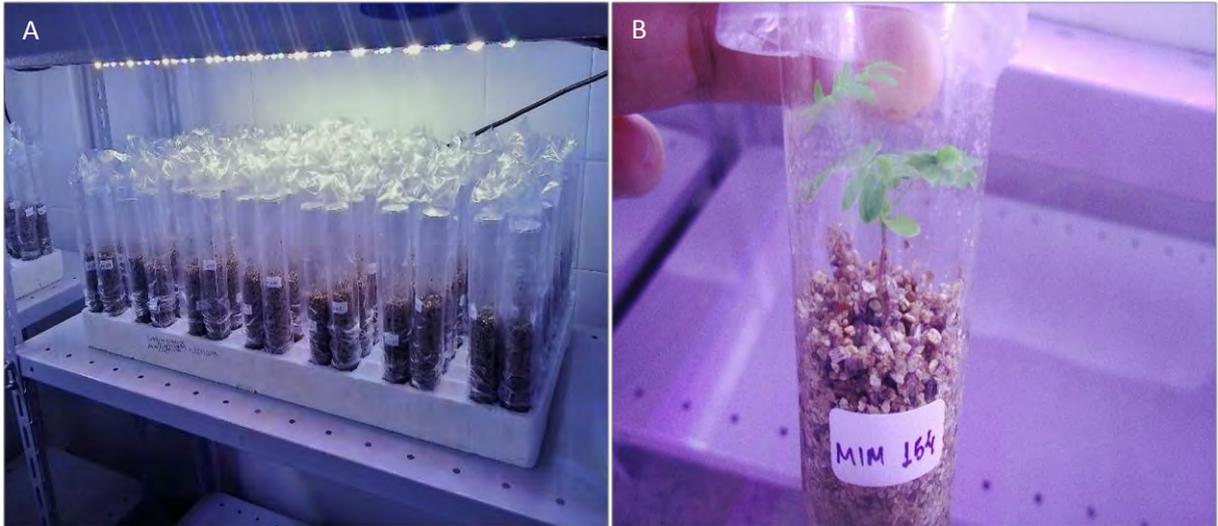


Figura 7. Experimento de autenticação dos isolados representativos dos grupos de Box-PCR e Matriz de similaridade. A) Sistema de cultivo com iluminação controlada; B) Sistema de cultivo em tubos contendo vermiculita e solução nutritiva estéril.

As plantas foram colhidas aos 45 DAI sendo agrupados em padrões de nodulação baseados no tamanho (Pequeno: < 2 mm; Médio: 2 – 4 mm; Grande: > 4 mm), coloração e atividade de Leg-hemoglobina (legHg).

3.4.4. Microscopia dos nódulos

Os nódulos obtidos na autenticação foram cortados longitudinalmente e preservados em frascos de penicilina, à vácuo, contendo solução de glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 50 mM) e mantidos a 4°C até o procedimento de encapsulamento em resina.

Para o preparo das cápsulas os nódulos foram retirados da solução com glutaraldeído e o excesso de reagente foi removido através de sucessivas imersões em tampão fosfato 0,25% por 15 min cada. As estruturas dos nódulos foram fixadas utilizando solução de tetróxido de ósmio por 1h, procedendo a remoção dos resíduos como descrito anteriormente. Em seguida, as amostras foram desidratadas a partir de uma série alcoólica (imersão em etanol por 15 min em cada graduação: 30%; 50%; 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%), transferidas para frascos contendo resina RL-White e incubadas em geladeira (4°C) por 7 dias. Por fim, os nódulos foram transferidos para cápsulas de gelatina preenchidas com resina RL-White e incubados em estufa à 60°C durante 12 h para a polimerização.

As cápsulas foram seccionadas com espessura semifina (1µm) utilizando um micrótomo. As secções foram fixadas nas lâminas de vidro através de aquecimento em placas térmicas e coradas com azul de toluidina 1% por 10 seg e outra coloração adicional com safranina por 10 seg (0,005% em água). Ao final de cada etapa os excessos de corantes foram gentilmente removidos aplicando água corrente sobre as lâminas, as quais foram secas em temperatura ambiente. As amostras foram observadas em microscópio óptico sobre as objetivas de 10 e 40x no The James Hutton Institute (Dundee, Escócia).

3.4.5. Caracterização molecular

Os isolados selecionados foram cultivados em tubos Falcon estéreis contendo 10 ml de meio YM por 48h e centrifugados para a obtenção do pellet de células. O sobrenadante foi

drenado utilizando uma pipeta estéril e as células foram ressuspendidas em 2 ml de água ultrapura para a extração do DNA. Para os procedimentos de extração de DNA foram utilizados os reagentes do kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante, e utilizando a enzima RNase proteinase K. Todos os genes foram amplificados através de PCR utilizando o pacote de reagentes GOtaq polimerase (Promega®), seguindo as reações e condições de amplificação listados em anexo C.

Os genes 16S *rRNA*, *recA*, *nodC* e *nifH* foram amplificados usando os pares de primers e condições descritas em anexo C. A qualidade e quantidade dos fragmentos amplificados foram verificadas através de eletroforese (1h a 90 V) aplicando 1 µl do produto de PCR em gel de agarose 1% e comparado com marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®). Todos os géis de agarose foram corados e fotodocumentados de acordo com a metodologia descrita para o Box-PCR.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando QIAquick PCR Purification Kit e sequenciados em sequenciador 3730xl (Applied Biosystems™) usando os mesmos pares primers utilizados para a amplificação. As sequências foram editadas no programa Bionumeric (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.7.1) e comparadas com outras sequências através da ferramenta BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov) para obtenção da identidade dos isolados.

A reconstrução filogenética foi realizada a partir do alinhamento múltiplo das sequências utilizando a ferramenta ClustalW do programa MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2016) e as árvores filogenéticas foram construídas pelo método estatístico Maximum Likelihood com cálculo de distância pelo modelo Jukes-Cator (JUKES; CATOR, 1969) com 1000 repetições.

3.4.6. Biodistribuição dos simbiontes de mimosas

A biogeografia dos isolados foi estimada com base nas identidades das sequências do gene 16S *rRNA* de cada isolado representante e extrapolada para os demais membros dos grupos, de acordo com as equações abaixo:

Equação 1. Proporção dos gêneros de rizóbios em cada estado.

$$\frac{\sum(\text{isolados representados pelos rizóbios selecionados de cada gênero})}{\text{Total de rizóbios}} * 100$$

Equação 2. Representatividade da coleção de cada Estado

$$\frac{\sum(\text{isolados nos grupos de Rhizobium, Paraburkholderia e Cupriavidus})}{\text{Total de isolados de cada estado}} * 100$$

Os resultados da distribuição dos simbiontes foram plotados em gráficos no mapa de biomas do Brasil elaborado a partir do programa livre Quantum Gis (v. 2.18) utilizando a base de dados do IBGE.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Distribuição das plantas hospedeiras e características de fertilidade do solo

O estudo foi baseado em simbiontes de dezoito espécies de mimosas nativas do Brasil, incluindo espécies amplamente disseminadas e invasivas como *M. pudica*, *M. caesalpiniiifolia*, *M. tenuiflora* e *M. quadrivalvis*, e espécies endêmicas do bioma Cerrado (Tabela 4).

A espécie *M. pudica* foi a principal planta hospedeira no Brasil, sendo encontrada em todos dos Estados brasileiros, exceto em Goiás. Neste estudo grande parte das amostras foram coletadas de *M. pudica* crescendo espontaneamente em encostas de rodovias, solos antropizados dentro de perímetros urbanos e áreas de pasto. Portanto, embora *M. pudica* seja uma espécie nativa do Brasil, a expansão das populações pode ter sido favorecida pelas ações humanas sobre estes ambientes.

A ocorrência de algumas espécies como *M. pudica*, *M. pigra* e *M. diplotricha* são frequentemente relacionados aos seus comportamentos invasivos causando problemas, seja voltado ao distúrbio à biodiversidade ou às atividades do homem. A espécie *M. diplotricha* (sinom. *M. invisia*) é considerado pela FAO uma das mais expressivas ervas daninhas de distribuição global, sendo encontrada Ásia (Índia, Sri Lanka, Indonésia, Tailândia Taiwan, Vietnã, Malásia, Filipinas, Cambódia e China) África (Nigéria, Etiópia, Malauí, Gana e Guiné) e várias ilhas do pacífico incluindo Austrália e Papua Nova Guiné (EKHATOR et al., 2013).

Sua capacidade de disseminação, em parte se explica pela sua versatilidade fisiológica associado às condições edafoclimáticas encontradas no Brasil. A temperatura mais elevada das regiões equatoriais-tropicais e a regimes de chuvas com média anual acima de 1500mm propiciam condições para elevada taxa de germinação das sementes e um rápido desenvolvimento vegetal, dando-lhes vantagens para dominação dos diversos ambientes. Além disso, a produção e propagação de sementes é extremamente eficiente. De acordo com Ekhaton et al. (2013) *M. diplotricha* pode lançar ao solo em média 10.000 sementes por ano, que podem ser facilmente transportadas a partir de rajadas vento ou agarradas em animais. O comportamento de *M. pudica* é tão agressivo quanto o de *M. diplotricha*, e por diversas ocasiões podem formar extensos campos colonizados unicamente por *M. pudica*. De fato, este cenário foi constatado ao longo das coletas no estado de Roraima (*dados não apresentados*), seja nas áreas urbanas ou semiurbanas.

Adicionalmente, a fisiologia versátil dessas plantas permite a sobrevivência a inúmeras condições adversas, tais como a elevada acidez e elementos fitotóxicos (Al^{+3}). De acordo com Souza Filho et al. (2001), os fatores de alumínio do solo, pH, cálcio e magnésio não influenciam sobre a germinação das sementes. Os mesmos autores complementam que as sementes de *M. pudica* apresentam crescimento satisfatório em temperaturas acima de 30°C. Considerando estes fatos, *M. pudica* pode facilmente se expandir no território brasileiro, bem como em diversas regiões tropicais.

Grande parte da ocorrência de mimosas invasivas em locais não-nativos está relacionado a introduções recentes, sejam elas intencionais ou não, como relatado na Nova Caledônia por Klonowska et al. (2012). De todo modo, a capacidade de se desenvolver e, muitas vezes, dominar ambientes exóticos sem dúvida tem a contribuição da FBN, garantindo parte do suprimento de N, sobretudo em ambientes onde este elemento se encontra escasso. Interessantemente, estudos mostram que algumas populações de rizóbios associados a estas mimosas ao redor do mundo apresentam pouca variabilidade genética em relação aos

encontrados no continente americano, sugerindo uma disseminação recente, tanto de planta quanto das bactérias (KLONOWSKA et al., 2012; CHEN et al., 2005b).

Tabela 4. Ocorrência de mimosas hospedeiras nos diferentes estados brasileiros. (+) Espécie encontrada nos sítios de coleta.

Estados Brasileiros	Bioma	pH do Solo	Mimosas Hospedeiras †																	
			M. pud	M. cae	M. ten	M. qua	M. cer	M. pol	M. can	M. vel	M. gra	M. equi	M. pyr	M. macr	M. som	M. esp	M. rad	M. dip	M. set	M. sp
Roraima	Amazônia	4,9 - 5,7	+																	+
Ceará	Caatinga	5,3	+	+	+	+														+
Bahia	Mata Atlântica	5,8	+		+		+	+												+
Espírito Santo	Mata Atlântica	6,0 - 6,6	+						+											+
Rio de Janeiro	Mata Atlântica	4,8 - 6,8	+			+				+										+
Minas Gerais	Mata Atlântica	5,6	+																	
São Paulo	Mata Atlântica	6,5 - 7,7	+																	
Goiás	Cerrado	5,5									+	+	+	+	+	+	+			
Distrito Federal	Cerrado	4,8 - 7,6	+	+															+	+
Paraná	Mata Atlântica	ND ‡	+																	

† *M. pudica* (M.pud); *M. caesalpinifolia* (M.cae); *M. tenuiflora* (M.ten); *M. quadrivalvis* (M.qua); *M. ceratonia* (M.cer); *M. polydactyla* (M.pol); *M. candolei* (M.can); *M. vellosiana* (M.vel); *M. gracillis* (M.gra); *M. equinocaula* (M.equi); *M. pyrynea* (M.pyr); *M. macrocephala* (M.mac); *M. somnians* (M.som); *M. speciosissima* (M.esp); *M. diplotricha* (M.dip); *M. setosa* (M.set); *Mimosa sp.* (M.sp).

‡ pH não determinada (ND).

Neste estudo também foram encontradas outras espécies de comportamento invasivos como *M. quadrivalvis*, *M. candolei*, e *M. diplotricha*, no entanto, estas se concentraram principalmente nos estados do CE, RJ, BA e DF (Tabela 4). Além dessas espécies invasivas foram encontradas espécies de comportamento endêmico como *M. gracillis*, *M. polydactyla*, *M. gracilis*, *M. echinocaula*, *M. pyrynea*, *M. macrocephala*, *M. somnians*, *M. speciosissima* e *M. radula*, sendo estas restritas às áreas nativas de terras altas (acima de 1000m) do bioma Cerrado. A ocorrência de espécies endêmicas nesta região já se constitui um fato consolidado sendo reportados por diversos autores (SIMON; PROENÇA, 2000; BONTEMPS et al., 2010; DUTRA; MORIM, 2015). De acordo com Simon e Proença (2000), mais de um quarto das espécies mimosas de terras altas deste bioma são endêmicas, sendo um dos maiores centros de diversidade de mimosas do mundo.

Com relação a propriedade química dos solos verificou-se que 14 das 21 amostras coletadas apresentaram pH ácidos, ficando abaixo de 5,8 unidades (anexo A). Estes solos foram provenientes dos biomas Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica e do Cerrado. O pH nesta faixa é bastante comum no Brasil, considerando os fatores de formação do solo, onde pode ser destacado o material de origem, geralmente de natureza de rochas graníticas e gnáises, bem como o clima tropical, que contribui para uma intensa intemperização do solo e lixiviação das bases. De acordo com os dados de Rosolem (1990) *apud* Fageria e Stone (1999) 64,3% dos solos brasileiros são ácidos, consistindo as regiões norte e centro oeste àquelas com as maiores proporções (74%), seguidas pelo sudeste (63%), sul (57%) e nordeste (41%).

Nas demais amostras foram encontrados solos com pH entre 6 e 7,7. Surpreendentemente, dois destes sítios corresponderam as amostras coletadas no planalto central brasileiro, cujo pH é naturalmente ácido (ROSOLEM, 1990). Contudo, estes resultados certamente foram ocasionados pelas alterações das características naturais dos ambientes, tais como atividades de calagem e introdução de material exógeno, considerando que se tratam de áreas de jardins da unidade da Embrapa Cerrados. O pH também se apresentou mais elevado nos solos coletados nos municípios de Bananal-SP, Seropédica-RJ e Itapemirim-ES, cujo as amostras foram de obtidas a partir de ambientes urbanos ou de encostas de rodovias.

O fato de ter sido encontradas mimosas ocupando vastas áreas com grande amplitude de pH não é surpreendente, na verdade, isto ratifica os resultados observados por Nuruddin e Chang (1999) e Souza Filho et al. (2001) que demonstraram que mimosas possuem fisiologias adaptadas a diferentes condições de pH, podendo apresentar elevadas taxas de germinação de sementes e sobrevivência mesmo em pH tão baixos quanto 4,7. Neste estudo os menores valores de pH foram registrados em amostras coletadas na encosta de rodovia no município de Casemiro de Abreu-RJ (pH = 4,88), em uma área desmatada de Paranaguá-PR (pH = 4,90), um sítio localizado próximo a um lago da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (pH = 4,90) e em um terreno baldio do município de Boa Vista-RR (pH = 4,96). Embora este pH represente um fator limitante para muitas leguminosas, nenhuma amostra vegetal apresentou sinais de deficiência nutricional, pelo contrário, as plantas possuíam partes aéreas bastante vigorosas e raízes com quantidade razoável de nódulos (*dados não apresentados*).

Sob o ponto de vista da microbiota, o pH pode interferir na estrutura das populações naturalmente estabelecidas, bem como nas interações entre microrganismos e seus parceiros simbióticos (FERNANDES JUNIOR; REIS et al., 2008). Nos estudos que abordam a diversidade de rizóbios de mimosas, o pH é sugerido como um dos principais moduladores da simbiose, favorecendo ou limitando a colonização dos rizóbios (BONTEMPS et al., 2016; MISHRA et al., 2012; DE CASTRO PIRES et al., 2018). Embora os estudos não mostrem uma correlação direta sobre a colonização por diferentes grupos de simbiotes, é possível observar tendências, onde, nos solos mais ácidos há um predomínio de estirpes de *Paraburkholderia* (MISHRA et al., 2012; MOULIN et al., 2001; BONTEMPS et al., 2010; DOS REIS JUNIOR et al., 2010), enquanto que *Cupriavidus* são mais comumente encontrados em solos de pH alcalino (LIU et al., 2012; KLONOWSKA et al., 2012; MISHRA et al., 2012). No México e Índia, onde espécies de *Rhizobium* e *Ensifer* predominaram, os solos se mostraram neutro-alcalinos ou alcalinos (BONTEMPS et al., 2016; GEHLOT et al., 2013), demonstrando que este grupo de rizóbios também são favorecidos em solos de pH mais próximo da neutralidade. Os resultados desta pesquisa parecem suportar esta tendência, havendo um predomínio de isolados do gênero *Paraburkholderia* na faixa de pH 4,8 - 5,8, enquanto que em um solo neutro-alcalino antropizado (pH = 6,6 - 7,7) do Distrito Federal observou-se uma maior ocupação dos nódulos por estirpes de *Rhizobium* (figura 17 e anexo B).

Nesta pesquisa também foram encontrados isolados de *Cupriavidus* nodulando espontaneamente mimosas no Brasil. Este isolados foram provenientes de solos de pH levemente ácido ou neutro-alcalinos, dos estados do ES, RJ e SP, semelhantes as condições observadas por Mishra et al. (2012) na Guiana Francesa. Contudo, estirpes de *C. taiwanensis* também foram encontrados em nódulos de *M. pudicas* e *M. tenuiflora* ao norte da Amazônia (Roraima) e na Caatinga (Ceará) onde o pH dos solos foram 5,7 e 5,5, respectivamente. Este resultado é semelhante àqueles reportados por Platero et al. (2016) que constataram que o gênero *Cupriavidus* é dominante de mimosas nativas do Uruguai, mesmo estando condicionados a solos de caráter ácido. Todos estes resultados indicam que a variável pH do

solo pode ter uma influência na colonização de mimosas por diferentes grupos de rizóbios. Entretanto, deve-se considerar outros eventos/fatores que ocorrem concomitantemente com a variação do pH.

Um dos fatores edáficos importantes na dinâmica da simbiose é a presença de Al trocável (Al^{+3}), o qual constitui um dos elementos mais marcante nos solos tropicais. Quando sua concentração atinge níveis elevados, as plantas tendem a apresentar sintomas de deficiência nutricional e da capacidade de absorção hídrica, uma vez que a anatomia radicular é alterada apresentando atrofia no eixo radicular principal e espessamento das raízes laterais. No caso das leguminosas, a presença de altas concentrações de Al^{3+} no solo pode resultar na atrofia das raízes prejudicando fortemente a simbiose, seja pela drástica redução de sítios de infecção, ou pela adoção de estratégias de sobrevivência, incluindo a regulação negativa da nodulação. De acordo com Wang et al. (2006) o estresse pelas concentrações elevadas de Al induz liberação vários compostos de natureza ácida orgânica. Adicionalmente Xue et al. (2008) mostrou o Jasmonato é um composto que pode interagir na sinalização da atividade da peroxidase da parede celular e na síntese de lignina nas raízes expostas ao Al^{3+} . Neste sentido a alteração do JA pode afetar a sensibilidade das plantas ao processo de infecção dos rizóbios (SUN et al, 2006).

Assim como para a maioria das plantas, o Al^{+3} tem efeito negativo para muitos microrganismos, incluindo rizóbios. Segundo Fernandes Junior e Reis (2008), o Al^{+3} interfere nos momentos iniciais da nodulação na etapa de comunicação entre os parceiros simbióticos, o que de uma forma geral interfere na síntese fatores de nodulação (SANTOS; REIS, 2008), além de provocar alterações morfológicas e na biossíntese de componentes extracelulares, como por exemplo na produção de EPS, que são reconhecidos nos estágios de pré-infecção por receptores radiculares (BROUGHTON et al., 2003; LOPEZ-LARA et al., 1993; PERRET et al., 2000). Neste estudo, os índices de Al^{+3} mais acentuado foi observado das amostras do Paraná não ultrapassando $0,60 \text{ cmol}_c.\text{dm}^3$ (Tabela em anexo A).

Um outro fator relevante em se tratando da simbiose de leguminosas e rizóbios é a biodisponibilidade de nutrientes, os quais são necessários para a realização das atividades vitais de ambos os organismos. Uma das principais fontes provedora de nutrientes no solo é a matéria orgânica (MO), que entre outros elementos também fornece o nitrogênio, principalmente, nas formas de aminoácidos, peptídeos e proteínas. Neste sentido o conteúdo de MO pode influenciar tanto no processo de nodulação quanto na ocupação dos nódulos por diferentes rizóbios. De acordo com os experimentos conduzidos por Elliott et al. (2007) a competitividade entre os grupos de rizóbios de mimosa podem ser alteradas na presença de quantidade e fonte de N. Ao co-inocularem mudas de *M. pudica* com PAS44^T (*P. mimosarum*) e LMG 19424^T (*C. taiwanensis*), os autores observaram que em condições que simulavam solos de baixa fertilidade, as *Paraburkholderia* são dominantes, e à medida que o nitrogênio torna-se mais presente no sistema, *Cupriavidus* aumenta sua capacidade competitiva. O teor de carbono orgânico total (COT), não foi avaliado em todos sítios de coleta, impossibilitando assim, uma análise de correlação mais robusta deste atributo com a distribuição dos rizóbios encontrados em diferentes regiões. Apesar disso foi observado que os sítios contendo valores de COT acima de 2,5% (CE, DF) proporcionou uma maior ocupação dos nódulos gêneros *Cupriavidus* e *Rhizobium*.

3.5.2. Simbiontes de mimosas do Brasil

O estudo totalizou 724 isolados dos quais aproximadamente um terço foram provenientes de ambientes costeiros, florestais e urbanos do estado do Rio de Janeiro. Os estados de MG, BA, ES, SP e PR, que também estão sob influência do bioma Mata Atlântica,

tiveram menos nódulos viáveis para o isolamento, o que resultou em coleções com poucos representantes (Tabela 5). Contudo os dados mostraram ser representativos, com exceção da coleção de SP e ES, onde foram obtidas menos de 16 isolados. Apesar da baixa representatividade, os estados do ES e SP apresentaram indícios de conter uma grande diversidade de rizóbios de mimosas havendo isolados do gênero *Paraburkholderia* e *Cupriavidus*. Assim, fica evidente a necessidade de se realizar novas pesquisas mais abrangentes para compreender melhor a estrutura e a dinâmica dos rizóbios de mimosas na Mata Atlântica.

Tabela 5. Distribuição bactérias isoladas de mimosas nos diferentes estados brasileiros.

Estados Brasileiros	Distribuição dos isolados	
	Número de isolados	Proporção relativa (%)
Roraima	36	4,97
Ceará	77	10,64
Bahia	58	8,01
Espírito Santo	16	2,21
Rio de Janeiro	221	30,52
Minas Gerais	87	12,02
São Paulo	3	0,41
Goiás	52	7,18
Distrito Federal	128	17,68
Paraná	46	6,35
Total	724	100,00

De um modo geral, a Mata Atlântica mostrou ser um bioma bastante diverso, incluindo rizóbios das subclasses alfa e beta-proteobacteria. Com base nos resultados de sequenciamento do gene 16S rRNA foram identificados isolados dos gêneros *Rhizobium*, *Paraburkholderia* e *Cupriavidus*. Supreendentemente a existência de rizóbios pertencentes ao gênero *Cupriavidus* no Brasil não mostrou ser um fato isolado, ao invés disso, estes simbiontes foram detectados em quatro dos seis estados analisados dentro do bioma Mata Atlântica. Outros isolados do gênero *Cupriavidus* também foram obtidos a partir de amostras originárias das regiões norte e nordeste do Brasil nos estados de Roraima e Ceará. A presença de *Cupriavidus* nodulando mimosas no Brasil só havia sido demonstrada por Silva et al. (2012) que isolaram estirpes de *Cupriavidus necator* de leguminosas crescidas em condições de viveiro no estado de Minas Gerais. Mais recentemente Dall’Agnol et al. (2017) obtiveram o isolamento de *Cupriavidus* em amostras de nódulos de *M. pudica* do bioma Mata Atlântica, no estado do Rio de Janeiro. Assim estes resultados não só confirma a presença destes simbiontes no Brasil, como também dimensiona a sua distribuição em vários biomas, principalmente na Mata atlântica.

A ocorrência de *Cupriavidus* simbióticos no continente Sul-americano foi registrada pela primeira há seis anos por Mishra et al. (2012), deste de então alguns trabalhos pontuais vem contribuindo para o entendimento da distribuição destes simbiontes. Mais recentemente Platero et al. (2016) relatou uma situação de completa dominância de estirpes de *C. necator*, *C. taiwanensis* e, possivelmente, *C. pinatubonensis* em nódulos de cinco mimosas nativas do Uruguai. Este isolados formaram um grupo monofilético de simbiontes, o que para os autores é condizente com a existência de um importante centro de diversidade do gênero. Interessantemente, a constituição genética de *C. necator* Uruguai e do Brasil são muito semelhantes, podendo haver uma ligação entre as populações nessas duas localizações. Por

outro lado, quando comparado com outros indivíduos do Guiana Francesa e do caribe, verifica-se uma maior divergência genética, o que pode ser explicado por uma possível dispersão das populações ao longo das américas e a instauração de processo de especiação. Neste cenário a Mata Atlântica parece deter um importante papel de interligar diferentes centros de diversidade de *Cupriavidus* na América do Sul, uma vez que a ocorrência destes simbiontes neste bioma tem sido cada vez mais frequente. Já a ocorrência de *Cupriavidus* em outras partes do mundo parece ser fruto uma introdução recente. Nas Filipinas, por exemplo, as constituições genéticas são muito similares às estirpes americanas, não passando de 0,6% de diferença de nucleotídeos nas sequências de genes conservados (ANDRUS et al., 2012).

O bioma Caatinga foi representado por 77 isolados de *M. pudica* e *M. tenuiflora* obtidos dentro do perímetro urbano da cidade de Fortaleza (Campus da UFC e região costeira) e na região semiárida, no município de Pentecoste- CE na fazenda experimental Vale do Curú da Universidade federal do Ceará. Assim como os resultados obtidos no bioma Mata Atlântica foram isolados alfa e beta-rizóbios, incluindo isolados pertencentes a espécie de *Cupriavidus taiwanensis*. Este foi o primeiro registro destes simbiontes dentro do bioma Caatinga, e curiosamente, estes foram relacionados a espécie *M. tenuiflora*. De acordo com os dados de Queiroz et al., (2009) *M. tenuiflora* é uma leguminosa arbórea de ampla distribuição, ocorrendo desde o México até o Brasil, onde são associadas às regiões secas do Nordeste. Estima-se que esta leguminosa contribua significativamente para a adição de N no sistema, na ordem de 130 kg.ha.ano (FREITAS et al., 2010). Apesar disso, pouco se sabe sobre os simbiontes associados a elas. Mais recentemente, Freitas et al. (2014) isolaram 62 bactérias de nódulos de *M. tenuiflora* da Caatinga, onde verificaram uma predominância de bactérias com características fenotípicas correlacionadas ao gênero *Paraburkholderia* ou *Rhizobium* (crescimento rápido e exibindo reação ácida). Anteriormente, dos Reis Junior et al. (2010) e Bontemps et al. (2010) haviam averiguado a ampla ocorrência do gênero *Paraburkholderia* em mimosas da Caatinga.

Por outro lado, a diversidade de rizóbios de mimosas na Amazônia brasileira é completamente desconhecida, embora represente um dos maiores centros de diversidade do mundo, existem poucos trabalhos relacionados a simbiose Mimoso-rizóbio. Neste estudo, 36 isolados foram obtidos de *M. pudica* e *Mimosa* sp. do Estado de Roraima, nos municípios de Caracará e Boa Vista, ambos situados dentro da ecorregião das savanas roraimenses, cujo as características edafoclimáticas e fitofisionomia se assemelham bastante às encontradas no Cerrado central do Brasil (BARBOSA et al. 2007). Estes simbiontes foram pertencentes aos gêneros *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* e *Rhizobium*, semelhante aos resultados encontrados no país vizinho, a Guiana Francesa (MISHRA et al., 2012). Neste estudo *Paraburkholderia* foi o simbionte predominante de *M. pudica* em solos ácidos, mas também foram constatados a ocorrência de *Cupriavidus* e *Rhizobium* em solos alcalinos (MISHRA et al., 2012). De fato esta estrutura de ocupação dos nódulos de mimosa da América do Sul, principalmente de *M. pudica*, parece seguir um padrão, onde as espécies de *Paraburkholderia* são naturalmente dominantes, enquanto que *Cupriavidus* e *Rhizobium* são dependentes de uma condição mais específica (genótipo do hospedeiro, condições edáficas e competitividade das estirpes).

A coleção dos isolados do bioma Cerrado foi composta 180 bactérias, sendo 52 provenientes de áreas nativas de Pirenópolis-GO e 128 em Brasília-DF. O Cerrado foi o único bioma em que *Cupriavidus* esteve ausente, mesmo quando o pH era “favorável” (pH neutro-alcalino em Brasília) para a ocorrência destes simbiontes. Nos sítios de coleta em Pirenópolis foram isolados somente representantes do gênero *Paraburkholderia*. A dominância destes simbiontes no Cerrado nativo foi amplamente evidenciado no estudo de Bontemps et al. (2010). Contudo, em Brasília, onde as condições do solo foram atípicas (pH neutro alcalino), a dominância foi claramente alterada para *Rhizobium*. Este resultado levanta evidências de

que *Rhizobium* simbiotes de mimosas estão presentes no bioma Cerrado, mas que em condições naturais estes simbiotes são suprimidos ou são menos competitivos em relação às *Paraburkholderia*.

Em se tratando de competitividade entre simbiotes de mimosas é preciso ressaltar o papel da variabilidade genética dos hospedeiros como um fator importante processo de seleção dos parceiros simbióticos (MELKONIAN et al., 2014). Ao emitirem suas raízes no solo, as mimosas entram em contato com vários rizóbios em potencial para desenvolvimento da nodulação. O que faz com que um determinado grupo se sobressaia sobre os demais? Esta é uma questão complexa, que envolvem vários eventos simultâneos e condições ambientais específicas ainda pouco esclarecidas. Melkonian et al. (2014), desenvolveram ensaios de competição em que diferentes estirpes de *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* foram co-inoculadas com uma estirpe de *P. phymatum* marcada com GFP para avaliar as taxas de ocupação dos nódulos em diferentes variedades de *M. pudica* de diferentes origens (1. var. *hispida/unijuga* - Sementes comerciais; 2. var. *tetrandra* - Guiana Francesa; 3. var. não identificada - Guiana Francesa; 4. var. *unijuga* - Taiwan). Os resultados mostraram que independente das variedades testadas, *Paraburkholderia* foi o gênero mais competitivo. Entretanto, para a variedade *unijuga* não foram observadas diferenças significativas de competitividade entre as estirpes de *Paraburkholderia* e *Cupriavidus*, demonstrando diferentes afinidades de hospedeiros pelas espécies de simbiotes.

Embora as espécies sejam as menores unidades taxonômicas, não se pode avaliar todos indivíduos a elas pertencentes com iguais. Na verdade, como o processo evolutivo é contínuo, dentro de uma espécie estão presentes vários organismos com pequenas variações decorrente do processo de seleção natural em condição específica do ambiente. Neste sentido uma espécie de rizóbio pode apresentar diferentes comportamentos diante de uma leguminosa nodulífera. Portanto, além da importância do genótipo das mimosas hospedeiras, como discutido anteriormente, a competitividade intrínseca de cada estirpe é um outro fator crucial na dominância da nodulação. Melkonian et al. (2014) avaliaram a competitividade de diferentes estirpes de simbiotes contra *P. phymatum* (STM 815 - GFP) para uma única variedade de mimosa. Os resultados foram apresentados em forma de ranking, onde nas primeiras posições ficaram as estirpes das espécies *P. phymatum*, seguido pelas estirpes de *P. tuberum* e *P. mimosarum*, que apresentaram uma maior irregularidade da nodulação, ou seja, estirpes com acentuada ocupação dos nódulos e outras com ocupação pouco expressiva. Os resultados das estirpes de *Cupriavidus* não foram muito diferentes em comparação as estirpes de *P. mimosarum*, enquanto que as estirpes de diferentes espécies de *Rhizobium* foram as que exibiram os piores resultados de nodulação.

Com relação aos atributos fenotípicos em meio de cultura, verificou-se que todos os isolados apresentaram crescimento rápido, com desenvolvimentos variando entre 2 e 3 dias após repicagem em meio de cultura YMA. Estes resultados estão coerentes com os perfis dos principais simbiotes encontrados no Brasil e outros centros de diversidade de *Mimosa* no mundo (DOS REIS JUNIOR et al., 2010; MARTINS et al., 2015; BONTEMPS et al., 2016).

Apenas os isolados MIM 501 e MIM 484 coletados em Minas Gerais apresentaram crescimento lento ou intermediário. Estes isolados foram originalmente obtidos a partir de nódulos de “planta isca”, *Vigna unguiculata* e *Sesbania virgata* e foram identificadas como *Bradyrhizobium elkanii* e *Azorhizobium doebereineriae*, respectivamente. Estes isolados foram posteriormente autenticados em *M. pudica* apresentando nódulos aos 45 DAI. Contudo, embora tenham sido realizadas diversas purificações em placa é possível a existência de culturas mistas com outros simbiotes de mimosa. Embora algumas mimosas possam ser noduladas por alfa-rizóbios (BONTEMPS et al., 2016; GEHLOT et al., 2013), a presença deste simbiotes ocupando nódulos de mimosa nunca havia sido registrada.

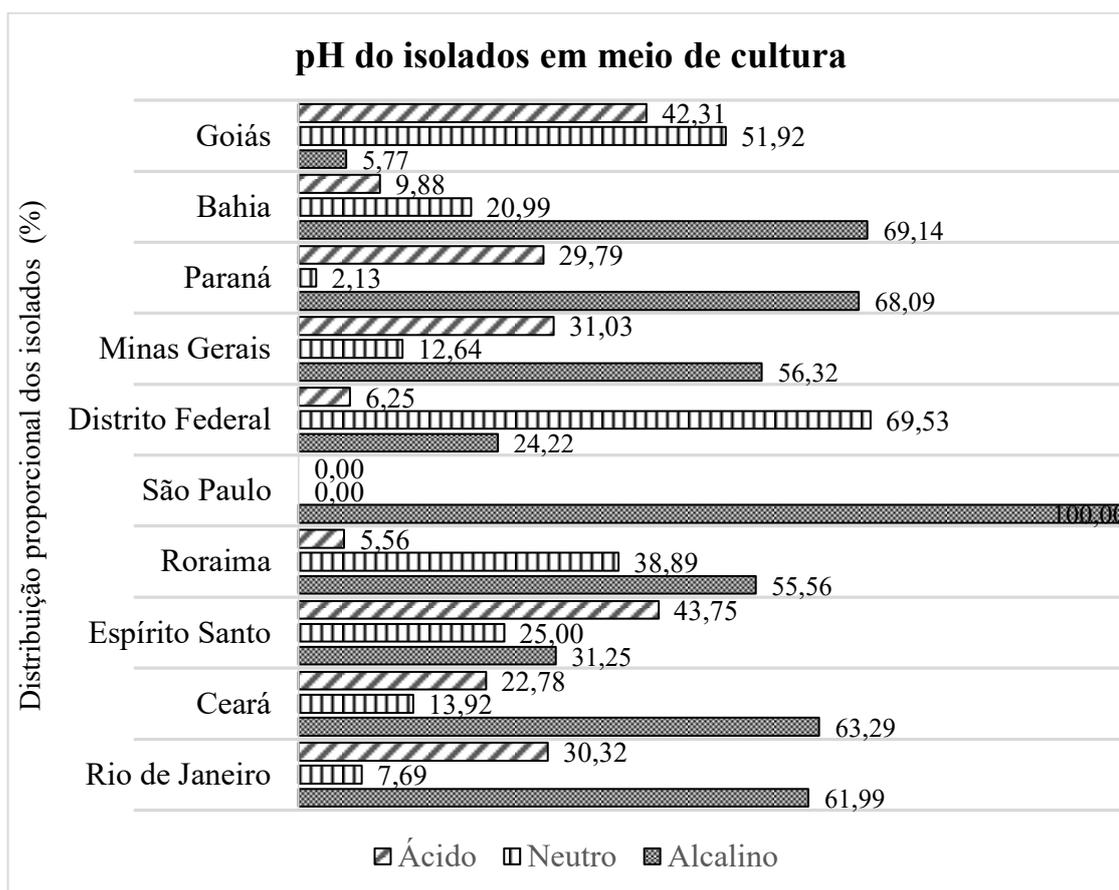


Figura 8. Distribuição das bactérias isoladas de espécies de mimosas no Brasil segundo a capacidade de alteração de pH do meio de cultura YMA. Barras com listras diagonais (pH ácido); Barras com listras verticais (pH neutro); Barras preenchidas em preto (pH alcalino).

De modo geral, as bactérias que produziram reação alcalina foram predominantes, representando 53% da coleção, enquanto que 23% e 24% produziram reação ácida e neutra, respectivamente. O gênero *Rhizobium* é frequentemente correlacionado com reação ácida ou neutra, enquanto que *Cupriavidus* spp. promovem uma forte alcalinização do meio de cultura (SILVA et al., 2012). Já as espécies de *Paraburkholderia* apresentam uma grande amplitude de crescimento em diferentes pH, apresentando tanto reação de acidificação do meio de cultura quanto alcalinização. Resultados semelhantes também foram verificados entre Beta-rizóbios de *Mimosa caesalpinifolia* do Nordeste do Brasil, onde as espécies de *Paraburkholderia* predominaram (MARTINS et al., 2015).

O perfil de alcalinização do pH foi o mais frequente entre os isolados obtidos nos estados de RR, CE, ES, RJ, MG, SP e PR, com porcentagem variando entre 56 a 100% (figura 8). O estado de SP foi o único estado com 100% da isolados com reação de pH alcalina, sendo estes identificados como pertencentes aos gêneros *Cupriavidus* e *Paraburkholderia*. Vale ressaltar que a diversidade de rizóbios neste sítio de estudo não foi bem representado sendo este resultado derivado de apenas três isolados. Os demais estados continham entorno de 60% de bactérias com esta característica. De acordo com Hara e Oliveira (2005) a capacidade de alcalinizar o meio de cultura pode estar associada a mecanismos de resistência aos efeitos da acidez do solo, bem como a neutralização de elementos tóxicos, como por exemplo o Al^{3+} .

As bactérias que não alteraram o pH do meio (neutro) foram encontradas em maiores proporções no DF, GO e RR (figura 8), sendo estes associados a perfis morfológicos compatíveis com o gênero *Rhizobium*. Já as bactérias de que acidificaram o meio de cultura foram predominantes nos estados do ES e também em GO.

A partir de uma análise conjunta de todos os atributos morfológicos foi possível separar as bactérias em 23 perfis (Tabela 6), sendo que 82% destes isolados foram reunidos nos perfis 1 ao 21 junto com outras estirpes identificadas como nodulíferas. Cerca de 10% foram agrupadas com estirpes não nodulíferas e apresentaram colônias irregulares, pH geralmente ácido, e apenas 7,7% não foram contempladas com nenhum perfil apresentado nesta análise.

Bactérias identificadas como *Paraburkholderia* exibiam uma grande variedade de características fenotípicas, sendo agrupadas em 17 perfis morfológicos, dos quais os perfis de 1 ao 8 foram os mais representativos (tabela 6). Bactérias compreendidas dentro destes perfis compartilharam crescimento rápido, pH alcalino, perfil da colônia lentiforme (levemente elevado) e colônias circulares, sendo observada algumas poucas variações quanto a produção do muco e cor da colônia. Nota-se que para o atributo cor das colônias existe uma elevada carga de subjetividade, sendo assim, a coloração amarela, creme e branca poderiam ser interpretadas de diferentes maneiras, dependendo do autor da caracterização da coleção. Consequentemente, os resultando dos agrupamentos poderiam ser sujeitos a alterações, sendo formados novos grupos ou mesmo condensando aqueles grupos mais próximos.

Grupos de bactérias correlacionadas a estirpes de *Paraburkholderia* também exibiram perfis compostos por pH do meio neutro (Perfis 11 ao 12) e ácido (perfis 17 ao 18; 20 ao 21). Uma característica comum entre eles foi o fato de conter estirpes de *P. nodosa*. A versatilidade fisiológica de espécies do gênero *Paraburkholderia* é algo bastante conhecido, o que pode estar relacionado capacidade ocupar diferentes nichos ecológicos (VANDAMME et al., 2007).

Entre os perfis de bactérias alcalinizante, o perfil 9 correspondeu a quase 10% de toda coleção obtida, e se diferenciou por apresentar perfil das colônias com centro elevado e forma concêntrica (círculos com centro comum). Este perfil foi associado exclusivamente às estirpes de *Cupriavidus*. O fato destas bactérias apresentarem perfil morfológico característico é de grande relevância em termos metodológicos, uma vez que é possível realizar uma triagem dos simbiontes de forma muito mais rápida e menos onerosa. Apenas um isolado identificado como *Azorhizobium doebereineriae* apresentou característica semelhante a *Cupriavidus*, porém o tamanho das colônias foi menor e o tempo de crescimento foi superior 4 dias.

Outro perfil de destaque foi o 15 que reuniu 100 isolados, sendo o único composto pela característica de perfil de colônia convexo. Este perfil foi condizente com a maioria dos alfa-rizóbio, incluído *R. altiplani*, *R. mesoamericanum*, *R. multihospitium*, *Rhizobium* sp., mas também incluiu duas estirpes da espécie *P. sabiae*. Um dos principais componentes para a que as bactérias apresentem esta fisionomia é a produção abundante de EPS. Este constituinte extracelular exercer importantes papéis durante as primeiras etapas da nodulação, sendo responsáveis pela fixação dos rizóbio nas raízes, infecção do hospedeiro, formação dos cordões de infecção, desenvolvimento de bacteróides, bem como na resposta contra as defesas das plantas (BOMFETI et al., 2011). Além disso, o EPS também confere proteção contra os estresses ambientais como temperaturas elevadas e exposição a elementos tóxicos Al^{3+} e Mn^{2+} (BOMFETI et al., 2011). De acordo com os mesmos autores, em geral, as estirpes de rizóbios que produzem maiores quantidades de EPS são mais tolerantes a condições adversas quando comparadas com cepas que produzem menos.

Tabela 6. Principais perfis morfológicos dos isolados de mimosas do Brasil.

Morfogrupos	Características em meio YMA (bromatimol)													Número de isolados / (%)		Espécies relacionadas †			
	Crescimento Rápido	Crescimento Lento	pH Ácido	pH Neutro	pH Alcalino	Colônia Amarela	Colônia Creme	Colônia Branca	Perfil Lentiforme	Perfil Convexo	Perfil Centro elevado	Forma Circular	Forma Concêntrica				Forma Irregular	Muco Abundante	Muco moderado
Perfil 1	■				■		■		■		■				■			19 (2,6)	P.tub.; P.mim; P.phe
Perfil 2	■				■		■		■		■					■		22 (3,0)	P.tub; P.diaz.; P. mim
Perfil 3	■				■		■		■		■					■		94 (12,9)	P.mim; P.sab.
Perfil 4	■				■	■			■		■				■			7 (0,9)	P.diaz; P.phe
Perfil 5	■				■	■			■		■					■		46 (6,3)	P.tub
Perfil 6	■				■	■			■		■					■		25 (3,4)	P.mim; P.tub; P.diaz; P.phe
Perfil 7	■				■			■	■		■				■			2 (0,2)	P.tub
Perfil 8	■				■			■	■		■					■		45 (6,2)	P.tub; P.mim
Perfil 9	■				■		■			■		■				■		71 (9,8)	C.tai; C.nec
Perfil 10	■			■			■		■		■				■			2 (0,2)	P.tub
Perfil 11	■			■			■		■		■					■		17 (2,3)	P.tub; P.nod
Perfil 12	■			■			■		■		■					■		26 (3,5)	P.tub; P.nod
Perfil 13	■			■		■			■		■				■			1 (0,1)	R.pisi
Perfil 14	■			■		■			■		■					■		6 (0,8)	P.mim; P.diaz
Perfil 15	■			■		■			■	■	■				■			100 (13,8)	R.alt; R.mes; R.sp; P.sab; R.mult; P.sym
Perfil 16	■		■				■		■		■				■			18 (2,4)	-
Perfil 17	■		■				■		■		■					■		39 (5,3)	P.nod; P.phy
Perfil 18	■		■				■		■		■					■		19 (2,6)	P.nod; P.diaz
Perfil 19	■		■			■			■		■				■			13 (1,7)	-
Perfil 20	■		■			■			■		■					■		15 (2,0)	P.nod
Perfil 21	■		■			■			■		■					■		7 (0,9)	P.mim
Perfil 22		■																2 (0,2)	Brady. elk.; Azo. doeb.
Perfil 23														■				72 (9,9)	estirpes não-nodulíferas
Outros perfis																		56 (7,7)	
Total																		724 100,00	

† P.t = *P. tuberum*; P.d = *P. diazotrophica*; P.m = *P. mimosarum*; P.phe = *P. phenoliruptrix*; P.phy = *P. phymatum*; P.n = *P. nodosa*; P.s = *P. sabiae*; C.t = *C. taiwanensis*; C.n = *C. necator*; R.m = *R. mesoamericanum*; R.a = *R. altiplani* sp. nov; R.sp = *Rhizobium* sp; Brad. Elk = *Bradyrhizobium elkanii*; P.int = *Pseudacidovorax intermedium*; Azo.doeb = *Azorhizobium doebereinae*.

3.5.3. Agrupamento e seleção dos isolados

Mais de 78% (571 / 724 isolados) da coleção foi caracterizada a partir da técnica de Box-PCR, incluído todas bactérias dos estados do RJ, CE, ES, RR, SP, DF e MG. A análise de agrupamento dos perfis de *fingerprinting* de cada estado foi analisado individualmente, de modo a expressar a diversidade e a estrutura das populações de simbiontes de mimosa locais.

O Rio de Janeiro foi o estado que obteve o maior número de grupos formados com 46, seguido pelo Ceará e Minas Gerais, com 20 e 18 grupos, respectivamente. Os isolados do Distrito Federal, Espírito Santo e Roraima formaram 17, 10 e 8 grupos, respectivamente. Enquanto, que em São Paulo foram obtidos apenas dois grupos.

Segundo Menna et al (2009), e Binde et al. (2009) o BOX-PCR é uma ferramenta particularmente útil para a discriminação de indivíduos de uma coleção, uma vez que o método é capaz de acessar polimorfismos genético inter e intra-específicos (HUNGRIA et al., 2008). Isso porque os elementos BOX são gerados a partir da amplificação de sequências repetitivas do DNA das quais podem estar relacionadas a alterações genômicas decorrentes da evolução dos organismos sobre pressões ambientais específicas (VAN BERKUM, 1999 *apud* HUNGRIA et al., 2008). Como consequência disso, os organismos de uma mesma espécie podem apresentar perfis distintos. Este parece ser o caso das estirpes *R. altiplani* sp. nov

obtidas de dois sítios de Brasília que foram agrupados em grupos diferentes (MIM 525 - grupo DF-G14 e MIM 357 - grupo DF-G2) (anexo B).

Para a maioria dos isolados de Goiás, Bahia e Paraná não foi possível a amplificação dos perfis de BOX-PCR. Para estes casos, utilizou-se dos perfis de características fenotípicas para realizar a distinção dos isolados. Em Goiás, os 52 isolados foram separados em 8 agrupamentos apresentando as características dos perfis 2, 6, 11, 12, 20, 21 e 23 (ver tabela 6). Para os isolados do Paraná foram averiguados apenas 6 perfis (1, 2, 3, 9, 19 e um perfil não relacionado), enquanto que na Bahia foi obtido o maior número de organismos morfológicamente distintos, sendo 58 isolados distribuídos em 14 perfis (3, 6, 11, 12, 14, 17, 21 e outros sete perfis não relacionados).

Juntando os agrupamentos por BOX e perfis fenotípicos foram totalizados 148 grupos, os quais foram selecionados 188 isolados representantes para a utilização nos experimentos de autenticação e caracterização molecular. Com base nos resultados moleculares (Item 3.3.5) verificou-se que ambos os tipos de agrupamento foram coerentes com a identidade das bactérias (Anexo B), sendo observada apenas algumas divergências nos agrupamentos, como verificado para os grupos RR-G3, que incluiu estirpes de *P. tuberum* e *P. phenoliruptrix*; e RR-G4, onde foram reunidos isolados de *P. tuberum* e *P. diazotrophica*. Entretanto, mesmo nestes casos, nenhum grupo apresentou divergências ao nível de gênero, possibilitando a utilização destes dados na base de cálculos das distribuições dos isolados em cada estado do Brasil.

3.5.4. Nodulação de Alfa e Beta-rizóbios em *Mimosa pudica*

A capacidade nodulífera foi avaliada para 188 isolados, representantes de 148 agrupamentos formados (Anexo B). Os primeiros nódulos foram observados logo aos 14 DAI e apresentaram coloração esbranquiçada com pouca ou nenhuma atividade de LegHg, indicando assim um estágio pré-maturo da nodulação. Ao final de 45 dias de cultivo, 106 isolados exibiram capacidade de induzir nódulos em *M. pudica*, o que significa que aproximadamente 77% da coleção foram representadas por organismos nodulíferas.

Os demais tratamentos (82 isolados) foram incapazes de formar nódulos em *M. pudica*. Apesar destes isolados terem constituído em torno de 44% dos tratamentos utilizados neste experimento de autenticação, estes representaram apenas 15% dos isolados do total da coleção. Destes isolados 21 foram obtidos de nódulos do experimento de “planta isca” *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus vulgaris*, *Mimosa pudica* e *Sesbania virgata*, 27 foram provenientes de outras espécies de *Mimosa* e 34 de *M. pudica*. Para esse resultado é possível levantar duas hipóteses: a primeira é a possibilidade do isolamento de rizóbios incompatíveis com *M. pudica*, a segunda seria o isolamento de bactérias oportunistas que ocupam o interior ou córtex dos nódulos. Este último caso é, de fato, um acontecimento bastante comum nos estudos de diversidade de rizóbios. Isso porque dentro dos nódulos há um grande fluxo de recursos valiosos para os microrganismos (principalmente N e C), tornando-o bastante atrativo. Além disso o nódulo proporciona um ambiente mais protegido das condições ambientais e menos competitivo em relação ao solo. Uma possibilidade para este fato poderia estar relacionada ao desenvolvimento de mecanismos contra as defesas das plantas para ocupar e permanecer no interior dos nódulos, o que explica, em parte, a frequência com que estes organismos são encontrados em amostras ambientais.

Para um melhor esclarecimento, algumas destas bactérias não-nodulíferas foram identificadas a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA, onde foi confirmado o isolamento de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Pseudovorax*, *Sphingomonas* (Anexo B). Isolados pertencentes ao gênero *Enterobacteriaceae*, *Pantoea* e

Bacillus tem sido frequentemente reportado colonizando o interior de nódulos, sem, entretanto, induzir a nodulação (KUMAR et al., 2013; MURESU et al., 2008). Apesar disso, algumas bactérias podem promover benefícios às plantas. Bactérias do gênero *Bacillus* foram isoladas de nódulos de grão de bico e ervilha na Índia com a habilidade de solubilização de fosfato, assim como outros mecanismos que auxiliam crescimento vegetal (produção de ácido idol acético, ácido giberélico) (KUMAR et al., 2013; SAINI et al., 2015; DENG et al., 2011).

Além disso, a alta frequência com que estes microrganismos são encontrados nos nódulos também criam margens para supor a ocorrência de eventos de transmissão lateral de genes simbióticos e o surgimento de novos rizóbios. Na maioria dos rizóbios estes genes encontram-se dentro de um DNA circular plasmídeo (pSym) que pode ser duplicado, perdido e assimilado por outras bactérias. Desta forma as bactérias receptoras podem ou não assumir suas novas habilidades junto a um hospedeiro. Na verdade, essa é uma das principais hipóteses da capacidade simbiótica de *C. taiwanensis* e *C. necator* que, provavelmente, adquiriram os genes simbióticos de linhagens de *Paraburkholderia* a cerca de 5 milhões de anos atrás (ANDAM et al., 2007). Segundo os dados obtidos por estes autores, as sequências de genes simbióticos de estirpes de *C. taiwanensis* possuem altas homologias com as sequências de *P. caribensis* (ANDAM et al., 2007).

Neste experimento também foi observado a nodulação por dois rizóbios incomuns para espécies de *Mimosa*, sendo eles identificados como *Bradyrhizobium elkanii* (MIM 501) e *Azorhizobium doebereineriae* (MIM 484). Os nódulos apresentaram características ativas e proporcionaram crescimento vegetal, indicando um efetivo processo de nodulação. Outros isolados identificados como *Pseudacidovorax intermedius* (MIM 404), *Labrys neptuniae* (MIM 62) e *Herbaspirillum aquaticum* (MIM 57) também apresentaram a capacidade de formar nódulos efetivos em *M. pudica*. Para confirmação dos resultados estes isolados foram novamente purificados e autenticação em *M. pudica*, porém todas as tentativas para obter a nodulação falharam. Portanto, o primeiro resultado provavelmente tenha sido gerado a partir de culturas mistas com uma outra espécie nodulífera compatíveis com *M. pudica*. Alguns destes organismos são morfologicamente semelhantes às bactérias nodulíferas, sobretudo àquelas com produção de muco abundante. Na verdade, este tipo de resultado é bastante comum, e por vez podem gerar atribuição da capacidade nodulífera a outros organismos oportunistas. Deste modo pode-se verificar em algumas publicações resultados falsos-positivos. Dentre estes pode-se citar o isolamento de *Labrys neptuniae* (CHOU et al., 2007), *Herbaspirillum lusitanum* (VALVERDE et al., 2003), e *Enterobacter* sp. (MURESU et al., 2008), como simbioses nodulíferas, porém os mesmos falharam ao completar o postulado de Koch nas plantas hospedeiras originais (GYANESHWAR et al., 2011).

Entre os isolados nodulíferos observou-se que 77% apresentaram nódulos com atividade da Leg-hemoglobina e promoveram crescimento vegetal semelhantes ao observado nos tratamentos inoculados com estirpes de referência de *C. taiwanensis* (LMG 19424^T) e *P. phymatum* (STM 815^T) (Figura 9). Este fenótipo foi atribuído a todas as espécies testadas, com exceção *P. sabiae* e *Rhizobium* sp. Este fato indica que grande parte dos simbioses presentes nos solos brasileiros são capazes de suprir a necessidade de promover crescimento de *M. pudica*. Entretanto, vale ressaltar que a eficiência da FBN é dependente de ambos os parceiros simbióticos e, portanto, os resultados obtidos com *M. pudica* não podem ser extrapolados para outras espécies de *Mimosa* visto a especificidade com os seus microssimbioses.

Grande parte das estirpes testadas das espécies *P. mimosarum* e *P. diazotrophica* apresentaram atividade LegHg parcialmente inativas (perfil C e G – Figura 13 e Anexo B), o que pode estar correlacionado a um processo de colonização menos eficiente ou a um efeito de autorregulação das plantas hospedeiras. De acordo com Schumpp e Deakin (2010), as

plantas podem lançar medidas punitivas aos simbiossitos ineficientes aumentando a permeabilidade do córtex nodular ao O₂, tendo como consequência a inativação da FBN, que é percebida pela coloração esbranquiçada ou esverdeada do interior dos nódulos.

Doze isolados pertencentes às espécies *P. sabiae*, *P. phenoliruptrix*, *P. mimosarum*, *Rhizobium* sp, *R. multihospitium* induziram a formação de nódulos totalmente inativos (Perfil B e F – Figura 13 e anexo B). Para estes tratamentos foram observadas mudas menos desenvolvidas em relação às inoculadas com as estirpes de referências, apresentando um menor volume da parte aérea e folhas com tonalidade de verde claro ou com sinais de clorose. Estes efeitos foram mais marcantes entre as estirpes de *P. sabiae* (MIM 10 e MIM 283.1), *P. phenoliruptrix* (MIM 326, 333 e 339), *Rhizobium* sp. (MIM 139) e um isolado de *P. mimosarum* (MIM 86).

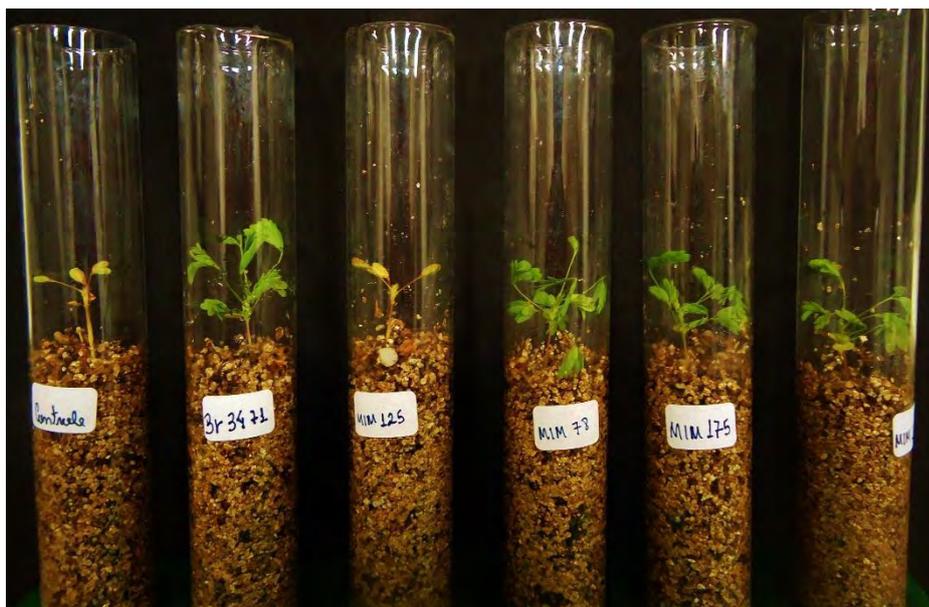


Figura 9. Mudanças de *M. pudica* aos 45 DAI inoculadas com diferentes espécies de bactérias. Da esquerda para direita: Controle negativo; *C. taiwanensis* (LMG 19424^T); MIM 125 (isolado não nodulífero); MIM 78 (*Rhizobium* sp.); MIM 175 (*P. tuberum*); MIM 332 (*C. taiwanensis*).

Com relação ao tamanho dos nódulos pode-se verificar que grande parte dos tratamentos (68%) produziram nódulos de dimensão pequena (< 2mm), consistindo uma característica comum entre espécies de *Paraburkholderia*, *Cupriavidus*, *R. multihospitium* e *R. pisi* (figura 10). Já os nódulos médios (entre 2 e 4mm) foram observados em quatro das sete espécies de *Paraburkholderia*, duas espécies de *Cupriavidus* e pelo *R. multihospitium* (Anexo B). Apenas os tratamentos inoculados com isolados da espécie *R. mesoamericanum* e *R. altiplani* induziram a formação de nódulos superiores a 4 mm (Grande – Perfil J) correspondendo a 8% dos perfis de nodulação (Figura 10).

Diferenças de comportamentos também foram observadas quanto ao número de nódulos formados. Enquanto os tratamentos com nódulos pequenos e médios produziram em média 16 e 13 nódulos, respectivamente, os tratamentos com nódulos grande formaram de 2 a 4 nódulos por planta (Anexo B). Portanto parece haver uma relação inversamente proporcional entre tamanho e número de nódulos, porém isso não implica em um maior ou menor desenvolvimento do hospedeiro, por exemplo, *P. sabiae* e *P. phenoliruptrix* induziram em média 12,5 e 17,25 nódulos por planta, respectivamente, porém estes nódulos foram

totalmente inefetivos e resultou no pior desenvolvimento vegetal. Por outro lado *R. altiplani* e *R. mesoamericanum* produziram 2,66 e 2,50 nódulos por planta, respectivamente, no entanto as plantas tiveram desenvolvimento vegetal intermediário em relação aos tratamentos inoculados com *P. sabiae* e *P. phenoliruptrix* (baixo desenvolvimentos vegetal) e estirpes de referência (alto desenvolvimento vegetal).

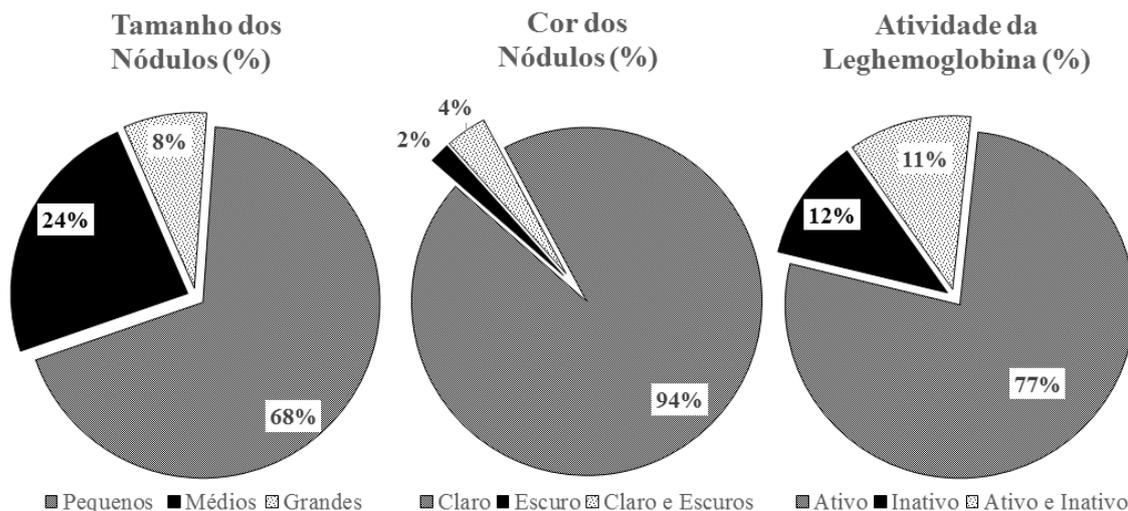


Figura 10. Caracterização dos nódulos de *M. pudica* inoculada com alfa e beta-rizóbios. Tamanho dos nódulos: Pequeno (< 4 mm); Médio (2 – 4 mm); Grande (> 4 mm).

A baixa produção de nódulos observada nos tratamentos inoculados com *R. altiplani* e *R. mesoamericanum* pode ser uma consequência do processo de autorregulação (sistema de defesa das plantas) em resposta a simbioses pouco eficientes. Este tipo resposta é coordenado por um sistema de feedback e, após ter iniciado o processo de nodulação, as plantas emitem medidas repressivas que incluem a aumento da permeabilidade do córtex nodular, exsudação de jasmonato e etileno, entre outras (HAUSE; SCHAARSCHMIDT, 2009; SCHUMPP; DEAKIN, 2010; SUN et al., 2006; OLDROYD et al., 2001). Nestas condições há uma alteração na “sensibilidade” de reconhecimento dos fatores de nodulação, tendo como consequência o bloqueio de novas infecções. De acordo com Seo et al., (2007) um dos objetivos da autorregulação seria a prevenção do fenótipo de hipernodulação por organismos ineficientes, o que acarretaria prejuízo à planta.

Estudos mostram que a simbiose entre espécies do gênero *Rhizobium* e mimosas invasivas, geralmente proporcionam nodulação inefetiva (KLONOWSKA et al., 2012). Segundo Klonowska et al. (2012) *Rhizobium* parece constituir um grupo de simbioses oportunistas de mimosas invasivas, como por exemplo, *M. pudica*. Entretanto, existem casos de nodulação efetiva, como verificado em *Rhizobium etli* e *R. tropici* (ELLIOTT et al., 2009). Em outro estudo, Bontemps et al. (2016) verificaram que membros do gênero *Rhizobium* não só formam nódulos efetivos, como também são os simbioses preferenciais entre as mimosas endêmicas do México. Portanto a efetividade da nodulação induzida por espécies de *Rhizobium* é variável, e uma das principais hipóteses é que os genótipos das plantas e dos rizóbios tenham papéis centrais no sucesso da simbiose (MELKONIAN et al., 2014).

Uma das características mais intrigantes observadas foram quanto a coloração dos nódulos. A maioria dos tratamentos (94%) apresentou nódulos de coloração claras (rosa, branco e amarelos) (figura 10). Esta coloração parece ser comum entre as diferentes espécies de mimosas. Entretanto, neste trabalho também foram observados nódulos de coloração escura, produzidos por espécies *P. nodosa*, *P. tuberum*, *C. necator*, *C. taiwanensis*, *Rhizobium*

sp. em associação com *M. pudica*. As colorações destes nódulos variaram de uma coloração roxa escura a preto (escuros) e, aparentemente, não estão ligadas ao processo de senescência.

Nódulos de *M. caesalpinifolia* e *M. pudica* com coloração escura já haviam sido observados por Campelo e Campelo (1970), porém não foram realizados o detalhamento deste fenômeno. Nódulos escuros também foram observados em raízes de plantas de *Rhynchosia aurea* na Índia, sendo este fenótipo atribuído a formação de uma casca felogênica (tecido suberizado) (GEHLOT et al., 2012). Entretanto, este fenótipo foi produzido em resposta a ambientes ressecados (GEHLOT et al., 2012), contrastando com as condições semi-hidropônicas fornecida por este experimento de autenticação. Os resultados de fato parecem ser mais coerentes com os fenômenos registrados por Schumpp et al. (2009) que verificaram que nódulos de *Lotus japonicum* podem apresentar tamanhos e coloração diferentes dependendo do estágio de maturação e rizóbio inoculado. Durante seu estudo, Schumpp et al. (2009) verificaram que alguns nódulos passaram por uma progressiva pigmentação passando de uma coloração esbranquiçada ou rosada para um roxo-escuro ou negro, os quais apresentavam plenos sinais de efetividade (presença de LegHg ativa). Eaglesham et al. (1982) também observaram a presença atípica de nódulos escuros em *Phaseolus vulgaris*, e demonstraram que este fenótipo não estava associado a um pigmento produzido pelo microssimbionte, tal como melanina ou outro observados em meios de cultura. No entanto, a expressão da coloração escura ocorre de forma específica para cada espécie/estirpe associada a uma leguminosa. De fato, esta especificidade foi constatada em estirpes isolados de mimosa do Brasil, incluído casos em que estirpes da mesma espécie apresentaram comportamentos diferentes, por exemplo, a espécie *C. taiwanensis* é capaz de produzir nódulos claros ou escuros dependendo da estirpe.

De acordo com as análises de cromatografia realizada por Eaglesham et al. (1982) os nódulos escuros apresentam duas bandas visíveis. A primeira banda foi detectada pelo comprimento de onda de 550 nm, sendo associado a leg-hemoglobina; a segunda não apresentou resposta ao mesmo comprimento de onda, sendo possivelmente um outro metabólito secundário pigmentado. De acordo com os mesmos autores, os nódulos com coloração roxo-escuro apresentaram dois componentes pigmentado, nenhum dos quais eram relacionados com componentes contendo “heme” ou antocianina, mas possivelmente associado a antraquinona ou naftoquinona. Estes componentes fazem parte dos compostos químicos quinônicos e estão bem presentes em algumas plantas e microrganismos, os quais já foram bastante utilizados para sintetizar corantes (DEGANO et al., 2011).

Com relação a natureza deste fenótipo nos nódulos, não se sabe se estes componentes são produzidos pela planta hospedeira ou pelos microssimbiontes, mas o fato de uma mesma espécie de rizóbio possuir estirpes com fenótipo positivo e negativo para esta característica sugere que determinadas estirpes possuem papel ativo na produção destes componentes a estabelecer simbiose com um parceiro compatível. De outro modo, a presença de algumas estirpes poderia induz a produção destes componentes pela planta hospedeira. Independente do parceiro responsável pelo fenótipo, levanta-se uma outra questão. Qual seria a importância ecológica deste fenótipo? Sabe-se que alguns componentes quinônicos exercem ação contra determinados microrganismos, insetos e alguns fungos fitopatogênicos (KIM et al., 2004; WINK, 2006; LATTANZIO et al., 2006), o que poderia representar uma vantagem importante no ambiente natural do solo onde os nódulos são constantemente alvos de diversos predadores, dos quais destacam-se os nematoides (OLIVEIRA et al., 2012) e os insetos (FRANÇA TEIXEIRA; FRANCO, 2007)

Outro fato a ser considerado é que o fenótipo de nódulos escuros não se restringiu a estirpes de uma só localidade, ao contrário, os isolados se mostraram amplamente distribuídos nos biomas brasileiros, sendo encontrados nos estados de RR, MG, RJ, GO e DF (Anexo B).

A partir de uma análise conjunta dos atributos tamanho, cor dos nódulos e expressão da atividade da leg-hemoglobina foi possível observar 10 padrões de nodulação (Figura 11). β -rizóbios induziram todos os padrões de nodulação, com exceção do padrão J, que foi exclusivo das espécies *R. altiplani* e *R. mesoamericanum* (Tabela 7). Os padrões mais comuns foram dos tipos A, B, C e E, englobando todas as espécies de beta-rizóbios encontradas neste estudo. Estes padrões foram caracterizados por apresentar nódulos de tamanho pequenos ou médios, de coloração clara e com atividade da legHg variando entre ativa ou inativa. O padrão tipo A (Pequeno/Claro/Ativo) foi o mais frequente entre todos, constituindo cerca de 42% dos tratamentos, sendo correlacionado um maior desenvolvimento de *M. pudica* (Figura 11).

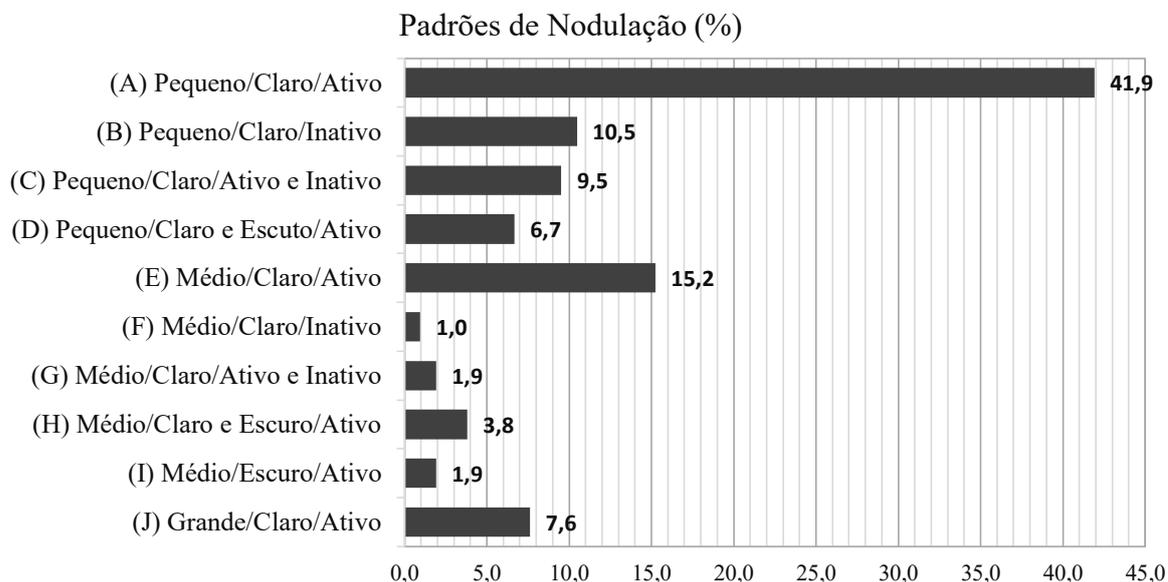


Figura 11. Proporção relativa dos padrões de nodulação de 106 tratamentos nodulíferos.

Os resultados evidenciam que a morfologia dos nódulos varia em função da presença de determinadas espécies/estirpes de rizóbios. Porém, os mecanismos que as plantas hospedeiras acionam para a expressão dos diferentes tipos de fenótipos merecem mais estudos.

Analisando a secção fina dos nódulos foi possível observar que as disposições das células infectadas pelos rizóbios eram compatíveis com o desenvolvimento de nódulos indeterminados, sendo possível identificar as zonas infectadas e meristemas apicais de crescimento bem definidas (Figura 14 – A e B). Não foi possível detectar nenhuma zona senescência na base dos nódulos, o que sugere que aos 45 DAI os nódulos ainda se encontravam nos estágios iniciais de diferenciação. Segundo Fernández-Luqueño e Espinosa-Victoria (2008), a zona de senescência em nódulos indeterminados pode ser observada a partir de tecidos lignificados e ausência de células infectadas na base de inserção dos nódulos nas raízes. Ainda para estes autores, por se tratar de nódulos de crescimento indeterminado, a senescência não significa necessariamente a degeneração dos nódulos, uma vez que após o período de estresse os nódulos podem retomar o crescimento e exercer a FBN.

As secções finas dos nódulos escuros apresentaram características semelhantes as demais secções de nódulos efetivos. Com estes resultados descarta-se a hipótese de que as colorações escuras dos nódulos estejam ligadas ao processo de senescência. Ao invés disso, as células dos nódulos apresentaram-se plenamente infectadas pelos bacteróides, além de apresentar zonas meristemáticas bem definidas no ápice dos nódulos, indicando um crescimento nodular ainda em desenvolvimento (Figura 14 - A). Nódulos com as mesmas características também foram observados em algumas amostras de *M. pudica* crescendo

espontaneamente em solos de RR (*dados não apresentados*). Portanto, embora seja característica incomum para a maioria das leguminosas, a cor escura dos nódulos de mimosas pode ser devida a fatores naturais.

Tabela 7. Resumo dos resultados de autenticação dos grupos de simbiontes em *Mimosa pudica*.

Espécies Inoculadas	N° de tratamentos (%)		N° de Isolados Representados (%)		N° de nódulos/planta †	Padrões de Nodulação‡
<i>Paraburkholderia</i>						
<i>P. tuberum</i>	21	(11,17)	141	(19,48)	13,23	(A), (D), (E), (H), (I)
<i>P. mimosarum</i>	11	(5,85)	83	(11,46)	14,45	(A), (B), (C), (E), (F), (G)
<i>P. diazotrophica</i>	11	(5,85)	54	(7,46)	12,45	(A), (C), (E), (I)
<i>P. nodosa</i>	12	(6,38)	48	(6,63)	26,92	(A), (D), (H)
<i>P. phymatum</i>	4	(2,13)	23	(3,18)	17,50	(A)
<i>P. sabiae</i>	2	(1,06)	6	(0,83)	12,5	(B)
<i>P. phenoluruptrix</i>	5	(2,66)	6	(0,83)	17,25	(SN), (B), (D)
<i>Cupriavidus</i>						
<i>C. taiwanensis</i>	18	(9,57)	56	(7,73)	14,27	(A),(E), (H)
<i>C. necator</i>	2	(1,06)	5	(0,69)	14,50	(A), (H)
<i>Rhizobium</i>						
<i>R. altiplani</i>	6	(3,19)	83	(11,46)	2,66	(J)
<i>R. mesoamericanum</i>	2	(1,06)	13	(1,80)	2,50	(J)
<i>R. multihospitium</i>	2	(1,06)	2	(0,28)	13,5	(B), (E)
<i>Rhizobium pisi</i>	1	(0,53)	1	(0,14)	4	(B)
<i>Rhizobium sp</i>	1	(0,53)	1	(0,14)	20	(D)
Outros						
Espécies sem definição	8	(4,26)	35	(4,83)	–	–
Bactérias não-nodulíferas	82	(43,62)	167	(23,07)	–	–
Total	188		724			

† Média ponderada de todos os tratamentos para cada espécie. ‡ Padrões de nodulação de acordo com Figura 12.

Adicionalmente, os nódulos apresentaram diferenciação após os tratamentos de coloração das secções, onde os nódulos claros apresentaram maior afinidade com o azul de toluidina, enquanto os escuros tingiram-se de vermelho pelo corante safranina. Não se conhece a relação estabelecida entre os corantes utilizados e os tipos de nódulos em questão, todavia sabe-se que o azul de toluidina possui afinidade com moléculas orgânicas como lipopolissacarídeos (LPS), presentes nas superfícies dos rizóbios em diferentes proporções.

Quanto a organização interna dos nódulos foi possível notar que os nódulos efetivos apresentaram plena infecção das células vegetais, ao contrário daqueles inefetivos, cuja as células tornaram-se menos pigmentadas pelos corantes azul de toluidina ou safranina (Figura 13 – C e E). Os nódulos efetivos além de conter maiores concentrações de células infectadas, suas células também apresentaram uma maior densidade de bacteróides em relação aos nódulos inefetivos (Figura 13 – D e F). Esta característica foi associada aos padrões de nodulação A, D, E, H, I e J gerados a partir da inoculação, principalmente, de *P. nodosa*, *P. tuberum*, *P. mimosarum*, *C. taiwanensis*, *C. necator* e *R. altiplani*. Entre os isolados de *P. mimosarum* e *P. diazotrophica* verificou-se que os diferentes tratamentos produziram tanto nódulos com plena colonização das células vegetais quanto nódulos pouco colonizados. Estes resultados corroboram o trabalho de Melkonian et al. (2014), que demonstraram que existem variações intraespecíficas com relação ao processo de nodulação em *M. pudica*.

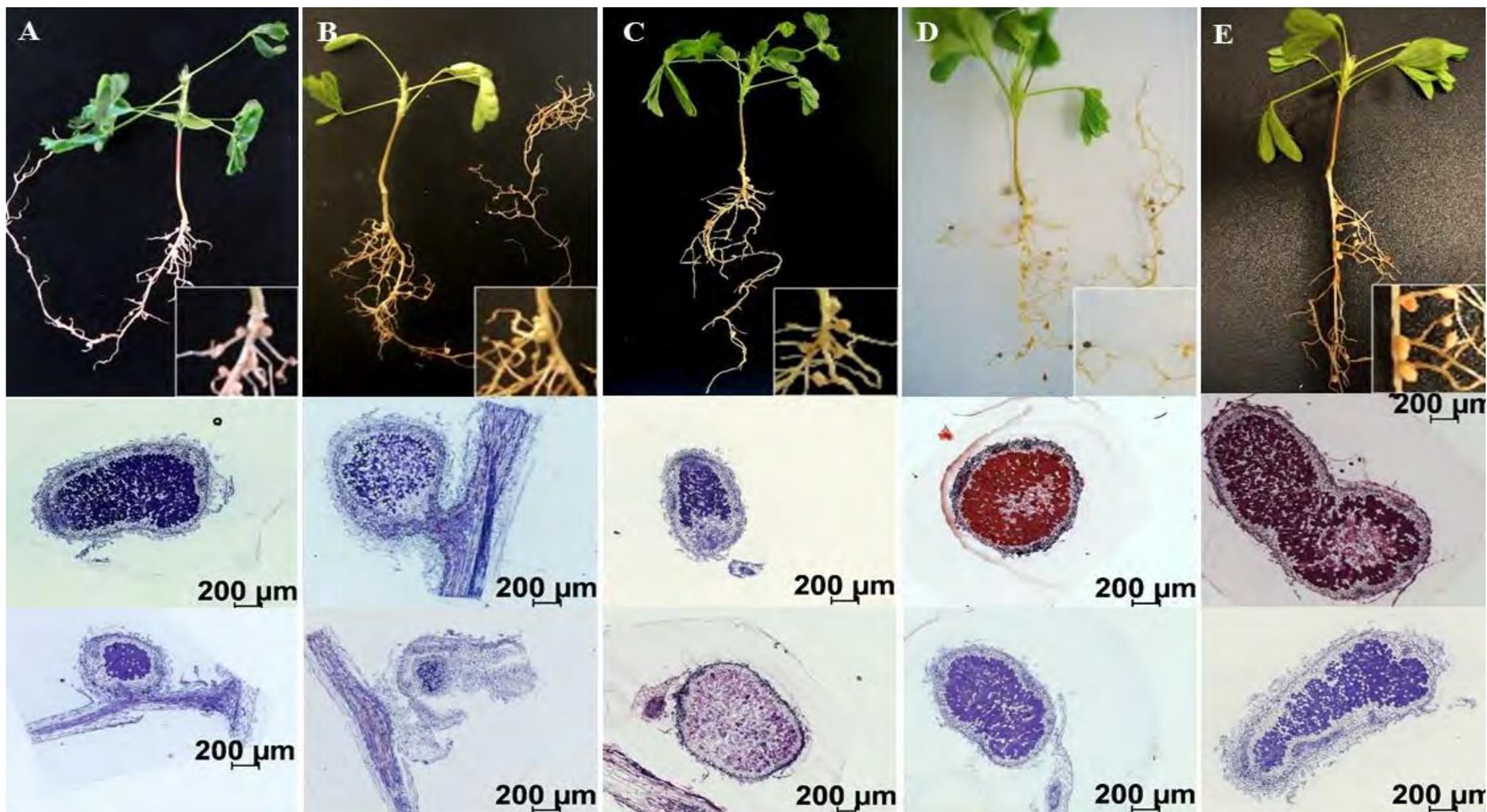


Figura 12. Padrões de nodulação de diferentes isolados (A, B, C, D e E) aos 45 DAI em *M. pudica*. Sendo: A) Pequeno/Claro/Ativo; B) Pequeno/Claro/Inativo; C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo; D) Pequeno/Claro e Escuro/Ativo; E) Médio/Claro/Ativo. Abaixo de cada amostra observa-se as micrografias de secções dos nódulos com diferentes padrões de infecção.

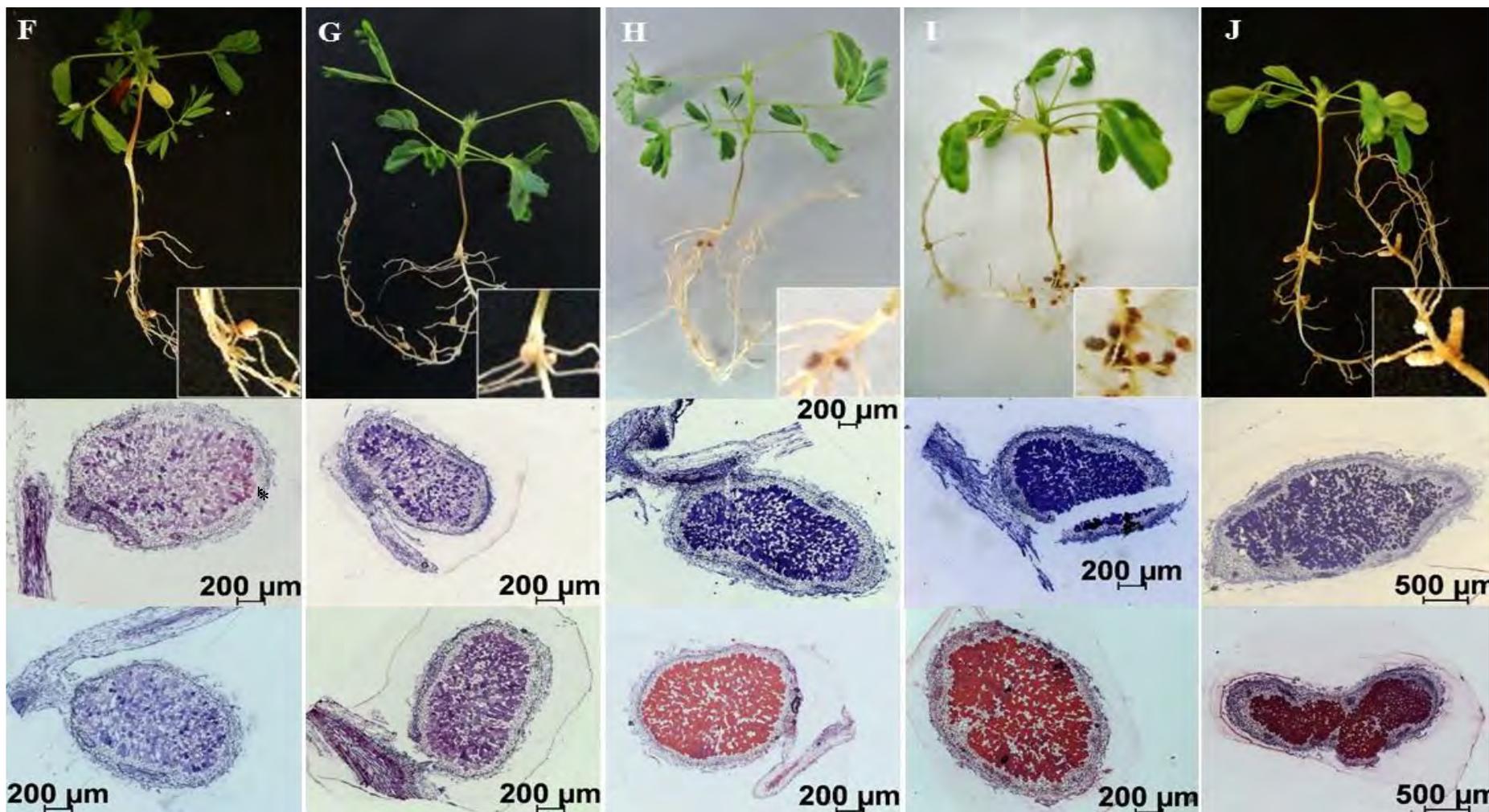


Figura 13. Padrões de nodulação de diferentes isolados (F, G, H, I e J) aos 45 DAI em *M. pudica*. Sendo: F) Médio/Claro/Inativo; G) Médio/Claro/Ativo e Inativo; H) Médio/Claro e Escuro/Ativo; I) Médio/Escuro/Ativo; J) Grande/Claro/Ativo. Abaixo de cada amostra observa-se as micrografias de secções dos nódulos com diferentes padrões de infecção.

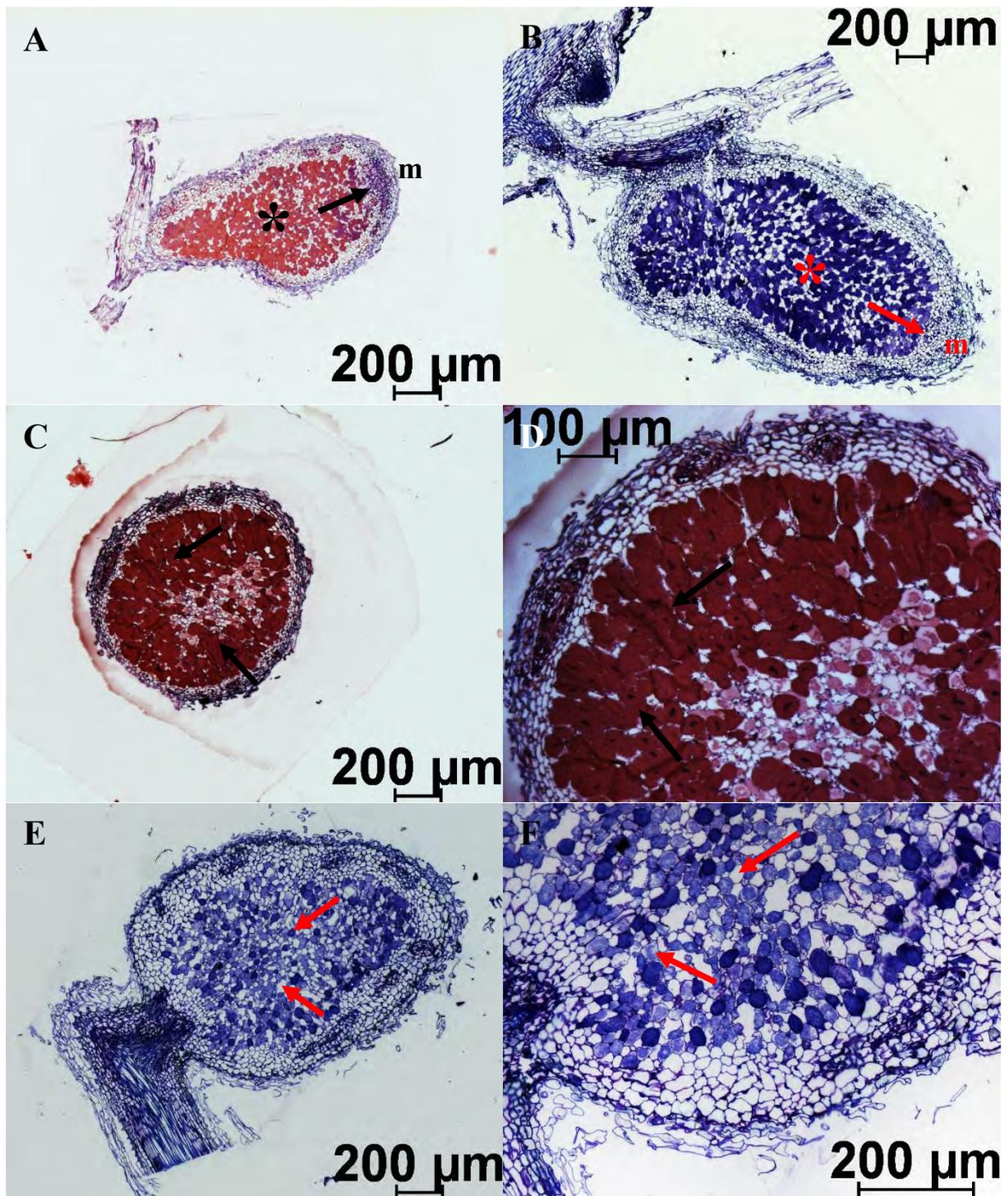


Figura 14. Imagens de microscopia óptica das secções de nódulos de *Mimosa*. A e B – Secções de nódulos de escuro e claro, respectivamente, com as diferentes zonas de infecção. (*) Indicam as zonas de FBN, com bactérias transformadas em bacteroides; (m) Zonas de meristemáticas. C e D – Detalhes dos nódulos efetivos com células plenamente infectadas. E e F – Detalhes de nódulos inefetivos com várias células sem infecção. (→) destacam as diferentes.

As análises de ultraestrutura dos nódulos de *P. phenoliruptrix* e *P. sabiae* foram diferenciadas de qualquer outra anteriormente descrita, sendo estas caracterizadas pela

formação de bolsões de células bacterianas indiferenciadas no entorno das células vegetais do nódulo (Figura 13 – B). Este comportamento poderia estar relacionado a uma resposta de defesa das plantas a estes rizóbios ineficientes semelhante aos processos discutido anteriormente para as estirpes de *R. mesoamericanum*. Porém neste caso, a desorganização das paredes dos nódulos sugere uma medida de defesa pós-nodulação voltada à senescência programada dos nódulos (SHUMPP; DEAKIN, 2010; MORTIER et al., 2012). Portanto estes resultados sugerem que *P. phenoliruptrix* é uma espécie de rizóbio oportunista de *M. pudica*, o que não exclui a possibilidade deste rizóbios nodular efetivamente outras leguminosas. Segundo Cunha et al. (2012) a espécie *P. phenoliruptrix* possui uma relação específica e eficiente com *M. floculosa*, mas é capaz de nodular outras espécies de leguminosas de modo ineficiente. Um fato interessante com relação ao plasmídeo simbiótico (pSym) de *P. phenoliruptrix* é a alta homologia com *P. phymatum*, incluindo genes de nodulação, fixação de N, e síntese de exopolissacarídeos (EPS), o que segundo Zuleta et al (2014), poderia estar relacionado à capacidade deste simbionte infectar e nodular outras espécies de leguminosas. Isso porque alguns destes elementos, como os fatores Nod, estão envolvidos diretamente nos estágios de reconhecimento pelas leguminosas hospedeiras, bem como na indução de sinais moleculares durante o processo de infecção (SPAINK, 2000; MERCANTES et al., 2002). Segundo Lopez-Lara et al. (1993), a síntese e arranjo de determinados tipos de EPS por um rizóbio está ligado à sua gama de leguminosas hospedeiras, bem como à efetividade do processo de infecção de células dentro dos nódulos, dependendo do tipo de ontogenia do nódulo.

3.5.5. Taxonomia dos rizóbios

O estudo taxonômico dos simbiontes foi baseado na maioria das bactérias representantes com capacidade nodulífera em *M. pudica* e outras bactérias não-nodulíferas, totalizando 120 bactérias caracterizadas. Os fragmentos amplificados variaram entre 625 e 1422, sendo estes utilizados para obtenção da identificação através da ferramenta BLASTn. Destes isolados 64 foram identificados como membros do gênero *Paraburkholderia*, 22 *Cupriavidus* e 12 *Rhizobium* (tabela 8). Estes resultados estão coerentes com os achados de Bontemps et al. (2010), dos Reis Junior et al. (2010), onde ficou demonstrado que Beta-rizóbios são os principais simbiontes de mimosas no Brasil, sendo *Paraburkholderia* o grupo dominante. De fato, *Paraburkholderia* representou a maioria dos isolados deste estudo, mas ao contrário dos trabalhos anteriormente citados, foi registrado a presença de *Cupriavidus*. Na verdade a ocorrência deste simbionte não é um fato tão surpreendente, haja visto que Mishra et al. (2012) e Platero et al. (2016) já haviam constatado a nodulação por estes simbiontes na América do Sul. Mais recentemente foram encontradas isolados de *Cupriavidus* em *M. pudica* da região sudeste (DALL'AGNOLL et al., 2017) ratificando os resultados anteriormente obtidos por Silva et al. (2012).

Entre todos os isolados obtidos, *P. tuberum* constituiu a espécie mais frequente, sendo encontrada em nódulos de *M. pudica*, *M. candollei*, *M. setosa*, *M. velloziana* e *Mimosa* sp de cinco estados brasileiros mais o Distrito Federal, totalizando três biomas avaliados (tabela 8). Segundo Mishra et al. (2012), *P. tuberum* é principal simbionte de mimosas na América do Sul, sobretudo em solos ácidos, os quais são predominantes no Brasil. Esta estreita relação entre *P. tuberum* e mimosas nativas pode estar relacionada a um processo de co-evolução de ambos os parceiros, provavelmente remetendo ao período em que surgiram as primeiras linhagens do gênero *Mimosa* (50 mia) (BOMTEMPS et al., 2010; MELKONIAN et al., 2014). Estes mesmo autores relatam que a espécie *P. phymatum* é outro simbionte dominante

das américas. Apesar disso, neste estudo só foram encontrados três isolados no estado de RJ com identificação condizente com *P. phymatum*.

Tabela 8. Distribuição de α e β -rizóbios nodulíferos de espécies de mimosas do Brasil. Biomas: 1. Amazônia; 2. Cerrado; 3. Mata Atlântica; 4. Caatinga.

Espécies	N° de isolados	Biomas				Mimosa Hospedeira†	pH do Solo
		1	2	3	4		
Paraburkholderia							
<i>P. tuberum</i>	20	+	+	+	-	Mp / Mc / Mse / Mpy / Mm / Mso / Mg / Mv / Msp	4,96 – 6,85
<i>P. diazotrophica</i>	12	+	+	+	+	Mp / Mc / Msp	4,96 – 6,08
<i>P. nodosa</i>	12	-	+	+	-	Mp / Mr / Mt / Ms / Msp	5,7 – 5,84
<i>P. mimosarum</i>	10	-	+	+	-	Mp / Mr / Msp	4,88 – 6,68
<i>P. phenoliruptrix</i>	5	+	+	+	-	Mp / Mc / Msp	4,96 – 7,75
<i>P. phymatum</i>	3	-	-	+	-	Mp / Mq / Msp	5,7 – 5,84
<i>P. sabiae</i>	2	-	-	+	-	Msp / Mp	5,47
Cupriavidus							
<i>C. taiwanensis</i>	20	+	-	+	+	Mp / Mt / Msp	5,57 – 7,7
<i>C. necator</i>	2	-	-	+	-	Mp	6,68
Rhizobium							
<i>R. altiplani</i>	6	-	+	-	-	Mp	5,45 – 7,75
<i>R. mesoamericanum</i>	2	+	-	-	-	Mp	5,73
<i>R. multihospitium</i>	2	-	-	+	+	Mp	5,57 – 6,85
<i>R. pisi</i>	1	-	-	+	-	[Ma]	5,6
<i>Rhizobium sp.</i>	1	-	-	+	-	Mp	6,85

† Abreviações das espécies: *M. pudica* (Mp); *M. tenuiflora* (Mt); *M. candolei*; *Mimosa quadrivalvis* (MQ); (Mc); *M. vellosiana* (Mv); *M. setosa* (Mse); *Mimosa radula* (Mr); *Mimosa speciosissima* (Ms); *Mimosa gracilis* (Mg); *Mimosa pyrinaea* (Mpy); *Mimosa macrocephala* (Mm); *Mimosa somnians* (Mso) *Mimosa sp.* (Msp); planta isca *Macroptilium atropurpureum* [Ma].

As espécies *P. mimosarum*, *P. diazotrophica* e *P. nodosa* também foram bem representadas neste estudo, sendo encontradas principalmente nos biomas Caatinga e Mata Atlântica. *P. diazotrophica* foi a única espécie a ter sido encontrada em todos os biomas, o que pode estar ligado a existência diversas estirpes adaptadas às variações ambientais apresentadas em cada bioma. *P. phenoliruptrix* também teve uma distribuição semelhante, exceto pela ausência no bioma Caatinga. De acordo com Zuleta et al. (2014) *P. phenoliruptrix* apresenta plasmídeo pSYM muito semelhante ao de *P. phymatum*, podendo ter sido adquirido a partir transferência lateral de genes. A implicação ecológica deste evento é incerta, porém a produção de fatores de nodulação (Nod ABC) semelhantes aos sintetizados por *P. phymatum* poderia conferir uma vantagem competitiva na ocupação de nódulos, uma vez que a *P. phymatum* é um dos principais parceiros simbióticos de mimosas. Estes mesmos autores acrescentam que *P. phenoliruptrix* tem a capacidade de infectar outras leguminosas, sendo assim, essa poderia uma estratégia bastante útil para a disseminação em diversos ambientes.

Com relação aos isolados de *Cupriavidus*, 20 tiveram sequências entre 99-100% de homologia com a espécie *C. taiwanensis* e duas com *C. necator* (tabela 8). A presença destes simbiontes foi especialmente constatada nos estados dentro da Mata Atlântica e, surpreendentemente, na Caatinga. Um fato intrigante foi que alguns destes isolados do CE foram extraídos de nódulos de *M. tenuiflora*, enquanto a maioria foi obtida de seu parceiro usual, *M. pudica*. Adicionalmente dois isoladas da Amazônia também foram identificadas com *C. taiwanensis*, semelhante ao que foi relatado por Mishra et al. (2012). Estes resultados coloca o território brasileiro como um importante centro de diversidade de *Cupriavidus* nodulífero e contribui para construção de um cenário em que o gênero *Cupriavidus* encontra-se amplamente distribuído na América do Sul.

Já a população de Alfa-rizóbios foi mais expressiva nos estados de Roraima e no Distrito Federal, onde foram identificados dois isolados de *R. mesoamericanum* e seis *R. altiplani* sp nov., representantes de 13 e 83 de outras bactérias da coleção, respectivamente. A maior proporção de *R. altiplani* no Cerrado pode estar ligado a uma condição de favorecimento atípico relacionado ao solo (pH neutro-alcálico) associado com genótipo na planta de origem (*M. pudica* var *unijuga*). De acordo com Melkonian et al. (2014) a competitividade entre rizóbios aumenta ou diminui de acordo com a espécie e variedade de *Mimosa* utilizada. Já o pH supostamente teria um papel importante na sobrevivência de *Rhizobium* no solo, uma vez que estes são organismos sensíveis à acidez (BONTEMPS et al., 2016; DE CASTRO PIRES et al. 2018).

R. mesoamericanum, por outro lado, constitui um simbiote amplamente distribuído nas Américas, o que implica uma adaptação às condições ácidas do solo entre outros fatores limitantes. Isso explicaria o fato de estes isolados terem sido obtidos a partir de nódulos de *M. pudica* crescidas em solo com pH de 5,73 em RR. Além disso, a presença deste simbiote já havia sido registrada ao norte do continente sul-americano (MISHRA et al., 2012), o que sugere um pleno estabelecimento na região.

Outros quatro isolados tiveram sequências atribuídas às espécies *R. multihospitium*, *R. pisi* e *Rhizobium* sp., mas suas distribuições se restringiram aos biomas Mata Atlântica e Caatinga. Nestes biomas, as espécies de *Rhizobium* parecem ser simbioses menos competitivas em relação aos beta-rizóbios, provavelmente devido às condições edáficas como discutido anteriormente.

De todos os biomas, a Mata Atlântica foi o que se mostrou com maior riqueza de espécies apresentando todos os rizóbios de *Mimosa*, com exceção de *R. altiplani* e *R. mesoamericanum*. Contudo as distribuições das amostragens não foram proporcionais, o que pode ter influenciado o resultado deste estudo. Já a Amazônia mostrou ter um grande potencial de pesquisa, pois além de conter uma grande variedade de mimosas nativas, ainda exibiu uma grande variabilidade de rizóbios de gêneros e espécies diferentes.

3.5.6. Reconstrução filogenética dos rizóbios de *Mimosa*

A filogenia dos isolados foi baseada em sequências concatenadas dos genes 16S rRNA e *recA* formando fragmentos de 1375 nucleotídeos. As sequências apresentaram 892 sítios conservados (65%) contra 467 variáveis (34%). Este maior percentual em relação à variação entre os sítios de 16S rRNA (27% - dados não apresentados) se deu em razão da natureza menos conservada do gene *recA*, o que permitiu uma melhor resolução dos ramos da árvore e, conseqüentemente, uma melhor distinção das espécies proximalmente relacionadas. De acordo com Rivas et al. (2004), em algumas situações a filogenia baseada exclusivamente no gene 16S rRNA são inapropriadas, visto a possibilidade de haver interferências decorrentes de eventos de transferências laterais de genes e recombinações gênicas. Menna et al. (2009) complementa que a capacidade de distinção do gene 16S rRNA é limitada em se tratando de organismo muito próximos, sendo recomendado o suporte dos resultados a partir das filogenias de genes housekeeping, que sustentam uma média de 15% mais sítios de variações em relação ao 16S rRNA. Quando estes genes são analisados de forma conjunta (análise de sequência multilocus – MLSA) detém um alto poder de resolução das relações filogenéticas, principalmente pela redução dos conflitos nos arranjos dos clados, gerando assim agrupamentos mais coerentes (RIVAS et al., 2009).

As relações filogenéticas foram demonstradas graficamente a partir de uma árvore Maximum-likelihood constituída por três ramos principais separando os gêneros

Paraburkholderia, *Cupriavidus* e *Rhizobium*. A maior parte das ramificações da árvore apresentou bootstrap acima de 50% demonstrando uma alta confiabilidade dos agrupamentos.

Paraburkholderia e *Cupriavidus* mantiveram distante um do outro por 10% de divergência, enquanto que o gênero *Rhizobium* (Alfa-rizóbio) constituiu um ramo muito distante da subclasse beta-proteobacteria (Figura 14).

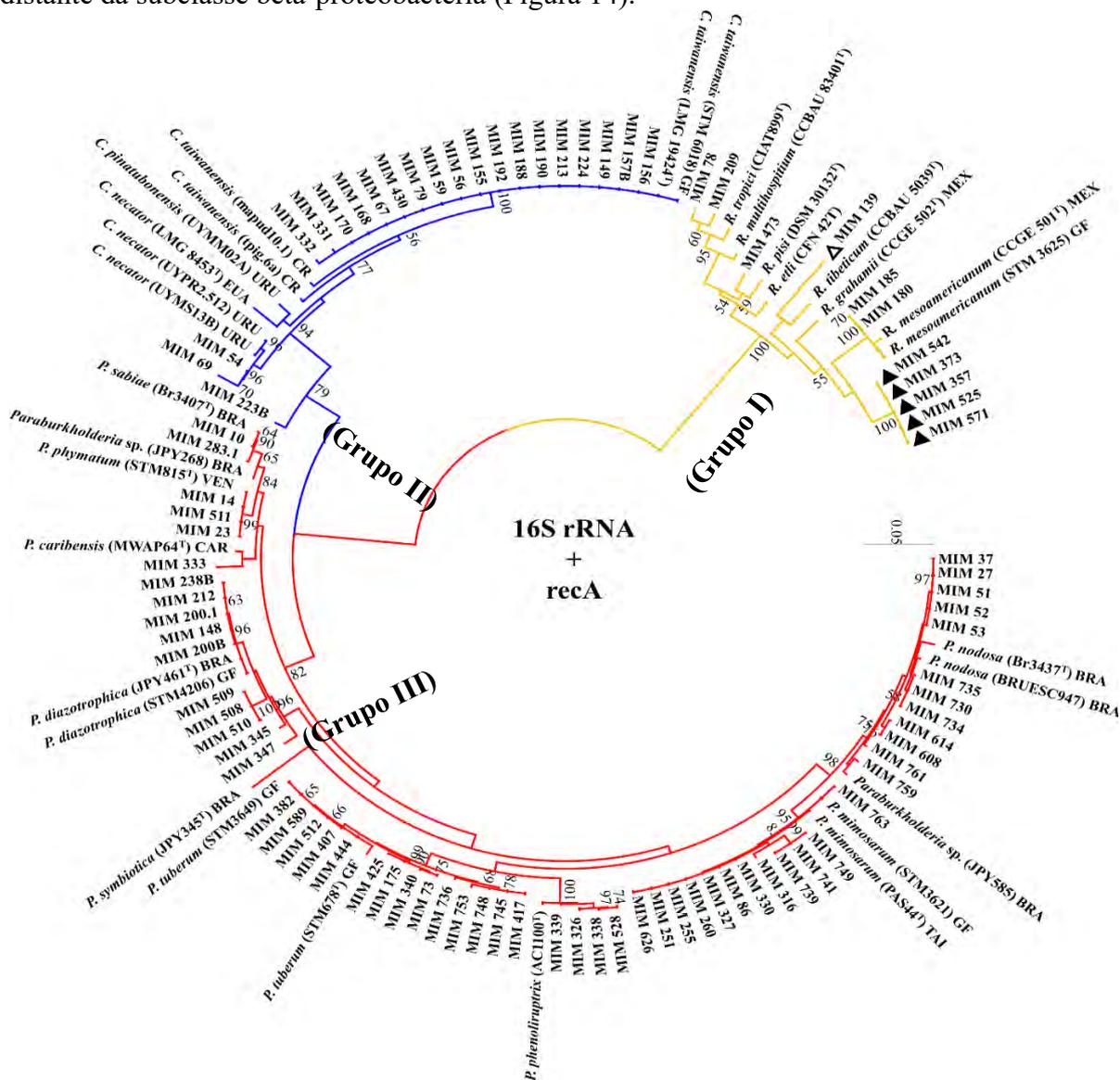


Figura 15. Árvore filogenética Maximum-likelihood baseada em sequências concatenadas dos gene 16S *rRNA* e *recA* mostrando a relação entre os isolados deste estudo (Identificação MIM) com outras estirpes de α e β -rizóbios. (▲) Estirpes de *Rhizobium altiplani*; (◻) destaque para estirpe MIM 139 distinta de todas as demais. A significância de cada ramo filogenético está indicada pelos valores de bootstrap (quando maiores que 50%) gerados a partir de 1000 repetições. Barra: representa a escala de divergência entre as sequências (5 substituições por 100 nucleotídeo). Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo D.

No clado em que se encontravam as espécies do gênero *Rhizobium* pode-se observar que os isolados se distribuíram em três subgrupos. O primeiro foi formado apenas por isolados do DF, os quais foram identificados como uma nova espécie denominada *Rhizobium*

altiplani (Ver Capítulo II). Estes isolados se mostraram muito próximos às estirpes de *R. mesoamericanum* isoladas do México, Guiana Francesa e duas estirpes encontradas no estado de RR. Curiosamente estas duas espécies possuem os genes *nodC* e *nifH* homólogos, o que pode indicar que uma espécie derivou da outra, mas que mantiveram os genes simbióticos praticamente inalterados. Além disso, *R. mesoamericanum* e *R. altiplani* apresentam comportamentos semelhantes com relação nodulação dos hospedeiros *M. pudica* e *Ph. vulgaris*, que pode estar correlacionado ao reconhecimento análogo por estas leguminosas.

Um outro ramo formado unicamente pelo isolado MIM 139 também se destacou de todos outros e apresentou aproximadamente 7% de divergência para a estirpe tipo mais próxima (*R. tibeticum* - CCBAU 5039¹). Esta diferença foi maior inclusive à observada para *R. altiplani* em relação às demais estirpes tipo, contudo não se pode afirmar que se trata de uma nova espécie sem o suporte de uma caracterização polifásica mais abrangente. Apesar disso este resultado levanta um forte indício de haver uma outra nova espécie associada às mimosas do Brasil.

Já os isolados MIM 78 e MIM 209 ficaram reunidos em um ramo mais associado a estirpes tipo de *R. tropici* e *R. etli* cujo a nodulação em *M. diplotricha*, *M. pigra* e *M. pudica* foi comprovada anteriormente por Elliott et al. (2009). Enquanto, em um outro ramo, a estirpe MIM 473 ficou agrupada com *R. pisi*, sendo este o primeiro registro de nodulação em mimosa por este simbiote. Vale destacar que embora este isolado tenha sido capaz de induzir a nodulação em *M. pudica*, este fato dificilmente reproduza uma condição natural, onde se encontram outros simbioss dominantes. Nestas condições, beta-rizóbios como por exemplo, *P. tuberum*, *P. mimosarum* e *C. taiwanensis* são competidores muito mais eficientes em nodular *M. pudica* em relação às espécies de *Rhizobium* (MELKONIAN et al., 2014).

O grupo II que incluiu somente sequências do gênero *Cupriavidus* dividiram em dois ramos principais compostos por isolados mais próximos à estirpe tipo de *C. necator* e outro ramo incluindo àqueles com maior identidade com *C. taiwanensis*. As estirpes de *C. taiwanensis* do Brasil apresentaram pouca divergência filogenética em relação a estirpe tipo isolada em Taiwan e outro isolado obtido de *M. pudica* na Guiana Francesa, enquanto que duas estirpes da Costa Rica se separam. Esta pequena divergência intraespecífica já havia sido observada no trabalho de Andam et al. (2009), entretanto a distância entre os ramos é menor que 1%, sendo insuficiente para indicar qualquer separação filogenética. Por outro lado, os isolados de *C. necator* (MIM 69 e MIM 54) formaram um subgrupo com um isolado do Uruguai com 4% de divergência em relação a estirpe de *C. necator* norte-americana. Neste caso, o resultado pode indicar o isolamento das populações de *C. necator*.

A maior parte dos isolados (58 isolados) permaneceram dentro do grupo III, o qual foi constituído apenas por espécies de *Paraburkholderia* e distribuídas em seis subgrupos. O subgrupo 1 reuniu as estirpes tipo de *P. phymatum*, *P. sabiae* e *P. caribensis* e mais seis estirpes dos estados do RJ e BA. Estas espécies apresentam uma grande proximidade filogenética. Outras dez bactérias provenientes da BA, RR e CE ficaram reunidos no subgrupo de *P. diazotrophica*, porém estas apresentaram uma pequena distinção intraespecífica associada com os locais de coleta, onde nota-se que as estirpes da BA (MIM 508, MIM 509 e MIM 510) mantiveram-se destacadas das demais.

O subgrupo de *P. tuberum* incluiu quatorze estirpes de diferentes origem e biomas, o que pode indicar um amplo estabelecimento deste simbiote no território brasileiro sem uma separação das populações. Os resultados estão congruentes com os achados de Mishra et al. (2012), que relata uma dominância deste simbiote na Guiana francesa. O clado mais próximo da espécie *P. tuberum* foi formado por bactéria identificadas como *P. phenoliruptrix* incluindo isolados de RR (MIM 338 e MIM 339), DF (MIM 528) e ES (MIM 326). O fato de *P. phenoliruptrix* ter sido encontradas em *M. pudica* em estados de diferentes biomas do

Brasil demonstra que esta espécie é de fato, um simbiote bem estabelecido, embora esta seja uma espécie menos frequente. Curiosamente, os resultados de autenticação revelaram que este simbiote não promove um crescimento de seu hospedeiro, ao contrário, debilita ou atrasa o seu desenvolvimento, o que pode caracterizar um comportamento parasitário. Os mecanismos os quais este simbiote utiliza para burlar os sistemas de defesa das plantas e permanecer por prolongados períodos dentro dos nódulos ainda é uma questão obscura

Um pouco mais distante das demais espécies encontram-se os isolados de *P. mimosarum* e *P. nodosa*, que possuem uma estreita relação já conhecida (ANDAM et al., 2007). Em cada um destes clados pode-se perceber uma baixa variação intraespecífica, principalmente entre os isolados identificados como *P. nodosa* (figura 14). Dentro do grupo de *P. mimosarum* apenas três isolados com origem do bioma Cerrado (MIM 739, 741 e 749) se posicionaram mais afastados dos demais integrantes do clado.

3.5.7. Filogenia dos genes simbióticos

As árvores dos genes *nifH* e *nodC* foram geradas a partir do alinhamento de 319 e 477 bp, respectivamente, onde a maior parte das ramificações apresentaram valores a 90% de (bootstrap) confiança. Embora a arquitetura das árvores concatenada (16S rRNA + *recA*) e dos dois genes simbióticos (*nifH* e *nodC*) apresentassem semelhanças, foi possível observar algumas importantes alterações de posicionamento de táxons, o que revela as diferentes origens da capacidade de FBN, podendo estar relacionado a aquisição dos genes via transferência horizontal de genes. Este resultado corrobora com Laguerre et al. (2001), que afirma que as topologias das árvores filogenéticas dos genes *nifH* e *nodC*, em geral, são congruentes entre si, mas podem apresentar importantes distorções com relação ao gene 16S rRNA.

Com relação ao gene *nifH* foram amplificadas 70 sequências correlacionadas aos gêneros *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* e *Rhizobium*. Grande parte das sequências foram obtidas utilizando pares de *primers* específicos para os respectivos gêneros (*Paraburkholderia*: Burk *nifH*-F/Burk *nifH*-R; *Cupriavidus*: nhcf3/nhcr4; *Rhizobium*: *nifH*-F/*nifH*-R), enquanto que para alguns isolados que apresentaram problemas de amplificação foram utilizados um outro par de *primer* de amplitude genérica (Pol-F/Pol-R). Estas sequências foram comparadas com outras 34 sequências de estipes tipo e de outros trabalhos relacionados a simbiotes de *Mimosa* (figura 15), sendo estas distribuídas em 9 grupos.

Assim como na filogenia dos genes concatenados, a arquitetura da árvore ficou dividida em três ramos principais, cada um correspondendo a um gênero de rizóbio. Dentro de cada ramo, algumas sequências apresentaram posicionamentos divergentes ao observado na árvore 16S rRNA+*recA*. Esta incongruência não é surpreendente, uma vez que a taxonomia de genes simbióticos está mais relacionada aos nichos ecológicos (parceiros simbióticos) do que com a própria história evolutiva dos organismos (LAGUERRE et al., 2001). Além disso a origem destes genes por vezes podem sofrer distorções em função de eventos de transferência horizontal de genes, sendo possível que um organismo detenha múltiplas cópias do mesmo gene (ANYANGO et al., 1995; BARCELLOS et al., 2007), das quais podem ser “doadas” por uma outra espécie irmã, ou até mesmo a partir de rizóbios de gêneros diferentes. De acordo com Andam et al. (2007), a origem da capacidade simbiótica e de fixação de nitrogênio de *Cupriavidus* provavelmente se deu por este mecanismo, sendo uma linhagem de *Paraburkholderia* o provável organismo doador.

Dentre os isolados de *Cupriavidus* foram amplificadas 18 sequências de gene *nifH* homologas a sequências de *C. taiwanensis* e *C. necator*, sendo estas muito próximas entre si, compartilhando de 95 a 99% dos nucleotídeos. Estes isolados formaram um grupo (C1)

juntamente com estirpes de *C. necator* e *C. pinatubonensis*, proveniente do Uruguai e Brasil, constituindo um grupo de simbiosites da América do Sul (Figura 15). Estes resultados sugerem que os isolados adquiriram o gene *nifH* de um ancestral comum e mantiveram suas sequências pouco alteradas, independente do processo de especiação ou da expansão geográfica ao longo da América do Sul.

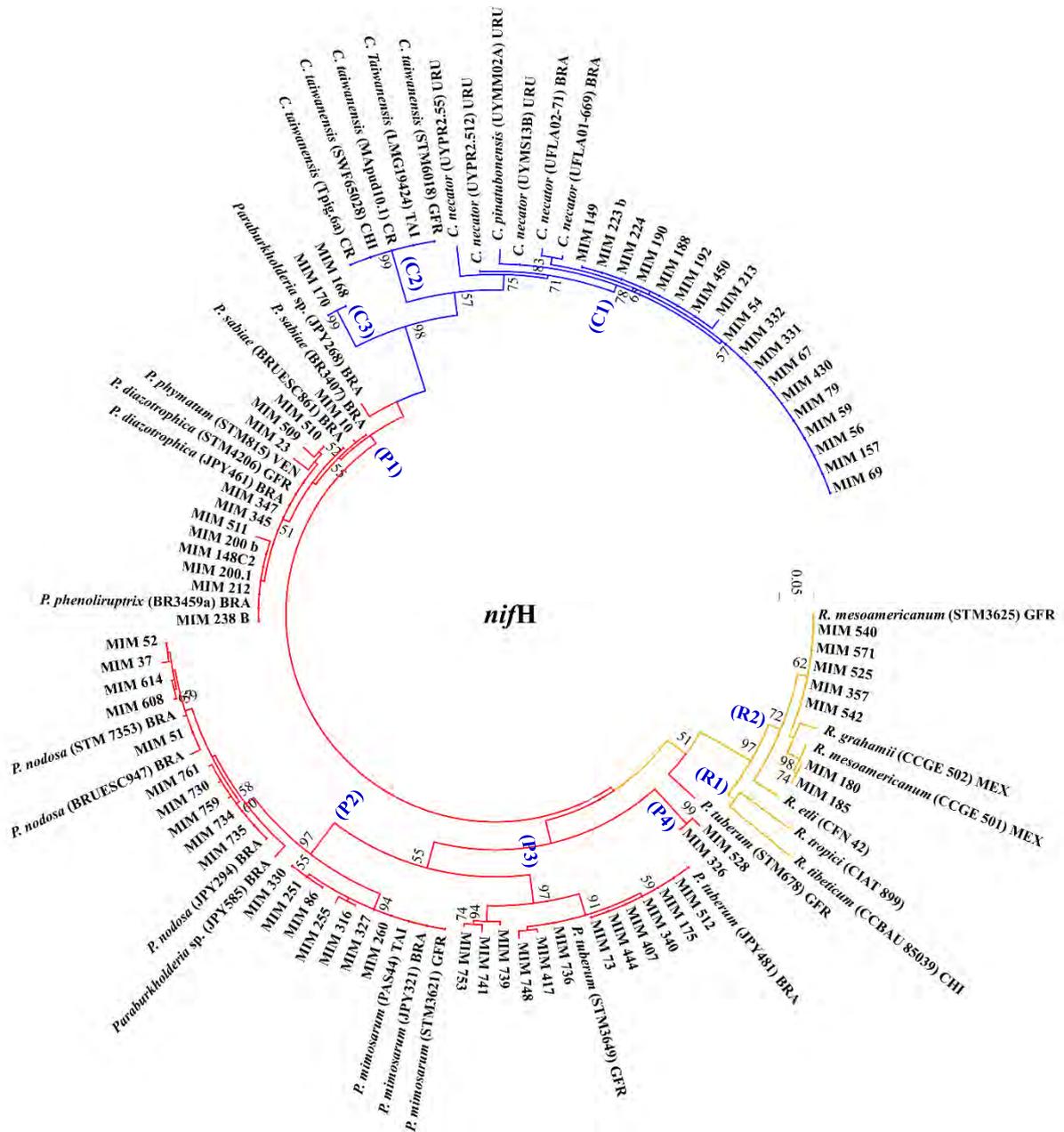


Figura 16. Árvore filogenética Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *nifH* mostrando a relação entre os isolados deste estudo e outros α e β -rizóbios do mundo. A significância de cada ramo filogenético está indicada pelos valores de bootstrap (quando maiores que 50%) gerados a partir de 1000 repetições. Barra representa a escala de divergência entre as sequências (5 substituições por 100 nucleotídeo). Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo D.

Neste contexto, as espécies de mimosas, bem como outras leguminosas hospedeiras, podem ter tido um papel determinante para a disseminação deste microssimbionte. Uma das vantagens da simbiose para os rizóbios é justamente a possibilidade de multiplicar dentro das leguminosas e ser liberado no solo, tornando cada vez mais expressivos neste ambiente aumentando as chances de um reestabelecimento da simbiose e propagação em determinado território. Em um trabalho de revisão, Shumpp e Deakin (2010), apresentam rotas de estabelecimento de simbiose (efetiva ou inefetiva), porém todas tem um destino comum, a senescência e necrose dos nódulos, com a sucessiva liberação dos microssimbionte (alguns em na forma indiferenciada) ao solo, que por sua vez assumem o estilo de vida saprofítico e ficando disponível para o estabelecimento de uma nova simbiose. Considerando que mimosas são amplamente encontradas ao longo das Américas, seus parceiros simbióticos podem ter acompanhado o mesmo fluxo de colonização, especialmente *Cupriavidus*, cujo sua a relação é de alta afinidade com espécies de *Mimosa*, e geralmente produz simbiose de alta eficiência.

Este primeiro grupo (C1) se posicionou bem distante (12% de divergência) de outras estirpes de *C. taiwanensis* ao redor do mundo (C2), incluindo aquelas proveniente da Guiana Francesa, Costa Ricas, Taiwan, China e Filipinas (ANDRUS et al., 2012; CHEN et al., 2001); MISHRA et al., 2012; BARRETT et al., 2006; LIU et al., 2012). Estes isolados compartilharam a mesma sequência de gene *nifH*, sendo esta relação amplamente reportada, levantando fortes evidências de uma disseminação recente de uma linhagem do novo mundo para as demais regiões.

Já os isolados MIM 170 e MIM 168 (C3), ambos obtidos de RR, tiveram sequências diferentes de todas as outras, e produzindo uma ramificação logo na base de gênero. Verifica-se ainda que as distâncias filogenéticas destes isolados para as *Paraburkholderia* e outros *Cupriavidus* são muito próximas, sendo de 18 e 13%, respectivamente. Estes dados permite sugerir que estes isolados possuem sequências mais próximas às linhagens ancestrais.

No ramo das *Paraburkholderia* foram observados 4 grupos com no mínimo 13% de divergência entre eles. No grupo P1 foram reunidas as sequências dos isolados identificados como *P. diazotrophica*, sendo estas muito similares às de *P. phymatum*, *P. sabiae* e *P. phenoliruptrix*, não passando de 6% de divergência. Adicionalmente verifica-se que este grupo foi o que mais se aproximou do grupo de *Cupriavidus*, ratificando os resultados de Andam et al. (2007), que verificaram que a estirpe STM815 de *P. phymatum* tem grande proximidade com *Cupriavidus* com relação as sequências do gene *nifH*. Entre os isolados de *P. diazotrophica* nota-se pequenas variações interligadas com os locais de origem. Por exemplo, as estirpes do CE (MIM 200.1; MIM 238B; MIM 212; MIM 148 C2; MIM 200B) agruparam-se separados das estirpes de RR (MIM 345; MIM 347) e da BA (MIM 509; MIM 510), que por sua vez, ficaram posicionadas próximas aos isolados da espécie *P. phymatum*.

O grupo P2 foi exclusivamente relacionado as espécies *P. mimosarum* e *P. nodosa*, sendo estes separados por uma pequena diferença de 5% de substituição dos nucleotídeos, semelhante ao que foi registrado Andam et al. (2007). Além disso, percebe-se que esta relação de proximidade também está presente nos genes conservado 16S rRNA e *recA*, sugerindo que ambas espécies derivaram de um ancestral muito próximo, sendo este a provável origem dos genes simbióticos. De fato, a disposição destes agrupamentos é essencialmente a mesma observada na filogenia do gene *nodC* (figura 16). Neste grupo os isolados de *P. mimosarum* permaneceram muito próximos das estirpes de referência e estirpes de outras regiões do mundo, incluindo estirpes isolados do Brasil (JPY321), Guiana Francesa (STM3621) e Taiwan (PAS44). Pelo lado do isolados de *P. nodosa*, algumas pequenas diferenças separaram as estirpes da Mata Atlântica e Cerrado. Neste caso o hospedeiro pode ter tido um papel mais determinante sobre as variações do gene *nifH* encontradas, visto que os rizóbios coletados da Mata Atlântica foram extraídos de espécies de mimosas promíscuas e disseminadas, enquanto

que no Cerrado as espécies hospedeiras eram endêmicas da região do planalto central (*M. speciosissima* e *M. radula*). Neste último caso, poderia estar ocorrendo um processo de co-evolução em direção a uma especificidade, semelhante ao que foi observado entre *Ensifer* e *M. hamata*, na Índia (GEHLOT et al., 2012).

Já os isolados de *P. tuberum* ficaram arranjados no grupo P3 havendo poucas diferenças entre eles. Entretanto três isolados de GO (MIM 739; MIM 741 e MIM 753) permaneceram em um ramo separado dos demais. Semelhante ao que foi observado no Grupo P2, este três isolados também foram obtidos de espécies de *Mimosa* endêmicas do Cerrado.

O grupo P4 foi constituído por apenas dois isolados (MIM 528 e MIM 326) cujo as sequências do gene *nifH* foram distintas de qualquer outra estirpe de referência, inclusive de *P. phenoliruptrix*, a qual estes isolados foram identificados pelo gene 16S rRNA. Uma hipótese para este fato é que estes isolados possuam mais de uma cópia de *nifH*, as quais poderiam ser obtidas pelos eventos de transferência horizontal de genes, principalmente pela incorporação de plasmídeo pSYM (BARCELLOS et al., 2007). Interessantemente ambas sequências são homologas a sequência de *nifH* da estirpe JPY582 de *P. phenoliruptrix*, que também foi isolada de *Mimosa* sp. no Brasil (BONTEMPS et al., 2010).

As sequências de α -rizóbios foram distribuídas em duas ramificações. No grupo R1 foi composto somente por estirpes de outros estudos, sendo estas CIAT 899 (*R. tropici*) e CBAU 85039 (*R. tibeticum*). Estas estirpes apresentaram 20% de divergência entre si e aproximadamente 12% em relação a ramificação do grupo R2. O grupo R2 reuniu todas estirpes de *R. mesoamericanum* deste estudo (MIM 180 e MIM 185), do México (CCGE 501^T) e Guiana Francesa (STM3625), sendo separadas por uma diferença de 3-4% divergência de nucleotídeos. Entretanto, em uma análise a partir dos aminoácidos codificantes da proteína, verificou-se que esta diferença de nucleotídeos não resultou em alterações na sequência de aminoácidos, ou seja, resultaram de mutações silenciosas, produzindo as mesmas proteínas em ambos os subgrupos. Outros cinco isolados do DF (MIM 525, MIM 542, MIM 571, MIM 540 e MIM 357) também apresentaram as mesmas sequências de nucleotídeos da estirpe STM3625, evidenciando uma forte ligação entre estes simbionte, uma vez que essa proximidade também foi confirmada nos demais locus gene analisados nesta tese. Este grupo também foi composto pela estirpe CCGE 502^T de *R. grahamii* que compartilhou entre 95 a 96% dos nucleotídeos.

A filogenia do gene *nodC* foi constituída por 83 sequência obtidas dos isolados selecionados, as quais foram comparadas com outras 30 sequências de estirpes tipo e outros simbiontes de mimosa. No total foram formados 10 grupos, semelhantes aos apresentados na filogenia do gene *nifH*.

Entre os isolados do gênero *Rhizobium* verifica-se que as sequências de *R. mesoamericanum* e *R. altiplani* ficaram reunidos em um único grupo (R1), juntamente com estirpes da Guiana Francesa, do Brasil e México compartilhando entre 99 e 100% dos nucleotídeos. Este resultado sugere que pode ter ocorrido um evento de migratório de linhagens ancestrais entre América do Sul e América Central, como discutido em Bontemps et al. (2016). Entretanto não se conhece a marcha dos fatos em que se deu o fluxo de migração e nem as condições para que isso ocorresse. Sob esta perspectiva surge uma série de questionamentos, por exemplo, qual o papel das plantas hospedeiras na disseminação desta espécie? A biogeografia dessas leguminosas estariam contribuindo na dispersão deste simbionte? A disseminação deste simbiontes ocorreu anteriormente ao surgimento das atuais plantas hospedeiras? Para melhor entendimento destas questões faz-se necessário mais pesquisas comparativas destas duas espécies e populações, incluindo comparação de genomas e isolamentos em outros representantes ao longo do trajeto Brasil-México. De modo

complementar, os testes de inoculação cruzada podem fornecer importantes informações a respeito da amplitude de hospedeiros existente na porção norte neotropical.

Além de serem capazes de nodular com *Ph. Vulgaris* e *M. pudica* (LÓPEZ-LÓPES et al., 2012; BARAÚNA et al., 2016, KLONOWSKA et al., 2008; MISHRA et al., 2012; *Estatese*), *R. mesoamericanum* e *R. altiplani* espécies são muito semelhantes em vários outros aspectos fenotípico e genotípicos, sugerindo se tratar de espécies irmãs. Outra espécie próxima é *R. grahamii*, que possui sequência de gene *nodC* com apenas 6% de divergência em relação aos demais membros grupo R1 (Figura 16).

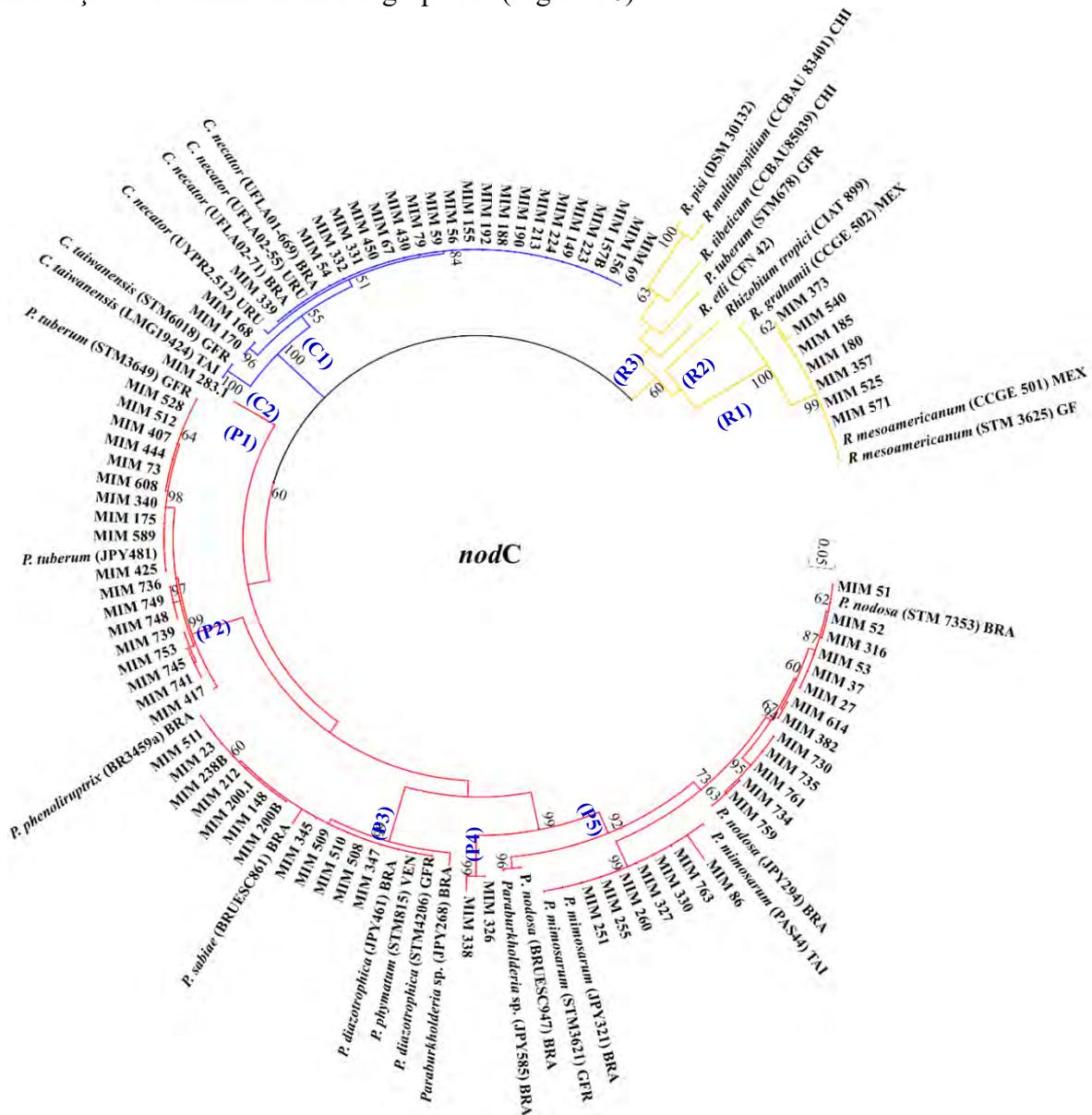


Figura 17. Árvore filogenética Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *nodC* mostrando a relação entre os isolados deste estudo (Identificação MIM) com outras estirpes de α e β -rizóbios. A significância de cada ramo filogenético está indicada pelos valores de bootstrap (quando maiores que 50%) gerados a partir de 1000 repetições. Barra representa a escala de divergência entre as sequências (5 substituições por 100 nucleotídeo). Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo D.

Os grupos R2 e R3 foram formados somente por estirpes tipo e outros simbiotes de diferentes regiões do mundo. Estas sequências se mostraram muito diferentes das sequências obtidas dos isolados deste trabalho, apresentando no mínimo 35% de nucleotídeos divergentes. O fato da nodulação não ser uma característica essencial a sobrevivência do microrganismo permite com que os genes simbióticos apresentem uma alta taxa de mutação, proporcionando uma maior variabilidade de genes, mesmo entre espécies relacionadas. Além disso, o estabelecimento com determinadas plantas hospedeiras faz com os genes se modifiquem com passar do tempo, estabelecendo relações de especificidade e promiscuidade (GEHLOT et al., 2013).

Entre as sequências de *Cupriavidus* o que mais se destaca é grande semelhança de genes intra e interespecífica, sugerindo que ambas as espécies adquiriram este gene de um ancestral comum. No grupo (C1) foram incluídas todas as sequências dos isolados deste trabalho, além outras estirpes isoladas do Brasil (SILVA et al., 2012) e do Uruguai (PLATERO et al., 2016), constituindo assim, um gene exclusivamente sul-americano. As sequências apresentaram divergências entre si de 2 a 4 % de substituição de nucleotídeos, sendo esta diferença pouco significativa considerando a natureza pouco conservadas dos genes simbióticos. Neste grupo também foram incluídas duas estirpes de *C. taiwanensis* de RR (MIM 168 e MIM 170), as quais se separaram das demais com uma distância aproximada de 4%, constituindo 17 mutações pontuais. Embora esta separação não represente uma divergência expressiva, nota-se uma tendência de modificação do gene. Interessantemente estas duas estirpes apresentaram comportamento de nodulação diferenciado dos demais, induzindo a formação de 24 e 32 nódulos em *M. pudica* (Anexo B), enquanto que as outras estirpes de *Cupriavidus* obtiveram médias próximas de 14 nódulos por planta (tabela 8).

De todas as sequências de *Cupriavidus* somente duas se posicionaram mais isolados do grupo C1, sendo estas as estirpes LMG19424 e STM 6018, provenientes de Taiwan e Guiana Francesa, exibindo no mínimo 10% de substituição de nucleotídeos. Estas duas estirpes constituíram o grupo C2.

As sequências de *Paraburkholderia* foram distribuídas em cinco grupos com no mínimo 20% de diferença de nucleotídeos (figura 16). Estes agrupamentos foram iguais aos observados na filogenia do gene *nifH*, com exceção do grupo P1 que foi representado unicamente pelo isolado MIM 283.1, associado a espécie *P. sabiae*.

De modo geral os membros de uma mesma espécie tenderam a permanecer juntas, seguindo o padrão de transmissão vertical dos genes com algumas pequenas segregações intraespecífica. No entanto as estirpes MIM 316 e MIM 382 pertencentes as espécies *P. tuberum* e *P. mimosarum*, respectivamente, foram encontradas junto com outras estirpes de *P. nodosa*. Nestes dois casos em particular, parece ter ocorrido transferência horizontal de genes. Em uma outra hipótese, o resultado pode ter sido fruto de erros durante os procedimentos da amplificação dos genes.

O grupo P2 foi constituído unicamente pela espécie *P. tuberum*, incluindo 18 sequências deste estudo e outras do Brasil (JPY 481) e Guiana Francesa (STM 3649). Estes agrupamentos apresentaram pouco mais que 2% de divergência dos nucleotídeos, revelando uma grande estabilidade do gene nodulífero em grande faixa territorial da América do Sul. De acordo com os resultados de Bournaud et al. (2013) *P. tuberum* compartilha sequência apenas com estirpes de *P. symbiotica*, sendo esta sequência distante das demais espécies. É interessante notar que estes isolados foram capazes de nodular nove espécies de *Mimosa*, incluindo espécies disseminadas e endêmicas. Neste sentido a promiscuidade do microsimbionte pode representar um fator “conservador” do gene, pois as modificações mais drásticas na sequência do gene poderiam reduzir o espectro de hospedeiros e, conseqüentemente, a afetar disseminação ao longo dos ambientes.

O terceiro grupo (P3) foi o mais heterogêneo, envolvendo sequências de *P. phenoliruptrix*, *P. sabiae*, *P. diazotrophica* e *P. phymatum*. Estes isolados compartilharam a mesma sequência de genes, com no máximo 3% de divergências, verificando-se o mesmo agrupamento presente na árvore do gene *nifH*. Este fato também foi verificado nos estudos de Bournaud et al. (2013), e ratifica a origem comum da capacidade simbiótica e uma baixa taxa de modificações ao longo da história evolutiva. Nota-se ainda que dentro da espécie *P. sabiae* é possível encontrar mais de uma sequência de gene *nodC*, ambos associados a estirpes simbiotes de mimosa (BRUES861 e MIM 283.1). Apesar de ter apresentado uma maior versatilidade de genes *nodC*, isso não se refletiu sobre a dominância territorial ou de hospedeiro, consistindo um dos táxons de menor expressão entre os simbiotes de mimosa no Brasil.

Da mesma forma que *P. sabiae*, a espécie *P. phenoliruptrix* também apresentou duas sequências divergentes para o gene *nodC*, sendo uma relacionada ao grupo P3 e outro exclusivo da espécie (grupo P4). Este resultado corrobora a topologia da árvore filogenética *nodC* de Bournaud et al. (2013) e demonstra a diversidade de molecular desta espécie que tem uma ampla gama de hospedeiros.

As estirpes de *P. nodosa* e *P. mimosarum* mostraram-se muito próximas apresentando distância filogenética de menos de 10% divergência de nucleotídeos. Estes isolados constituíram o grupo P5, sendo este mais correlacionado com o grupo de *P. phenoliruptrix* (P4). Esta mesma disposição das sequências também foi reportada por Bournaud et al. (2013), sendo portanto, uma relação bem estabelecida entre estas espécies. Entre as estirpes de *P. nodosa* não se verificou grandes variações, com exceção da estirpe MIM 86. Por outro lado, as estirpes de *P. mimosa* formaram subgrupos correlacionado aos locais e hospedeiros de origem. As estirpes de Goiás isoladas de mimosas endêmicas se apresentaram separadas daquelas originadas de mimosas do Rio de Janeiro (figura 16). Este resultado reforça as discussões anteriores à cerca da especificidade com a planta hospedeira. Na nodulação, o gene *nodC* está envolvido diretamente na biossíntese do fator Nod, atuando na comunicação molecular e iniciando os estágios de pré-nodulação. Nos processos de co-evolução, as sequências dos genes podem sofrer algumas variações resultando no aumento da eficiência do processo de nodulação em direção a especificidade (GERLOT et al., 2013). Os isolados de *P. nodosa* parece seguir esta tendência, consistindo um dos simbiotes predominantes entre espécies endêmicas do Cerrado.

3.5.8. Biogeografia dos simbiotes de mimosas do Brasil

Com base nas identidades dos rizóbios representantes de cada grupo e nas análises de agrupamento de BOX e perfil morfológico foi possível extrapolar os resultados, obtendo assim, uma proporcionalidade das frequências dos simbiotes mais representativa, ao menos a nível de gênero.

De modo geral, o Brasil apresentou uma rica diversidade de beta-rizóbios, onde *Paraburkholderia* foi o principal simbiotes de espécies de *Mimosa* para a maioria das áreas estudadas. Em alguns estados com PR, GO, BA e MG houve uma expressiva dominância de *Paraburkholderia* atingido proporções acima de 96% (figura 17). No estado da BA dez isolados tiveram sequências pertencendo às espécies *P. diazotrophica*, *P. tuberum*, *P. nodosa* e *P. phymatum*, enquanto que em GO, foram as espécies *P. tuberum* e *P. nodosa* as mais frequentes. Estes resultados indicam que os simbiotes nestas regiões do Brasil são mais competitivos, e esta característica pode ser consequência de um processo de especialização de *Mimosa* por rizóbios deste gênero, semelhante do que ocorre nas terras altas do México. Este processo de co-evolução pode estar correlacionado com pressões seletivas exercida pelos

ambientes sobre as populações rizobianas e/ou sobre fisiologia das plantas hospedeiras, tais como baixo regime de chuvas, altas temperaturas e presença de solos ácidos.

A exemplo deste processo, as leguminosas encontradas no deserto Thar, na fronteira da Índia com o Paquistão, desenvolveram uma especialização em nodular preferencialmente por Alfa-rizóbios (GEHLOT et al., 2012). Em outro estudo realizado na mesma região, Gehlot et al. (2013) verificaram que a espécie *M. hamata* foi nodulada exclusivamente por estirpes de *Sinorhizobium sp. (Ensifer)* locais, evidenciando um processo avançado de co-evolução. Nestes casos, os autores sugerem que as características edafoclimáticas do deserto de Thar (pH alcalino e regime chuva menor que 300 mm/ano) foi o fator determinante para a especificidade por um grupo de rizóbio.

Além das *Paraburkholderia*, estirpes de *Cupriavidus* e *Rhizobium* foram bem representados em outros sítios de estudo. Neste novo cenário as espécies de *Cupriavidus* mostraram-se amplamente disseminadas no território brasileiro, ocupando os biomas Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica (Figura 17). Aparentemente estes simbiotes tem uma correlação com a geografia próxima ao litoral brasileiro, sob influência do bioma Mata Atlântica, aparecendo em quatro dos seis sítios estudados e exibindo frequência variando de 2 a 67% (Figura 17).

Do ponto de vista da dispersão destes simbiotes, o Cerrado parece representar uma barreira biogeográfica, uma vez que todas as tentativas de isolamento de *Cupriavidus* na região falharam, inclusive neste estudo. Evidentemente esta afirmação só pode ser realizada após uma análise mais abrangente da diversidade destes organismos, seja nos outros ecossistemas da região central do Brasil, como também da região norte e sul, onde ainda se sabe muito pouco com relação a esta simbiose.

É interessante perceber o fato de estirpes de *Cupriavidus* ser consistentemente encontrado às margens do Cerrado. O primeiro registro da ocorrência deste simbiote na América do Sul foi realizado por Mishra et al. (2012) na Guiana Francesa, posteriormente por Platero et al. (2016) no Uruguai e agora no sudeste do Brasil (DALL'AGNOL et al., 2017; *esta tese*), delimitando assim, as fronteiras de dispersão Norte, Sul e a Leste em relação ao Cerrado.

Outro fato relevante nesta tese, foi a ocorrência expressiva de isolados pertencentes ao gênero *Rhizobium* em RR (38%) e no DF (72%) (Figura 17). Mishra et al. (2012) também haviam encontrados alguns poucos isolados de *R. mesoamericanum* na Guiana Francesa, porém a ocorrência destes simbiotes foi pouco expressiva.



Figura 18. Localização das áreas de estudo com suas respectivas distribuições relativas dos gêneros de rizóbios isolados de *Mimosa* spp. Os quadros abaixo de cada gráfico indicam os dados referentes à quantidade sítios de coleta (sítio), número de espécies de mimosas hospedeiras coletadas (hosp), quantidade de bactérias representantes com sequências de 16S rRNA utilizada com base de cálculo dos gráficos de distribuição (repre), porcentagem de indivíduos representados com base na análise de agrupamento (%); e faixa de pH encontrada em cada estado.

3.6. CONCLUSÕES

- *Mimosa pudica* é capaz de desenvolver uma grande variedade de padrões de nodulação, os quais são produtos das interações com as espécies/estirpes de rizóbios. Em geral as espécies de *Paraburkholderia* produzem nódulos efetivos, assim como todas as espécies de *Cupriavidus*. Já as espécies de *Rhizobium* induz nódulos com sinais de efetividade, mas seus desempenhos na promoção do crescimento vegetal são inferiormente em relação a maioria das as espécies de beta-rizóbios parceiros de mimosas.
- Membros do gênero *Paraburkholderia* constituem os principais simbioses de *Mimosa* no Brasil, sendo dominante na maioria dos biomas estudados, principalmente representando por estirpes da espécie *P. tuberum*.
- *Cupriavidus* encontram-se amplamente distribuídos ao longo do território Brasileiro, com exceção do bioma Cerrado. Além disso, estes isolados não são exclusivamente influenciados pelo pH do solo, sendo encontrados tanto em solos neutro-alcalinos quanto em solos ácidos.
- As estirpes do gênero *Cupriavidus* são filogeneticamente próximas em todo o mundo, sendo sua provável origem das Américas. Contudo, existe diferenças na evolução dos genes simbióticos *nodC* e *nifH* de estirpes da América sul e América central.
- Alfa-rizóbios formam grupos expressivos no Cerrado e ao norte do bioma Amazônia em simbiose com *M. pudica*.

4. CAPÍTULO II

***RHIZOBIUM ALTIPLANIS* SP. NOV. ISOLADO DE NÓDULOS
EFETIVOS EM *MIMOSA PUDICA* CRESCIDAS EM ATÍPICO SOLO
ALCALINO NO BRASIL CENTRAL**

4.1. RESUMO

Os rizóbios foram isolados de nódulos de *Mimosa pudica* L. crescendo em solos neutro-alcalinos do Distrito Federal no Brasil Central. A análise da sequência do gene 16S *rRNA* de dez estirpes colocaram-nas dentro gênero *Rhizobium* próximos a espécies vizinhas (99% de similaridade cada) sendo *R. grahamii*, *R. cauense*, *R. mesoamericanum* e *R. tibeticum* as mais próximas. Esta alta similaridade, no entanto, não se confirmou por análise de sequência Multilocus (MLSA) usando três genes housekeeping (*recA*, *glnII* e *rpoB*), que revelaram que a estirpe CCGE 501^T de *R. mesoamericanum* é a mais próxima com 92% semelhança de sequências ou menos. Dados quimiotaionômicos, incluindo perfis de ácidos-graxos (maioria sendo de C 19: w8c 0 ciclo e Summed Feature 8 C18: 1 w6c), conteúdo de DNA G + C (57,6% mol) e os padrões de oxidação de fontes de carbono sustentaram o posicionamento das estirpes dentro do gênero *Rhizobium*. Os resultados da análise de ANI (Average Nucleotide Identity) diferenciou as novas estirpes das espécies mais próximas de *Rhizobium*, *R. mesoamericanum*, *R. grahamii* e *R. tibeticum* com 89,0, 88,1 e 87,8% de similaridade, respectivamente. Os genes simbióticos essenciais para a nodulação (*nodC*) e fixação de nitrogênio (*nifH*) foram mais semelhantes (99-100%) aos de *R. mesoamericanum*, que também é capaz de nodular espécies de mimosas. Com base nos dados atuais, estas dez estirpes pertencem a uma nova espécie para a qual o nome *Rhizobium altiplani* sp. nov. (BR 10423T = HAMBI 3664T) é proposto.

Palavras-chave: *Rhizobium*. Cerrado. *Mimosa*. Fixação biológica de nitrogênio.

4.2. ABSTRACT

Root nodule bacteria were isolated from nodules on *Mimosa pudica* L. growing in neutral alkaline soils from the Distrito Federal in Central Brazil. The 16S *rRNA* gene sequence analysis of ten strains placed them into the genus *Rhizobium* with the closest neighboring species (each with 99% similarity) being *R. grahamii*, *R. cauense*, *R. mesoamericanum* and *R. tibeticum*. This high similarity, however, was not confirmed by multi locus sequence analysis (MLSA) using three housekeeping genes (*recA*, *glnII* and *rpoB*), which revealed *R. mesoamericanum* strain CCGE 501T to be the closest type strain (92% sequence similarity or less). Chemotaxonomic data, including fatty acid profiles (with majority being C 19:0 cycle w8c and Summed Feature 8 (C18:1 w6c), DNA G+C content (57,6% mol), and carbon compound utilization patterns supported the placement of the novel strains in the genus *Rhizobium*. Results of Average Nucleotide Identity (ANI) differentiated the novel strains from the closest *Rhizobium* species, *R. mesoamericanum*, *R. grahamii* and *R. tibeticum* with 89,0, 88,1 and 87,8% similarity, respectively. The symbiotic genes essential for nodulation (*nodC*) and nitrogen fixation (*nifH*) were most similar (99-100%) to those of *R. mesoamericanum*, another *Mimosa*-nodulating species. Based on the current data, these ten strains represent a novel species for which the name *Rhizobium altiplani* sp. nov. (BR 10423T = HAMBI 3664T) is proposed.

Keywords: *Rhizobium*. Cerrado. *Mimosa*. Biological nitrogen fixation.

4.3. INTRODUÇÃO

Mimosa pudica L. (Mimosoideae, tribo *Mimosae*) é uma leguminosa herbácea perene nativa das américas e amplamente disseminada. Trata-se de uma espécie cuja dispersão é fortemente influenciada pelas atividades humanas (plantas ruderais) podendo se comportar como plantas daninhas crescendo em pastos, beira de estradas, jardins urbanos e áreas perturbadas (BARNEBY, 1991; SIMON et al., 2011). Estas plantas representam importantes fonte de néctar e pólen para abelhas produtoras de mel (MARTINS et al., 2011). Adicionalmente estudos recentes têm demonstrado potenciais usos biotecnológicos destas plantas para fito-remediação do solo contaminados com metais pesados.

Estas plantas apresentam a capacidade de fixar N em associação com rizóbios incomuns para a maioria das leguminosas, e por isso tem sido objeto de muitos estudos nos últimos 15 anos. Vários estudos ao redor do mundo vêm evidenciando que *M. pudica* tem preferência em se associar com rizóbios da subclasse Beta-proteobacteria, representados por espécies nodulíferas de *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* (GYANESHWAR et al., 2011; CHEN et al., 2001; CHEN et al., 2005a; CHEN et al., 2005b; BARRETT; PARKER, 2005; BARRETT; PARKER, 2006; BONTEMPS et al., 2010; DOS REIS JUNIOR et al., 2010; MISHRA et al., 2012; PLATERO et al., 2016; ELLIOTT et al., 2009; LIU et al., 2012; KLONOWSKA et al., 2012; GEHLOT et al., 2013; MELKONIAN et al., 2014).

Alfa-rizóbios do gênero *Rhizobium* é outro grupo de bactérias que também se associam com *M. pudica* (MISHRA et al., 2012; KLONOWSKA et al., 2012). Na maioria das vezes, esta simbiose ocorre em menor expressão e induz a formação de nódulos não-efetivos ou com baixa eficiência em comparação com Beta-rizóbios (BARRETT; PARKER, 2006; ELLIOTT et al., 2009; MISHRA et al., 2012; KLONOWSKA et al., 2012; GEHLOT et al., 2013; MELKONIAN et al., 2014). Para Klonowska et al. (2012) este fato sugere que espécies de *Rhizobium* são simbioses oportunistas para *M. pudica*. Entretanto, existem exceções, tais com estirpes de *Rhizobium etli* que pode nodular efetivamente *M. pudica* (ELLIOTT et al., 2009; MISHRA et al., 2012).

As Savanas Brasileiras, o Cerrado, é reconhecido como o principal centro de diversidade do gênero *Mimosa* (BARNEBY, 1991; SIMON et al., 2011) e ao mesmo tempo como o maior centro de diversidade de *Paraburkholderia* simbióticas, com as quais as espécies de *Mimosa* nativa nodulam quase que exclusivamente, incluindo *M. pudica* (BONTEMPS et al., 2010; DOS REIS JUNIOR et al., 2010). Este cenário se opõe ao segundo maior centro de origem, o México Central, onde espécies de *Mimosa* endêmicas são principalmente noduladas por Alfa-rizóbios (*Rhizobium* e *Ensifer*) (BONTEMPS et al., 2016) e Índia, onde espécies nativas são noduladas de forma efetiva por espécies de *Ensifer* (GEHLOT et al., 2013).

Embora não se conheça exatamente quais atributos da simbiose seja responsável pela a estrutura da comunidade rizobiana em mimosas de diferentes regiões do mundo, algumas características dos parceiros simbióticos e também do solo são apontadas como aquelas que têm maior influência. Dentre estas pode-se citar: capacidade intrínseca dos parceiros envolvidos (genótipos de mimosa e competitividade dos rizóbios), fatores edáficos como pH e fertilidade do solo, e até mesmo a presença de metais pesados no solo (BONTEMPS et al., 2016; ELLIOTT et al., 2009; PLATERO et al., 2016). Bonemps et al. (2016) sustentam a hipótese de que os solos neutro-alcalinos como os do México central, bem como o genótipo foram determinantes para a dominância de alfa-rizóbios intolerantes à acidez, como espécies de *Rhizobium*.

Estudo recente (Capítulo I desta Tese) mostrou que no Brasil, bactérias do gênero *Rhizobium* foram encontradas somente em nódulos de *M. pudica* e representou o grupo de simbioses de mimosa menos frequente. Entretanto, em um solo neutro-alcalino, atípico para Cerrado, estes simbioses foram dominantes e as análises preliminares baseadas na filogenia dos genes 16S *rRNA* e *recA* mostraram que três estirpes representantes do agrupamento DF-G14 indivíduos do Distrito Federal eram distintas de qualquer outra espécie do gênero *Rhizobium*. Assim o objetivo deste capítulo foi realizar uma caracterização polifásica destas estirpes de *Rhizobium* encontrados no planalto central brasileiro, para a descrição de um novo táxon, o qual propõem-se *Rhizobium altiplani* sp. nov.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Área de coleta e análise solo

A descrição de *Rhizobium altiplani* foi realizada com base dez estirpes selecionadas do genótipo DF-G14 (Anexo B) provenientes de nódulos espontâneos de *Mimosa pudica* obtidos de um jardim da sede da Embrapa Cerrados, no Distrito Federal do Brasil (Tabela 9). A área está situada a aproximadamente 1000m acima do nível do mar, na região conhecida como Planalto Central sob as coordenadas 15°43'50.6"S; 47°53'48.1"W. A área constitui um ambiente não-natural composta por árvores de médio porte (5-10 m de altura) e gramíneas rasteiras dentro do perímetro urbano.

Tabela 9. Estirpes de *Rhizobium altiplani* utilizadas para a caracterização polifásica para a descrição da espécie.

Identificação no estudo	Identificação (CRB-JD) [†]	Caracterização morfofisiológica	Caracterização genética
MIM 525	BR 10423 ^T	S	S
MIM 521	BR 10424	NR	S
MIM 531	BR 10425	NR	S
MIM 538	BR 10426	NR	S
MIM 542	BR 10427	S	S
MIM 558	BR 10428	NR	S
MIM 561	BR 10429	NR	S
MIM 566	BR 10430	NR	S
MIM 569	BR 10431	NR	S
MIM 571	BR 10432	S	S

[†] CRB-JD: Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (Embrapa Agrobiologia)

S = Sim; NR = Não realizado.

De acordo com a classificação de Köppen, o clima é Aw com média de precipitação anual de 1668 mm distribuídas em duas estações bem definidas: seca (maio a setembro) e chuvosa (outubro a abril). A temperatura média gira entorno de 22 - 23° C, podendo atingir máximas de 27 ° C e mínimas próximas de 12 °C (Clima-Data, 2017).

As amostras de solo foram coletadas da camada de 0-20 cm e analisadas quanto aos parâmetros de pH, teor de alumínio, composição de macronutrientes (P, K, Ca e Mg) e matéria orgânica do solo, seguindo os procedimentos descritos em Embrapa (2011).

4.4.2. Caracterização morfológica e fisiológica

As estirpes foram repicadas do estoque (Água-glicerol 20%) para placas de Petri contendo meio de cultura YMA (azul de bromotimol), incubadas em estufas bacteriológica tipo B.O.D e após o crescimento da cultura, novamente repicadas para a certificação da purificação das estirpes. Utilizando uma cultura pura de três dias após a repicagem, as estirpes foram caracterizadas morfológicamente considerando os seguintes atributos: tempo de crescimento, pH do meio de cultura, coloração da colônia, forma da colônia, perfil da colônia e produção de Exopolissacarídeos (EPS). Com objetivo de descrição das características, todos os testes foram comparados com as estirpes tipo das espécies mais próximas, neste caso, *R. mesoamericanum* (CCGE 502^T) e *R. grahamii* (CCGE 501^T).

Além da morfologia das colônias, também foi avaliada a capacidade de crescimento sob diferentes condições de pH, temperatura e concentração de sais. Para a avaliação da amplitude de temperatura de crescimento, cada estirpe foi repicada em meio YMA e incubadas sob as temperaturas de 12, 15, 20, 28, 35 e 37°C por um período máximos de dez dias. Os resultados foram obtidos a partir de quatro repetições de cada tratamento estirpe/temperatura, sendo a avaliação do crescimento por meio da observação da massa bacteriana sobre as estrias de repicagem realizadas em quatro campos da placa de Petri.

Para o teste de tolerância às concentrações de sais, as estirpes foram cultivadas em cinco meios de cultura YMA contendo concentrações de 1, 1,25, 1,5, 1,75 e 2 g/L de NaCl₂. Os resultados foram obtidos a partir da média de quatro repetições e após de 3 dias de incubação sob temperatura ótima crescimento (28°C). Foram considerados resultados positivos as estirpes que apresentaram crescimento em pelo menos um campo da superfície do meio inoculado.

A amplitude de crescimento em função do pH foi obtida a partir da inoculação das estirpes em erlenmeyers contendo 20mL de meio de cultura YMA (líquido) ajustados para os pH 4, 6,8, 8 e 10. Utilizou-se suspensões bacterianas preparadas nos mesmos meios utilizados nos testes, sendo a concentração das bactérias ajustadas para a densidade óptica (D.O) de 0,1 em espectrofotômetro a 500nm. Foram preparadas quatro repetições para cada tratamento de estirpe/pH, sendo a inoculação a partir de uma alíquota de 100µL das suspensões. Os erlenmeyers foram incubados em agitador orbital sob rotação de 150rpm e temperatura de 28°C. Após 3 dias foram retiradas alíquotas de 2µL das culturas para avaliar o crescimento por meio do aumento da D.O. Foram considerados crescimento positivos todos as culturas que apresentaram D.O. superior a 0,5.

4.4.3. Caracterização bioquímica

Os perfis de absorção de diferentes fontes de carbono e de atividade enzimática foram obtidos a partir dos kits Biolog GEN2 MicroPlate e API 20NE, respectivamente. Para isso quatro estirpes representativas (BR 10423^T, BR 10424, BR 10427 e BR 10432) foram previamente cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura TY sem indicador de pH por 72h para obtenção de culturas com pouca produção de EPS.

Para obtenção dos perfis de assimilação de fontes de carbono, foram preparadas suspensões bacterianas utilizando tubos contendo fluido inoculante IF (Biolog[®]) até alcançar transmitância de 90% em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de 500nm. Em seguida, alíquotas de 150µL de cada suspensão foram distribuídas nos poços das placas de Biolog GEN2 e encubadas em estufa bacteriológica tipo B.O.D. a 28°C na ausência de luz. Após três dias de crescimento as placas foram lidas em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 550nm. Foram consideradas reações positivas os poços com valores de absorbância 20% superior ao controle negativo em placa.

Para os testes enzimáticos, colônias de bactérias foram transferidas para tubos tipo Falcon contendo 50mL de solução salina estéril a 0,85% (NaCl₂) até atingir o padrão de turbidez 5 na escala McFarland. Estas suspensões foram utilizadas para preencher os poços do Kit API 20NE seguindo as instruções do fabricante. As fitas-testes inoculadas foram incubadas em estufa tipo B.O.D nas mesmas condições descrita para o teste Biolog GEN2.

Os perfis enzimáticos foram complementados com os testes de atividade das enzimas oxidase e catalase. A oxidase foi avaliada realizando esfregaços de bactérias em tiras de papeis filtro e adicionando uma gota de solução de N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilenodiamina para observar a mudança instantânea da coloração (reação positiva). Para a determinação da atividade da catalase uma solução de peróxido de hidrogênio a 10% (v/v) foi adicionada sobre

as culturas bacterianas em placa e observado a formação de bolhas sobre as colônias dentro de 1 minuto, indicando a reação positiva.

4.4.4. Antibiograma

Os perfis de sensibilidade a antibióticos das estirpes foram obtidos a partir dos kits antibiotic sensi-disc dispenser system (Oxoid®) e Biolog GENIII Microplate (Biolog) totalizando treze tipos de antibióticos com diferentes concentrações: Kanamicina (30mg); Ampicilina (10mg; 25mg); Estreptomicina (10mg; 25mg); Eritromicina (15mg; 30mg); Gentamicina (10mg; 30mg); Rifampicina (5mg; 30mg); Clorofenicol (30mg; 50mg); Tetraciclina (10mg; 30mg); Troleadomicina; Rifamicina SV; Minociclina; Lincomicina; Vancomicina (Biolog GENIII plate).

As estirpes foram inicialmente crescidas em tubos Falcon contendo meio de cultura TY líquido durante o período de 48h em agitador orbital a 150rpm e temperatura de 28°C. Estas culturas foram centrifugadas sob baixa rotação (5.000rpm) por 5 minutos e, dentro de uma câmara de fluxo laminar, o sobrenadante foi drenado utilizando uma pipeta estéril. O pellet de células foi ressuscitado adicionando 2mL de solução salina (0,85% NaCl₂) e uma alíquota de 100µl desta suspensão foi adicionada sobre a superfície do meio de cultura YMA (sem indicador) e espalhada utilizando alça de Drigalski estéril. Cada placa foi dividida em quadrantes, onde foram adicionados os discos de um mesmo antibiótico. As placas foram incubadas por 72h e em seguida foram observadas quanto a presença ou ausência dos halos de inibição ao redor dos discos, indicando sensibilidade ou resistência aos antibióticos, respectivamente.

A sensibilidade a Troleadomicina, Rifamicina SV, Minociclina, Lincomicina, Vancomicina foi avaliado a partir de placas de Biolog GENIII observando o crescimento bacteriano nos poços, indicado pela alteração da pigmentação da suspensão inoculada. Os procedimentos para a inoculação das bactérias nas placas foram realizados como descrito para o kit Biolog GEN2 (item 4.2.4), exceto pela substituição do líquido inoculante para IF-A (Biolog).

4.4.5. Caracterização de ácidos-graxos

Os perfis de Ácidos-Graxos (FAME - Fatty Acid Methyl Ester) foram obtidos a partir dos Ácidos Graxos Totais Extraíveis pelo Procedimento Comercial MIDI® (MIDI-FA), visando determinar o perfil qualitativo e quantitativo dos FAMES de cada organismo para comparação com banco dados de outros organismos já descritos. Esta análise foi realizada na unidade da Embrapa Meio Ambiente, com metodologia descrita em Fernandes e Chaer (2010).

Os isolados selecionados foram cultivados em meio de cultura YMA (bromotimol) durante 48h a 28°C para obtenção de células viáveis e estabilizadas em relação à composição dos ácidos graxos. Em seguida, frações do material microbiano (entre 40-50mg) foram transferidas para tubos de ensaio para extração dos FAMES procedendo os processos de saponificação, metilação, separação e lavagem descritos abaixo:

- Saponificação: 1mL de uma base NaOH (3,75M) preparada em água:metanol (1:1, v/v) foi adicionado nos tubos e agitado em vortex por 5 minutos, seguindo de uma incubação em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Os tubos foram resfriados em temperatura ambiente e novamente agitados por 10 segundos. Para potencializar a lise das células e desintegração dos ácidos-graxos da parede celular, uma nova incubação a 100°C foi realizada por mais 25 minutos e novamente resfriada.

- Metilação: Após as amostras serem saponificadas foram adicionados 2mL de reagente de metilação (ácido clorídrico 6,0M e metanol, na proporção de 1:0,85) e mantidos por 10 minutos em banho-maria a 80°C. Ao final desta etapa os ácidos-graxos são convertidos em estéreis de metila (volátil) para posterior análise em cromatografia gasosa.

- Separação: As amostras devidamente metiladas passaram por um processo de separação dos compostos (Fases orgânica e aquosa) adicionando 1,25mL de solvente de extração (hexano). Os tubos foram homogeneizados em agitador orbital a 50rpm por 10 minutos e em seguida a fase orgânica (líquido superior) foi aspirada e transferida para um novo tubo com rosca revestida com teflon.

- Lavagem: Para eliminar ácidos graxos livres e componentes ácidos derivados dos processos anteriores, 3mL de solução básica fraca (0,3M de NaOH) foi adicionada a fase extraída e misturada em agitador orbital a 50rpm por 5 minutos. Ao término, a fase orgânica (líquido superior) foi transferida para frasco de cromatografia (CG vials).

Para identificação dos FAMES, as amostras contidas nos CG vials foram injetadas no cromatógrafo à gás, equipado com coluna cromatográfica (5% bifênil-95% dimetilpolisiloxano, 25 a 30m) e detector de ionização de chama (FID). O equipamento foi programado para promover um incremento de 5°C por minuto a partir de 120°C até atingir 270°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C e 280°C, respectivamente.

Os picos cromatográficos foram identificados com base nas comparações dos tempos de retenção de FAMES microbianos das amostras e de padrões comerciais.

4.4.6. Caracterização das estruturas celulares

As estirpes foram caracterizadas quanto a coloração de Gram, organização celular e motilidade das bactérias através da visualização em microscópio óptico. Cada estirpe foi cultivada em meio TY (líquido) e diluída em solução salina até a concentração 10^{-6} UFC para otimizar a visualização das células. Uma alíquota de aproximadamente 100µL da diluição foi adicionada sobre uma lâmina de microscopia, coberta com uma lamínula e visualizada em microscópio óptico sob a objetiva de 40x.

A motilidade e organização celular foram avaliadas por meio de observação direta, sem a adição de corantes. Para o teste de coloração de Gram, uma porção da cultura foi adicionada a uma lâmina de microscopia, homogeneizadas adicionando uma gota de água destilada e fixadas passando a lâmina rapidamente sobre a chama do bico de Bunsen. Em seguida foram aplicados tratamentos com cristal violeta (1 min), lugol (3 min.), álcool 70% (20 seg.) e safranina (1 min). O excesso de cada reagente foi removido aplicando um jato de água destilada sobre as lâminas. Após a secagem, em temperatura ambiente, as lâminas foram observadas em microscópio óptico sobre objetiva de 40X e 100X com óleo de imersão.

Para um maior detalhamento das estruturas e dimensão das células foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão das células da estirpe BR 10423^T. Esta análise foi realizada no Instituto James Hutton, Escócia, procedendo as etapas de contraste das bactérias para a visualização em microscópio eletrônico de transmissão.

O contraste foi realizado pelo método da gota (“Droplet/Float methods”) (HAYAT; GIAQUINTA, 1970). A estirpe BR 10423^T foi cultivada em meio de cultura TY (sem indicador), durante 3 dias e em seguida foi colocado um tubo cilíndrico de vidro sobre uma colônia isolada. O tubo foi preenchido com aproximadamente 1mL de água destilada estéril, procedendo incubação por 1h para o preparo da suspensão bacteriana. Alíquotas de 50µL foram adicionadas sobre a superfície de grades metálicas (stubs), previamente preparadas com uma película de parafilme, para fixação das bactérias. As grades foram colocadas sobre gotas de acetato de uranila (5% diluído em água destilada) durante 30 minutos e lavadas passando a

superfície das grades sobre gotas de água destilada. A cada etapa de lavagem, o excesso foi removido por meio de absorção utilizando pedaço de papel filtro. As grades foram colocadas sobre uma gota de citrato de chumbo (30 min), procedendo a remoção do excesso como descrito anteriormente. Por fim, as amostras foram transferidas para placas de Petri forradas com papel filtro para secagem do material por um período de 24h a temperatura ambiente.

As grades foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM-1400 e as imagens capturadas por meio da câmera Gatan Orius CCD (4008 x 2672 pixels) acoplada na base do equipamento.

4.4.7. Caracterização molecular

Para a caracterização molecular foram selecionadas dez estirpes do genogrupo DF-G14, incluindo BR 10425^T, BR 10427 e BR 10432 inicialmente analisadas no capítulo anterior. As estirpes foram cultivadas por 48h em tubos Falcon contendo meio de cultura TY, centrifugadas (5.000rpm) e então, submetidas aos procedimentos de extração de DNA utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega[®]), seguindo as recomendações do fabricante.

Os DNA foram amplificados para os genes ribossomal (16S *rRNA*), housekeeping (*recA*, *gyrB*, *rpoB* e *glnII*), gene de nodulação (*nodC*) e fixação de nitrogênio (*nifH*), utilizando o kit de PCR GOtaq polimerase (Promega[®]), seguindo as reações e condições de amplificação em anexo I. A qualidade dos fragmentos amplificados foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (corrida 1h a 90V) utilizando os marcadores 1kb plus DNA ladder e Low Mass DNA Ladder (invitrogen[®]).

Para o sequenciamento, alíquotas de 10 μ L de produtos de PCR foram tratadas com 0,7 μ L de enzima FastAP[™] (Thermo Scientific[®]) e 0,3 μ L de Exo I (Thermo Scientific[®]) e incubadas em termociclador sob as temperaturas de 37°C (15min) e 85°C (20min), para a eliminação dos excessos de primers, dNTPs e grupos fosfatos de proteínas. As reações de sequenciamento foram realizadas em placas de 96 poços, onde os produtos de PCR tratados foram submetidos a uma reação de sequenciamento de 10 μ L contendo: 6,5 μ L de água:PCR (proporção de acordo com tamanho do gene), 1 μ L de primer (10 μ M), 1,5 μ L de tampão 1,5x e 1 μ L de Big Dye (Applied Biosystem). As amostras foram amplificadas procedendo 35 ciclos de desnaturação (96°C, 15seg.), anelamento (50°C, 15 seg.) e extensão (60°C, 4 min).

Para a precipitação dos fragmentos de DNA amplificados foi adicionado 1 μ L de EDTA (125mM) na parede de cada poço, procedendo um spin (10 seg. de centrifugação em rotação progressiva) para a descida do reagente. O mesmo procedimento foi realizado para o acetato de sódio (3M). Em seguida 25 μ L de etanol absoluto foram adicionados em cada poço, sendo realizada uma homogeneização (quatro inversões de placa) e centrifugação. As placas foram incubadas no escuro e sob temperatura ambiente, e após 15 minutos, estas foram centrifugadas por 30 minutos a 3000 rpm com desaceleração lenta, para a preservação do pellet de DNA no fundo de cada poço.

Para a purificação dos fragmentos o sobrenadante foi descartado por meio de inversão da placa e o resíduo foi removido realizando um spin com rotação de 150rpm com placas destampadas e invertidas. Para otimizar a purificação das amostras foi adicionado mais 35 μ L de etanol 70% em cada poço, procedendo uma centrifugação por 15 minutos a 1650 rpm. O sobrenadante e o resíduo de etanol foram eliminados por inversão e centrifugação, como descrito anteriormente e então, as placas foram mantidas abertas, no escuro, por no mínimo 1h para volatização do resíduo de etanol.

Para a obtenção dos eletroferogramas, as amostras foram ressuspensas adicionando 10µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystem) e injetadas no sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems).

As sequências foram editadas utilizando o programa Bionumeric (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.7.1) e depositadas no GenBank sob os números de acessos listados na tabela em anexo I. A reconstrução filogenética foi realizada a partir do alinhamento múltiplo das sequências utilizando a ferramenta ClustalW do programa MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2016) e as árvores filogenéticas foram construídas pelo método estatístico Maximum-Likelihood com cálculo de distância pelo modelo Jukes-Cator (JUKES; CATOR, 1969) com 1000 repetições. Para a análise de sequência multilocus (MLSA) as sequências dos genes housekeeping foram alinhadas individualmente e em seguida, concatenadas utilizando o programa Seaview v.4.0 (GALTIER et al., 2010).

A similaridade entre os genomas da estirpe BR 10423^T estirpes tipo de espécies mais próximas foi realizada através do método ANI (Average Nucleotide Identity). Para isso, amostras de DNA da estirpe BR 10423^T foram sequenciadas pela companhia MacroGen® (Korea) e então pareadas com genomas de *R. tibeticum* (CCBAU 85039^T - JGI Project I), *R. grahamii* (CCGE 502^T - NZ_AEYE000000000) e *R. mesoamericanum* (CCGE 501^T - NZ_CANI000000000) utilizando o programa Jspecies (RICHTER E ROSSELLÓ-MÓRA, 2009).

4.4.8. Experimento de inoculação cruzada com *Rhizobium altiplani* marcada com gene GFP

A estirpe BR 10423^T foi selecionada para ser transformada para expressar o fenótipo verde fluorescente a partir da proteína GFP (GFP – Green Fluorescent Protein). Esta proteína quando excitada por feixes de luz no comprimento de onda de 480nm reflete luz verde fluorescente contrastando com os demais tecidos vegetais, sendo indicada para observação dos processos de nodulação.

Para a transformação da estirpe foram executadas as seguintes etapas:

Obtenção de células viáveis: A estirpe tipo de *Rhizobium altiplani* (BR 10423^T) foi inoculada em erlenmeyers de 250mL contendo 100mL de meio cultura TY e incubadas por 48h em agitador orbital a 28°C e 150rpm. Em seguida, alíquotas de 25ml da cultura foram transferidas para tubos Falcon de 50mL e incubados em gelo a cada procedimento a seguir. Os tubos Falcon foram centrifugados sob baixa temperatura e rotação (4°C; 5000rpm) por 5 minutos para obtenção de células viáveis. O sobrenadante formado foi descartado e as células foram ressuspensas adicionando 25mL de solução diluente (CaCl₂ a 2mM), realizando suaves rotações até formação de uma suspensão homogênea. Os procedimentos de centrifugação e ressuspensão foram repetidos por mais duas vezes para eliminação dos sais livres do meio de cultura, os quais interferem na etapa de eletroporação descrito abaixo:

- Inserção do plasmídeo: O pellet foi ressuspendido em 40mL de solução diluente e alíquotas de 40µl da suspensão bacteriana foram transferidas para cubetas de eletroporação estéreis, juntamente com 1µL de solução de plasmídeo (1ng de DNA plasmidial em 1µL de tampão Tris-EDTA, contendo os genes GFP e de resistência a Kanamicina). As cubetas foram submetidas a um pulso elétrico de 1,8 kV, 25mF, para forçar os plasmídeos adentrarem nas células, sendo a constante de tempo de aproximadamente 5ms.

- Seleção das bactérias transformadas: Após a eletroporação as amostras foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura TY (líquido) e incubadas a 28°C sob agitação de 150rpm durante 24h. Estas culturas foram repicadas em placas de Petri contendo meio de cultura TY com antibiótico Kanamicina (50ppm, Km 50) para seleção das bactérias

que receberam os plasmídeos. A partir das colônias crescidas foram preparadas lâminas de microscopia para a comprovação da fluorescência em microscópio confocal Zeiss 610 sob comprimento de onda de 488nm. As colônias com o fenótipo fluorescente foram mantidas em meio TY ou YMA contendo antibiótico Kanamicina e estocadas em freezer -80°C.

O experimento de nodulação foi realizado para atestar a capacidade nodulífera em diferentes plantas hospedeiras, bem como para observar a disposição das bacteróides no interior dos nódulos. O experimento foi composto por tratamentos inoculados com bactérias selvagens e estirpes transformadas com gene GFP, utilizando como plantas hospedeiras seis leguminosas de cinco tribos distintas: *Mimosa pudica* (Mimoseae), *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris* (Phaseoleae), *Arachis hypogaea* (Dabergenedeae), *Crotalaria juncea* (Crotalarideae) e *Lupinus angustifolium* (Genisteeae).

As sementes de cada espécie foram desinfestadas (imersão em álcool por 30 seg.; hipoclorito 5% por 5 min; sucessivas lavagens com água estéril) e pré-germinadas em meio ágar-água 1%. Para sementes de *M. pudica* foi necessário um tratamento preliminar de quebra de dormência, onde as sementes foram tratadas com ácido sulfúrico concentrado por dez minutos, e em seguida, lavadas com água destilada. Após três dias, as plântulas foram transferidas para um sistema cultivo estéril composto por garrafas longneck de 500mL contendo solução nutritiva de Noris sem nitrogênio (RADL et al., 2014). Nesse sistema, as plantas ficaram suspensas entre duas tiras de papel germintest presas aos gargalos das garrafas que se estendiam até o fundo das garrafas em contato com a solução nutritiva.

A inoculação foi realizada aplicando 1mL de cultura bacteriana crescidas por 48h em meio de cultura YM (contendo aproximadamente 10^9 células) sobre as radículas. As garrafas foram cobertas com sacos plásticos translúcidos e colocadas em câmaras de propagação vegetal sob condições controladas de temperatura (28°C) e luminosidade (sistema Leds Tecnal ajustado para fotoperíodo de 12h de luz).

Após trinta dias, os nódulos foram colhidos e seccionados na espessura de aproximadamente 1mm ou menos, e colocadas sobre lâminas de microscopia contendo uma gota de água destilada e cobertas por uma lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio confocal de varredura Zeiss 610 ajustado para detectar fluorescência de GFP (comprimento de onda 480 nm) utilizando objetivas de 4x, 10x e 40x.

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1. *Mimosa pudica* do Cerrado são noduladas por Alfa-rizóbios

O solo coletado apresentou propriedades químicas atípicas em comparação com as condições naturais dos solos do Cerrado, onde o pH foi de 7,7 e o teor de alumínio (Al) foi pouco expressivo (tabela 10). Tais características podem estar relacionadas ao sítio de coleta que se localiza dentro da sede da Embrapa Cerrado, especificamente, nos jardins da unidade. Assim, atividades como calagem e adubação para a manutenção dos jardins podem ter contribuído para elevação do pH e neutralização do Al^{3+} do solo. O pH é uma propriedade do solo que afeta, direta e/ou indiretamente, o crescimento das plantas e a atividade microbiana, atuando principalmente nas reações que circundam a disponibilizam nutrientes e toxidez dos elementos do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Para a maioria dos nutrientes o pico de disponibilidade ocorre na faixa de pH entre 6 e 6,5, mas a partir de pH 7 estes elementos tendem a sofrer um declínio, sobretudo dos micronutrientes como ferro, manganês, cobre e zinco (MALAVOLTA, 1980). Enquanto que o cálcio, potássio e magnésio, se mantêm constantes.

Embora plantas e micro-organismos possuam mecanismos para tolerar variações pH e até mesmo suportar toxidez de alguns elementos químicos do solo, as alterações drásticas de pH podem resultar em desequilíbrio na estrutura populacional, naturalmente estabelecida ao longo da evolução do habitat (solo). Neste caso, *M. pudica* foi parceiro simbiótico menos afetado, considerando que esta planta é rústica e ocorre em uma ampla faixa de pH do solo (MISHRA et al., 2012; PLATERO et al., 2016; LIU et al., 2011; *Capítulo I desta tese*).

Tabela 10. Análise química do solo onde foram coletados os nódulos de *Mimosa pudica* utilizados para e isolamento de estirpes de *Rhizobium altiplani*.

pH	Al S (cmol _c /d)	H+Al S (cmol _c /d)	Macronutrientes				(M.O.) C S (%)
			P sol (mg/L)	K sol (mg/L)	Mg sol (cmol _c /d)	Ca sol (cmol _c /d)	
7,75	0,005	0,751	1,52	66,00	0,76	8,10	2,43

Por outro lado, a comunidade rizobiana é mais sensível a estas alterações e as variações no equilíbrio do pH natural poderiam trazer vantagens competitivas a diferentes grupos bactérias nodulífera, considerando que cada organismo apresenta uma faixa de pH ótima de crescimento. Estudos realizados no Brasil e em outras partes do mundo mostram que sob uma condição de solo ácido verifica-se uma dominância de espécies *Paraburkholderia* colonizando nódulos de mimosas (DOS REIS JUNIOR et al., 2010; BONTEMPS et al., 2010; LIU et al., 2011; MISHRA et al., 2012). Enquanto que em regiões de solos alcalinos verifica-se há uma participação expressiva de outros microsimbiontes de mimosa, tais como espécies de *Cupriavidus*, *Rhizobium* e *Ensifer* (BONTEMPS et al., 2016; MISHRA et al., 2012; GEHLOT et al., 2013).

Alfa-rizóbios parecem ser beneficiados quando o solo encontra-se na faixa neutra ou neutra-alcalina, tornando-se mais competitivos no processo de nodulação de mimosas. Evidências provenientes do México e Índia, onde os solos estudados foram neutros ou alcalinos, mostram que estes simbiontes são simbiontes dominantes entre espécies de mimosas endêmicas (BONTEMPS et al., 2016; GEHLOT et al., 2013). Contudo, entre as espécies invasivas, como por exemplo *M. pudica*, constata-se que alfa-rizóbios são os

parceiros menos frequente e geralmente estabelecendo uma relação simbiótica de baixa eficiência (KLONOWSKA et al., 2012). Em um estudo desenvolvido com 221 simbionte de *M. pudica* da Guina Francesa, Mishra et al. (2012) encontraram apenas quatro isolados pertencentes ao gênero *Rhizobium*, os quais foram provenientes de solos com pH 7,04.

Surpreendentemente, dos 128 isolados obtidos de *M. pudica* do Distrito Federal, 80 pertencem ao gênero *Rhizobium*. Com estes dados, é possível perceber que o pH de fato tem influência sobre a ocupação de nódulos diferentes gêneros de rizóbios, entretanto vale ressaltar a existência de outros fatores envolvido que poderiam contribuir com a competitividade de *Rhizobium*.

De acordo com os resultados de Melkonian et al. (2014) e Elliott et al. (2009), tanto o genótipo da planta hospedeira, quanto o teor de N estão envolvidos na alternância de dominância de simbiontes em mimosa. Neste caso a MOS poderia servir como fonte de N (húmus, aminoácidos e outros compostos) para a comunidade do solo, alterando o balanço da ocupação dos nódulos. Quanto ao K e Ca, pouco se conhece sobre a influência destes elementos na competitividade dos rizóbios pela planta hospedeira, porém o Ca^{+2} está envolvido, indiretamente, no reconhecimento dos parceiros simbióticos durante o estágio pré-nodular, através dos chamados “picos de cálcio” durante a infecção dos pelos radiculares (FRUGIER et al., 2008). No solo de origem de *R. altiplani* foi detectado níveis de K, Ca e M.O. acima do se espera para um solo do Cerrado e acidez praticamente nula (Tabela 10). Desta forma, neste sítio poderia estar sendo estabelecido um micro-habitat, com a consequente alternância de rizóbios dominantes.

4.5.2. Propriedades fenotípicas de estirpes de *R. altiplani*

As estirpes apresentaram crescimento rápido com tempo médio de dois a três dias quando cultivados em meio de cultura YMA a 28°C. Neste meio elas formaram colônias circulares, convexas, opacas, de coloração amareladas, com abundância na produção de EPS. Este resultado se assemelha bastante com as características culturais das estirpes de *R. mesoamericanum* e *R. grahamii* cultivadas em meio PY (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2012), exceto pela divergência quanto a produção de EPS. Este fato, provavelmente se deve às fontes de carbono utilizadas em cada meio. De fato, quando estas estirpes tipo (CCGE 501^T e CCGE 502^T) foram cultivadas em meio YMA, a produção de EPS foram mais expressivas, sendo semelhante as verificadas entre as estirpes de *R. altiplani*.

Adicionalmente as estirpes de *R. altiplani* foram cultivadas em meio de cultura TY, onde as características foram essencialmente as mesmas reportadas para o meio YMA, exceto pela redução na produção de EPS e a ocorrência de dimorfismos das colônias das estirpes BR 10427, BR 10425, BR 10431 e BR 10432. Para estas estirpes foram encontrados pequenos grânulos no centro das colônias isoladas. Entretanto, quando as culturas foram comparadas por meio dos perfis de Box-PCR com as outras seis estirpes, verificou-se que todas eram geneticamente idênticas (Figura 18).

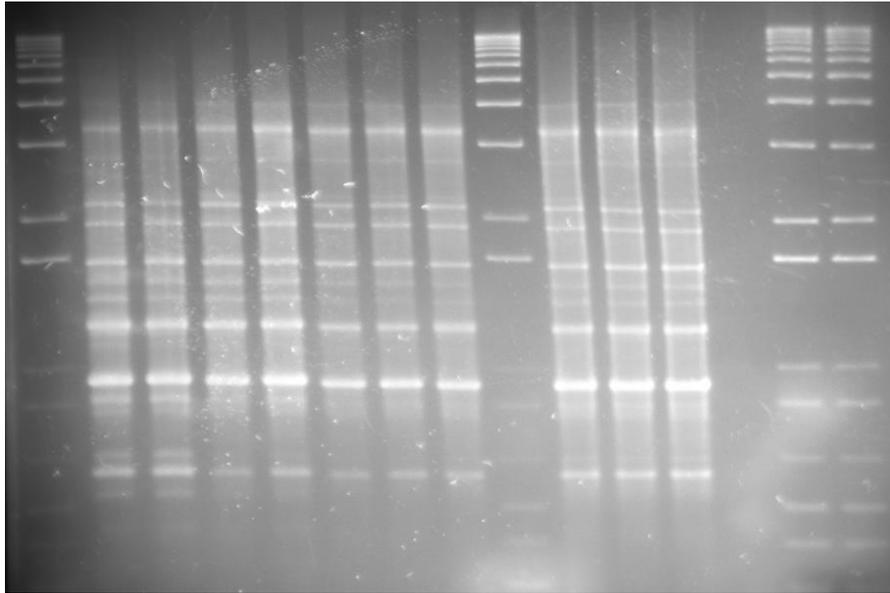


Figura 19. Perfis de Box-PCR das dez estirpes utilizadas na caracterização molecular de *R. altiplani*. Linhas 1, 9, 14 e 15 são os marcadores 1 kb plus ladder. Linha 13 constitui o controle negativo das reações. Linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 e 12 perfis de bandas gerado a partir de colônias com e sem dimorfismo.

Os aspectos celulares foram observados por microscopia óptica e eletrônica de transmissão, onde foi constatado que as estirpes de *R. altiplani* apresentam formato de bastões, com presença de três flagelos que são utilizados na motilidade. As dimensões das células foram de aproximadamente 1,5 x 0,4 μm (Figura 19), e quando submetida a coloração de Gram, estas obtiveram coloração vermelha, indicando pertencer ao grupo de bactérias Gram negativas.



Figura 20. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de célula de *R. altiplani*. As setas indicam a presença de três flagelos polarizados. Barra de escala 0,5 μm .

Quando cultivadas sob diferentes temperaturas verificou-se que a amplitude térmica de crescimento das quatro estirpes de *R. altiplani* ficou entre 12 e 35°C. A temperatura ótima crescimento foi de 28°C, exibindo crescimento em todos campos da placa em apenas 2 dias (Tabela 11). Enquanto que a 12°C as estirpes demoraram mais de 5 dias para obter crescimento apenas no primeiro campo da placa, o qual possui uma maior concentração de células. Resultados semelhante também foram observados no outro extremo de temperatura, porém ao invés de retardar o crescimento observou-se que as estirpes tiveram crescimento significativamente inferior em relação à temperatura ótima. De modo geral, os perfis das estirpes de *R. altiplani* foram iguais aos observados para as estirpes tipo, exceto pelo fato de *R. grahamii* ter sido capaz de se desenvolver na temperatura de 37°C (Tabela 11). A temperatura é um fator que afeta a velocidade do metabolismo celular, assim as baixas temperaturas reduzem a respiração das bactérias, afetando por exemplo a assimilação de nutrientes e a replicação das células (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Por outro lado, temperaturas muito altas podem prejudicar a conformação proteicas, reduzir as atividades de enzimáticas, além de acelerar a senescência celular (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Com relação ao pH, as estirpes de *R. altiplani* e estirpes tipo apresentaram crescimento ótimo em pH neutro-alcálico (6,8 – 8). Esta condição se assemelha bastante ao pH do solo de origem das estirpes *R. altiplani*, evidenciando que sob estas condições estas bactérias tendem a se manter mais ativas. Entretanto, as condições artificiais do meio de cultura são bastante divergentes em relação àquelas encontradas no solo. Primeiro, as concentrações de nutrientes, principalmente de carbono e nitrogênio disponível no solo são muito menores em relação às encontradas em condições *in vitro*. Segundo, o sistema solo-planta-bactéria é muito dinâmico e além dos fatores abióticos, os demais microrganismos presentes no solo estabelecem diversas relações ecológicas, como por exemplo a competição por nutrientes, que podem alterar a densidade da população de uma determinada espécie de bactéria (MELKONIAN et al., 2014).

Quando cultivadas em pH 10, as bactérias apresentaram crescimento satisfatório, porém a densidade de bactérias foi menor em relação ao resultado verificado nos ensaios a pH 6,8 e 8. Após cinco dias de cultivo verificou-se que todas estirpes modificaram o pH do meio para uma faixa pouco abaixo de 8. Este fato pode estar relacionado a formação e liberação de substâncias ácidas, como o ácido pirúvico, e prótons de hidrogênio (H⁺) durante a respiração celular para o meio de cultura. Contudo, as estirpes de *R. altiplani* não cresceram em pH 4, diferindo das duas estirpes mexicanas, das quais foram observados um leve crescimento (Tabela 11). Segundo Bontemps et al. (2016), o gênero *Rhizobium* é sensível ao pH ácido, sendo mais expressivos na faixa de pH neutro.

Tabela 11. Perfis fisiológicos de estirpes de *Rhizobium altiplani* e estirpes tipo de *R. grahamii* e *R. mesoamericanum* sob diferentes faixas de temperatura, pH e concentrações de NaCl após 5 dias de cultivo. 1 = BR 10423^T; 2 = BR 10424; 3 = BR 10427; 4 = BR 10432; 5 = CCGE 501^T; 6 = CCGE 502^T.

Tratamentos	Estirpes					
	1	2	3	4	5	6
Temperatura (°C)						
12	L	L	L	L	L	L
15	+	+	+	+	+	+
20	++	++	++	++	++	++

Continua...

Continuação da Tabela 11.

Tratamentos	Estirpes					
	1	2	3	4	5	6
Temperatura (°C)						
28	+++	+++	+++	+++	+++	+++
35	F	F	F	F	+	F
37	-	-	-	-	F	-
Ph						
4	-	-	-	-	+	+
6,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10	++	++	++	++	++	++
Concentrações de NaCl (%)						
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1	+++	+++	+++	+++	+	+
1,25	++	++	++	++	+	+
1,50	+	+	+	+	-	F
1,75	+	+	+	+	-	-
2	F	F	F	F	-	-

(+) Crescimento positivo; (-) Crescimento negativo; (L) Crescimento lento; (F) Crescimento fraco.

As maiores diferenças fisiológicas foram encontradas quanto a tolerância às concentrações de NaCl. As estirpes de *R. altiplani* cresceram em todos os tratamentos testados sendo observado uma redução gradual no desenvolvimento a medida que foram aumentadas as concentrações até atingir o limite de 2% de salinidade. Enquanto que para as estirpes CCGE 501^T e CCGE 502^T a concentração de 1% de NaCl resultou em uma drástica redução no crescimento microbiano (tabela 11). Quando cultivadas em meio contendo 1,25% mantiveram os mesmos resultados que à 1%, mas na concentração de 1,5% de salinidade a estirpe de *R. mesoamericanum* teve seu crescimento limitado ao primeiro campo da placa, enquanto que *R. grahamii* foi incapaz de se desenvolver. As concentrações de sais afetam significativamente a população microbiana do solo. Entre os organismos intolerantes, como é o caso da estirpe de *R. grahamii*, os sais alteram o equilíbrio osmótico das células fazendo com que estas se desidratem e se tornem inviáveis. Entretanto, alguns microrganismos possuem mecanismos de tolerância. Segundo Graham (1992) a tolerância ao estresse salino pode ser atribuída as variações de pH, fonte de carbono solúvel e à presença de solutos osmoprotetores. Algumas bactérias halotolerantes conseguem tolerar concentrações de sais de 5 a 10% superior a salinidade encontrada no mar (MADIGAN et al., 2016). Para isto, elas possuem proteínas transportadoras de íons de K para equilibrar o balanço osmótico entre o ambiente e o citoplasma, evitando assim a lise celular (MADIGAN et al., 2016).

No teste de antibiograma a partir do cultivo com discos de impregnados com antibióticos, as estirpes de *R. altiplani* apresentaram perfis de sensibilidade a kanamicina, ampicilina, streptomina, gentamicina, rifampicina, clorofenicol, tetraciclina, enquanto que a resistência foi observada apenas para eritromicina. Perfil semelhante foi observado para estirpe CCGE 501^T, exceto pela sensibilidade ao antibiótico eritromicina na concentração de 30mg. A estirpe CCGE 502^T diferiu de todas as outras por ser capaz de crescer na presença de ampicilina. Adicionalmente os perfis das estirpes de *R. altiplani* foram complementados com antibióticos presentes nas placas de Biolog GenIII, onde verificou-se que as estirpes apresentaram resistência a troleadomicina, rifamicina, lincomicina e vancomicina.

Minociclina foi o único antibiótico que limitou o crescimento das estirpes neste teste (Anexo G).

A composição dos ácidos graxos (AG) foi coerente com o perfil característico para o gênero *Rhizobium*, ou seja, a fração de AG 16:0 relativamente baixa, não passando de 10%, enquanto que o 19:0 ciclo ω 8c constitui a maior fração dentre os AG determinado. De maneira geral os perfis das estirpes de *R. altiplani* foram semelhantes ao de *R. mesoamericanum*, diferindo basicamente no valor do ácido graxo 16:0 3OH, sendo a estirpe CCGE 501^T apresentou somente quantidades traços (tabela 12 e anexo F).

Interessantemente ambas as espécies compartilham os mesmos simbiontes e a composição dos AG, podendo ser um dos fatores responsáveis pela compatibilidade destes simbiontes com as leguminosas hospedeiras (LÓPES-LÓPES et al., 2012; MISHRA et al., 2012, *Este estudo, seção 4.3.5*). Segundo Broughton et al. (2003) além dos fatores de nodulação, outros elementos da superfície celular bacterianas, como exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos antígeno K e β -glucano cíclico ancorados na membrana, são importantes nos primeiros estágios da nodulação (FRAYSSE et al., 2003; LAUS et al., 2006; DOWNIE, 2010; SKORUPSKA et al. 2006; BECKER et al., 2005). Para Broughton et al. (2003), estes componentes podem servir para o reconhecimento dos parceiros simbióticos durante a formação do tubo infecção. No início da nodulação, plantas e bactérias passam a se comunicar através de trocadas de sinais moleculares que desencadeia uma série de respostas em ambas as partes, tornando os parceiros mais susceptíveis ao estabelecimento da simbiose. Uma dessas respostas ocorre justamente quanto alterações nas características dos antígenos superficiais dos rizóbios na presença de exsudatos radiculares (FRAYSSE et al. (2002).

Com relação a estirpes CCGE 502^T, diferenças significativas foram verificadas nas frações de 17:0 ciclo, 18:00 e 19:0 ciclo ω 8c. *R. grahamii* foi a única espécie com quantidades detectáveis da fração 17:0 ciclo, enquanto que 18:0 foi em média 40% inferior aos demais perfis e 19:0 ciclo ω 8c foi cerca de 200 e 177% superior as médias das estirpes de *R. altiplani* e *R. mesoamericanum*, respectivamente (anexo F).

Quanto a oxidação (assimilação) de fontes de carbono, verificou-se que as estirpes de *R. altiplani* foram capazes de assimilar todas as fontes de carboidratos, exceto *i*-Eritritol. Resultado semelhante foi obtido pela estirpe de *R. mesoamericanum*. A principal diferença ficou por conta do metabolismo de assimilação xilitol e N-acetil-D-galactosamina, os quais as estirpes de *R. altiplani* apresentaram reações negativas. A estirpe de *R. grahamii* foi a única a utilizar todas as fontes de carboidratos (Anexo E).

Tabela 12. Resumo das características fenotípicas diferenciais entre as estirpes de *Rhizobium altiplani* e estirpes tipo de espécies correlacionadas. 1 = BR 10423^T; 2 = BR 10424; 3 = BR10427; 4 = BR 10432; 5 = CCGE 501T (*R. mesoamericanum*); 6 = CCGE502^T (*R. grahamii*).

Características	1	2	3	4	5	6
<i>Utilização de fontes de carbono</i>						
N-acetil-D-Galactosamina	+	+	+	+	-	+
<i>i</i> -Eritritol	-	-	-	-	-	+
β -Metil-D-Glucoside	F	F	F	F	+	+
Malato	+	+	+	+	+	-

Continua...

Continuação da Tabela 12.

Características	1	2	3	4	5	6
Utilização de fontes de carbono						
ácido D-Glucosamínico	-	-	-	-	+	-
Ácido Cítrico	-	-	-	-	+	-
Ácido cis-Aconítico	+	+	+	+	+	-
Ácido D.L-Láctico	F	F	F	+	-	F
Ácido Quínico	F	F	-	F	+	-
L-Alanina	-	-	-	-	-	F
Ácido L-Aspártico	F	F	F	+	F	-
Ácido γ -Aminobutírico	F	-	F	F	-	-
L-Asparagina	F	F	F	+	-	-
Atividade enzimática						
Nitrato e nitrito redutase	-	-	-	-	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	-
Oxidase	-	-	-	-	-	+
Ampicilina (10 mg)	-	-	-	-	-	+
Eritromicina (15 mg)	-	-	-	-	+	+
Eritromicina (30 mg)	-	-	-	-	-	+
Ácido Graxo						
C _{16:0 3OH}	2.1	2.0	1.8	2.0	Traço	2.3
C _{19:0} ciclo w8c	20.8	13.9	13.2	12.3	16.8	29.8
Condições de crescimento						
Temperatura (°C)	12 – 35	12 – 35	12 – 35	12 – 35	12 – 37	12 – 35
pH	6.8 – 10	6.8 – 10	6.8 – 10	6.8 – 10	4 – 10	4 – 10
Tolerância NaCl (%)	1.0 – 2.0	1.0 – 2.0	1.0 – 2.0	1.0 – 2.0	1.0 – 1.25	1.0 – 1.5

(-) Negativo; (+) positivo; (F) reação fraca.

Na avaliação das fontes de ácido carboxílico, o resultado foi oposto ao observado para os carboidratos, ou seja, as estirpes foram incapazes de assimilar a maioria dos substratos-testes (Anexo E). Contudo, os perfis foram mais informativos para a distinção das espécies. Assim as estirpes de *R. altiplani* diferiu de *R. mesoamericanum* por não oxidar ácido cítrico, ácido fórmico e ácido D-glucosamina, mas apresentou reação positiva ácido D.L-láctico. As estirpes de *R. grahamii* e *R. altiplani* foram capazes de assimilar ácido cis-Acônico e ácido quínico, enquanto CCGE 502^T não obteve crescimento. Ácido succínico foi o único ácido carboxílico oxidado por todas as estirpes (Anexo E).

Vinte e quatro fontes de aminoácidos foram testadas, destas, treze foram utilizados por pelo menos por uma estirpe, sendo que o ácido L-glutâmico, L-histidina, hidroxil-L-prolina, L-ornitina, L-prolina e ácido urocônico foram assimilados por todas as estirpes (Anexo E). *R. altiplani* foi a única espécie que utilizou foi L-asparagina e ácido γ -aminobutírico, enquanto que L-Alanina, D.L-carnitina foram unicamente utilizadas por *R. grahamii* e *R. mesoamericanum*, respectivamente.

As fontes de carbono proveniente de polímeros, álcoois, ésteres, amina, amida, elementos bromados e fosfatados foram menos reativas. Nenhum composto fosfatado ou amínicos foram assimilados, enquanto duas estirpes de *R. altiplani* apresentaram reações fracas para amida L-alamina. Todas as estirpes assimilaram ácido succínico bromo. Dentro dos

polímeros, dextrina foi a única fonte com reação positiva, exceto para estirpe de *R. mesoamericanum*. Perfis semelhantes foi observado para os ésteres metil piruvato e mono-metil succinato. Os resultados estão mais detalhados estão em Anexo E.

Testes enzimáticos mostraram que *R. altiplani* possui atividade das enzimas uréase, b-glucosidase e catalase, enquanto que a redução nitrato e nitrito, produção de indol, fermentação da glicose e arginina. Di-hidrolase, uréase e oxidase não foram detectados após três dia de incubação a 28°C. Estes mesmos resultados também foram constatados na estirpe de *R. mesoamericanum*. O perfil da estirpe *R. grahamii* foi bem contrastante com as demais estirpes testadas, sendo a única com metabolismo de redução de nitrato, nitrito e com atividade da enzima oxidase, e sem atividade catalase.

4.5.3. Filogenia da espécie *R. altiplani*

Dez bactérias representantes do grupo DF-G14 foram utilizadas para o estudo filogenético do gene 16S rRNA. Foram obtidos fragmentos de 1356 bp, sendo 1011 (74,4%) bases conservadas e 292 (21,5%) sítios de variação. Estas sequências foram alinhadas juntamente com sequências de 16S rRNA de estirpes tipo de todas as espécies de *Rhizobium* para avaliar as similaridades entre as espécies. Os resultados mostraram que as espécies *R. grahamii* (CCGE 502^T), *R. mesoamericanum* (CCGE501^T), *R. tibeticum* (CCBAU 85039^T), *R. metallidurans* (ChimEc512^T) e *R. cauense* (CCBAU 101002^T) foram as espécies mais próximas, compartilhando cerca de 98% dos nucleotídeos com as dez estirpes de mimosa (Anexo K). Quando analisadas através da filogenia Maximum-likelihood, as estirpes de *R. altiplani* formaram um grupo distinto de qualquer outra espécie de *Rhizobium* já descrita, sendo a confiabilidade dos agrupamentos verificada pelos altos valores de Bootstrap (80%). Embora o gene 16S rRNA seja bastante conservado entre espécies e, em geral, tem pouco poder de distinção ao nível de espécie, os resultados apontam que as dez estirpes analisadas pertençam a um novo clado (Figura 20).

Para uma distinção mais evidente foi realizada uma análise de sequência multilocus (MLSA) com base nas sequências dos genes *glnII* (534 bp), *recA* (418 bp) e *rpoB* (408 bp). A partir do pareamento múltiplo das sequências verificou-se que os sítios de variação de nucleotídeos ficaram em torno de 28,6 e 30%, o que se refletiu em um maior poder de discriminação dos táxons. Segundo (MENNA et al., 2009) os genes housekeeping são codificantes de proteína/enzima vitais para o metabolismo das bactérias, atuando por exemplo, na replicação e transcrição do DNA, e por isso se manteve relativamente conservado ao longo da evolução. Apesar disso, estes genes exibem mais variações em relação ao 16S rRNA, tornando-se ideais para a discriminação de espécies próximas. Os resultados estatísticos das sequências confirmam àqueles obtidos anteriormente por Menna et al. (2009), onde foram verificadas variações nos genes housekeeping entorno de 28% contra apenas 7% do 16S rRNA. Entretanto os sítios de variações do gene 16S rRNA para o gênero *Rhizobium* foram expressivamente mais altos em relação apresentados no estudo anteriormente citado, alcançando 21,5%, sendo este semelhante aos obtidos para as sequências de genes housekeeping. Isto explica a semelhança entre as topologias das árvores filogenéticas obtidas.

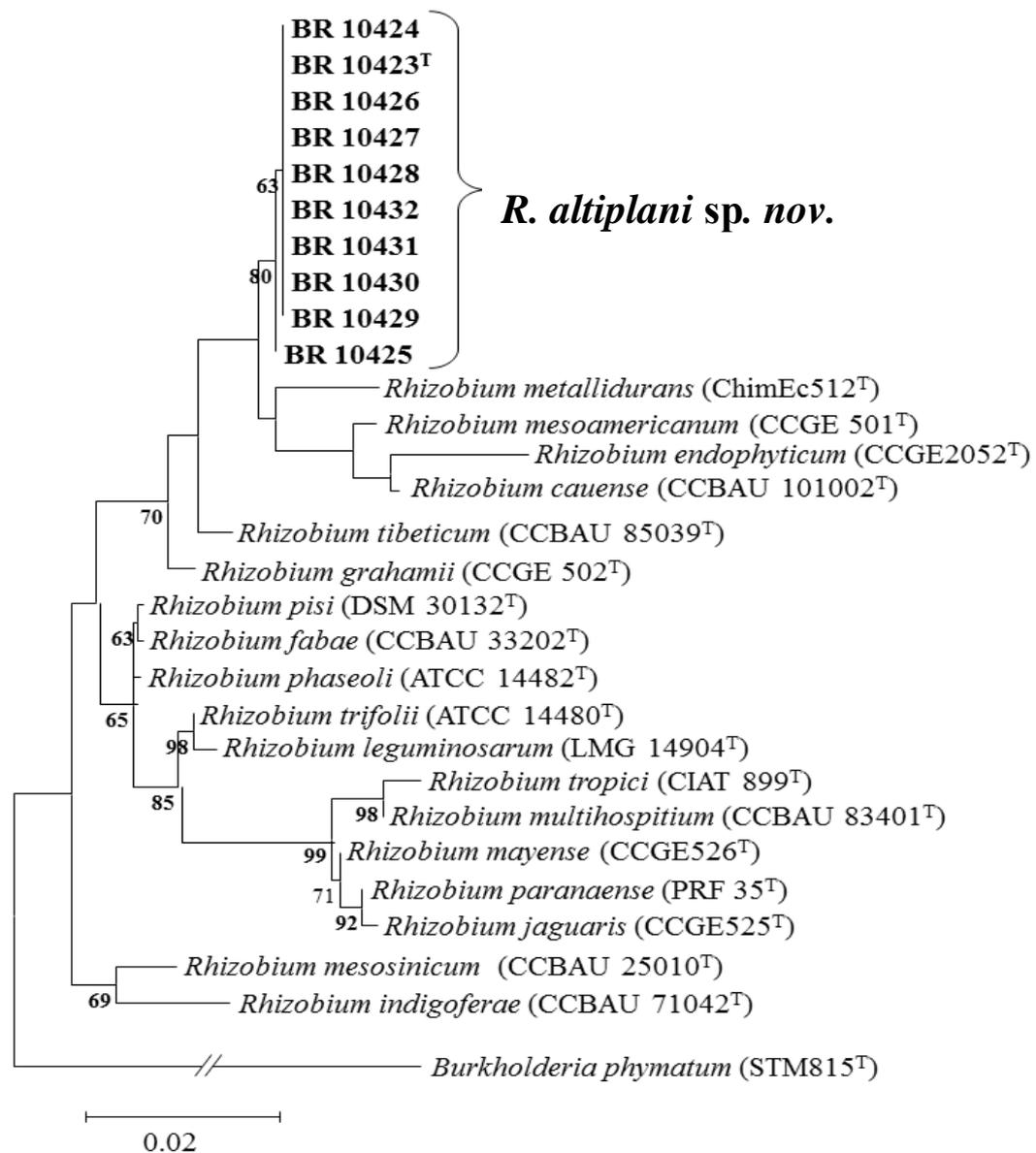


Figura 21. Filogenia Maximum-likelihood baseada em seqüências parciais do gene 16S rRNA mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp. nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (< 60%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo J.

As espécies mais próximas das dez estirpes de *R. altiplani* (*R. grahamii*; *R. mesoamericanum* e *R. tibeticum*) compartilharam menos de 91, 88 e 92% de pareamentos dos nucleotídeos para os genes *glnII*, *recA* e *rpoB*, respectivamente (anexo K). *R. tibeticum* não foi incluída na filogenia do gene *rpoB*, pois não havia seqüência de estirpe tipo depositada no GenBank. Apesar disso, as filogenias dos outros dois genes mostraram que esta espécie está posicionada bem distante das dez estirpes de mimosa.

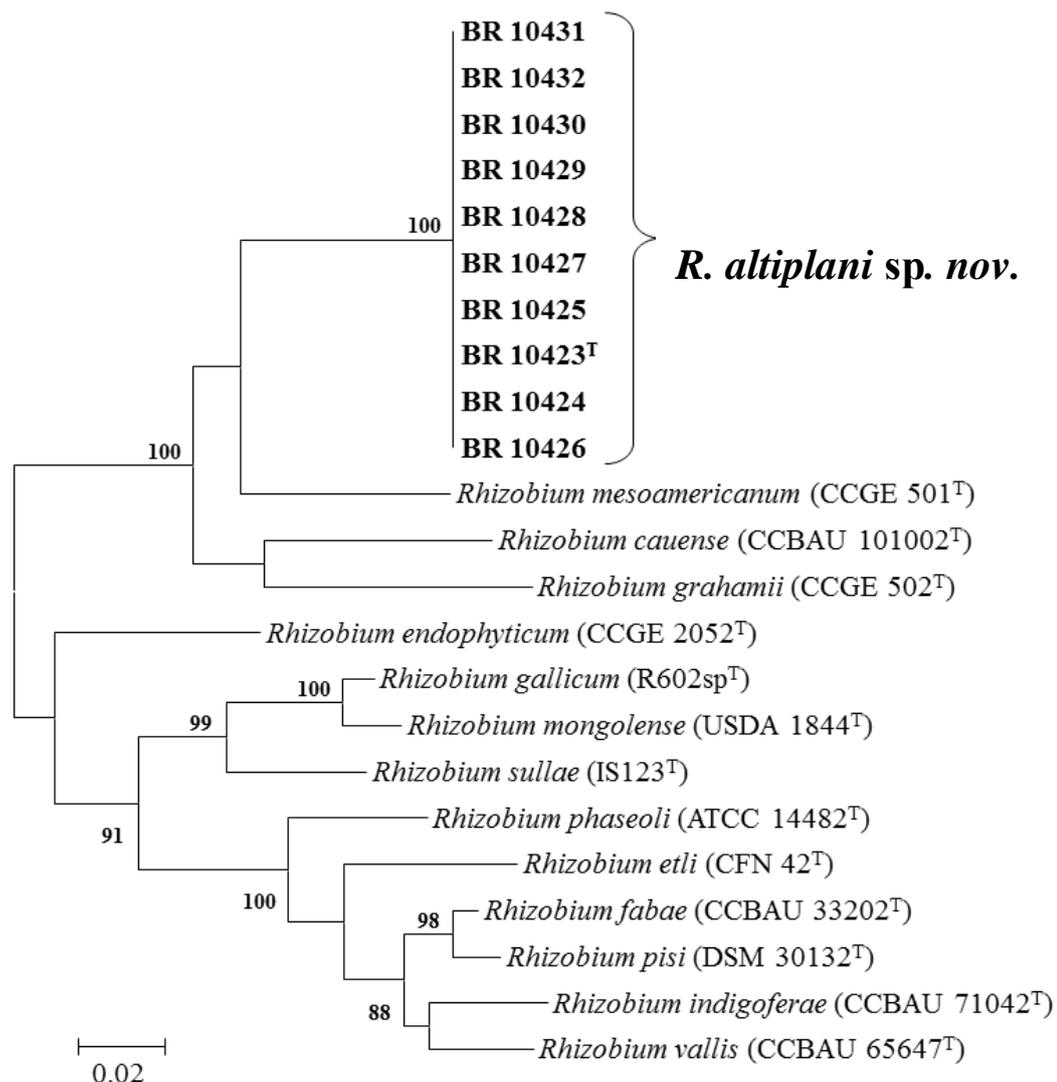


Figura 22. Filogenia Maximum-likelihood baseada em seqüências parciais concatenadas dos genes *recA*, *glnII* e *rpoB* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp. nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (< 70%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos.

As divergências também foram analisadas a partir das árvores filogenéticas de cada locus gene (anexo L, M e N), onde se observou que as estirpes de *R. altiplani* formaram grupos bastante consistentes e distinto de qualquer estirpe tipo de *Rhizobium*, sendo os resultados de agrupamento suportado por bootstrap de 100%. A estirpe de *R. cauense*, que foi a mais próxima nas análises dos genes *recA* e *rpoB* com 90 e 92% de identidade (Anexo K). Enquanto, que *R. mesoamericanum* foi o mais próximo na comparação do gene *glnII* com 90% de identidade.

Como as topologias das árvores filogenéticas de cada locus gene foram semelhantes foi possível realizar a concatenação dos genes (figura 21). As seqüências concatenadas e alinhadas resultaram em fragmentos de 1064 nucleotídeos com cerca de 747 (70,2%) sítios conservados e 317 (29,8%) de sítios de variação, sendo 239 referente a substituições de nucleotídeos em duas ou mais seqüências (Pi – Parsim-informative sites) e 78 substituições

ocorrendo em um único sítio (S - Singleton site). Na árvore concatenada, as novas estirpes de *Rhizobium altiplani* apresentaram 100% de identidade entre ela, ratificando os resultados obtidos na filogenia do gene 16S rRNA. Enquanto as espécies mais próximas não passaram dos 89% de identidade, sendo a estirpe tipo *R. mesoamericanum* a mais próxima (Figura 21).

As divergências filogenéticas observadas através das análises do gene 16S rRNA e MLSA foram novamente confirmadas a partir do pareamento dos genomas (ANI_b e ANI_m) da estirpe BR10423^T com estirpes tipo de *R. grahamii*, *R. mesoamericanum* e *R. tibeticum*. Independentemente da estirpe comparada, a identidade ficou abaixo de 90% (tabela 13). Com o aumento do número de sequenciamento de genomas bacterianos completo, esta técnica tem se tornado cada vez mais utilizadas para distinção de espécies próximas em substituição a técnica padrão de hibridização DNA-DNA (HDD). Segundo Goris et al. (2007) a comparação por meio de ANI é correlacionada com HDD, onde o ponto de corte 70% de HDD corresponde a 95% de identidade em ANI. Assim, segundo os mesmos autores, organismos que apresentam genomas com valores superiores a 94% de identidade podem ser considerados da mesma espécie.

Em geral, o genoma da estirpe BR 10423^T foi composto por 8.0 Mb, sendo identificadas cerca de 7328 proteínas codificantes. Com relação as bases nitrogenadas, verificou-se que 59,5% correspondiam a soma das bases citosina e guanina (CG%), sendo este valor semelhante aos encontrados nos genomas de *R. grahamii* e *R. mesoamericanum* e *R. tibeticum* (tabela 13). Informações adicionais do genoma de BR 10423^T podem ser encontradas no GenBank sob o número de acesso NZ_LNCD000000000.

Tabela 13. Comparação do genoma de *Rhizobium altiplani* (BR 10423^T) com estirpes tipo de *Rhizobium mesoamericanum* (CCGE 501^T), *Rhizobium grahamii* (CCGE 502^T) e *Rhizobium tibeticum* (CCBAU 85039^T) a partir do método de ANI.

Estirpe Tipo	CG%	ANI _b	ANI _m
<i>Rhizobium mesoamericanum</i>	58,9 [†]	88,4	89,8
<i>Rhizobium grahamii</i>	59,4 [†]	85,3	88,1
<i>Rhizobium tibeticum</i>	59,7 [‡]	85,4	87,8

[†] Dados obtidos de López-López et al. (2012); [‡] Dados obtidos de Hou et al. (2009).

4.5.4. Filogenia de genes simbióticos da espécie *Rhizobium altiplani*

Com relação aos genes simbióticos *nifH* e *nodC* verificou-se que as estirpes de *R. altiplani* apresentaram sequências idênticas ter si, sendo o resultado confirmado pelos bootstrap de 98 e 100%, respectivamente.

A análise do *nodC* foi baseada em fragmentos de 432 bp, sendo mais da metade (60,1%) sítios com substituições de nucleotídeos. O pareamento das sequências e os agrupamentos gerado pela árvore Maximum-likelihood evidenciaram a formação de seis grandes grupos. No primeiro ficaram reunidas genes *nodC* de *R. altiplani* e estirpes tipo de *R. mesoamericanum*, com sequências idênticas, e mais outras duas estirpes de *R. grahamii* e *R. hainanense*, que formaram um subgrupo com 93,7% de similaridade em relação as de *R. altiplani*. Este resultado se assemelha aos encontrados por López-López et al. (2012), onde as espécies tipo citadas apresentaram cerca de 1% de divergência filogenética para o gene *nodC*. Por outro lado, as demais estirpes dos outros grupos continham sequências de gene *nodC* bem distantes em relação aos membros do primeiro grupo, alcançando menos de 70% de identidade (Anexo K).

O fato mais intrigante ficou por conta das sequências de *nodC* das dez estirpes serem compartilhada pela estirpe tipo de *R. mesoamericanum*. Neste caso, duas hipóteses podem explicar esse resultado: 1. Ambas as espécies herdaram o gene *nodC* de um ancestral comum e este permaneceu inalterado ao longo da evolução das espécies; 2. Ocorrência de transferência horizontal de *R. mesoamericanum* para *R. altiplani*, ou vice-versa. A pouca variabilidade das sequências de *nodC* verificada entre as estirpes do primeiro grupo sugere uma transmissão vertical dos genes e uma origem comum recente, suportando a primeira hipótese. Entretanto genes contidos em cromossomos plasmidiais ou em ilhas simbióticas podem ser transferidos horizontalmente, sendo um dos mecanismos existente para aquisição de habilidade nodulífera (LAGUERRE et al., 2001). Moulin et al. (2001) evidenciaram diferentes origens para o gene *nodA* de estirpes de *Paraburkholderia tuberum* proveniente da África e Américas, sendo, provavelmente, o da estirpe africana obtido por transferência horizontal de genes, uma vez que este se assemelha mais com sequências de *nodA* de espécies de *Bradyrhizobium*.

Estes resultados além de apontar a transferências de genes simbióticos, revelam a não congruência com a filogenia baseada em genes conservados, como o 16S rRNA e genes housekeeping (LAGUERRE et al., 2001). Deste modo, a história evolutiva das espécies de rizóbios pode ser divergente com história evolutiva dos genes, sobretudo aqueles contidos em plasmídeos.

Independentemente do modo de aquisição do gene *nodC* das estirpes de *R. altiplani* e *R. mesoamericanum*, o resultado apresentado levanta indícios de uma lição entre estes simbiossistemas das Américas do Sul e Central. Uma vez que ambas as espécies possuem genoma completo sequenciado, estudo comparativo baseados no mapeamento genético, por exemplo, para avaliar a existência de outros genes compartilhado, certamente trariam mais segurança para atestar a origem e a dispersão destes simbiossistemas pela América.

Adicionalmente aos dados da análise do gene *nodC*, estudos mostram que as estirpes de *R. altiplani* e *R. mesoamericanum* também compartilham plantas hospedeiras, como *Phaseolus vulgaris* e *Mimosa pudica* (MISHRA et al., 2012; LOPÉZ-LOPÉZ et al., 2012; KLONOWSKA et al., 2012; *Capítulo I desta tese*). Para Laguerre et al. (2001) os estudos filogenéticos baseados na sequência dos genes *nod*, em geral, apresentam correlação com o tipo de planta hospedeira. Coincidentemente ambas as leguminosas tem a América central e América do sul com centros de origens (KLONOWSKA et al., 2017) podendo este ser um fator importante da biogeografia destes simbiossistemas que compartilham o mesmo gene.

Curiosamente, *R. altiplani* é capaz de nodular *P. vulgaris* e fixar nitrogênio de forma eficiente (Figura 25) podendo este fator está relacionado a expressão do gene *nodC*. Segundo Hungria et al. (1994), os genes *nodABC* são responsáveis pela biossíntese dos fatores Nod, sendo essenciais para a divisão das células do córtex e encurvamento dos pelos radiculares. O gene *nodC*, especificamente, é responsável pela biossíntese de molécula de N-acetilglucosaminatransferase, que por sua vez, age sobre o tamanho dos lipoquitiligossacarídeos (Fator nod), e portanto está envolvido diretamente na determinação de um hospedeiro específico (KAMST et al., 1998).

Para a filogenia do gene *nifH* foram utilizadas sequências de 346 bp das estirpes BR 10423^T, BR 10427 e BR 10432 e outras sequências de estirpe tipos de espécies mais próximas. Após o alinhamento múltiplo, verificou-se que pouco mais de um terço (140) das posições do apresentaram variações de nucleotídeos. De modo geral, as topologias dos genes simbióticos foram similares, destacando a proximidade das estirpes de *R. altiplani* com *R. mesoamericanum* (Figura 22). Neste caso, as sequências do gene *nifH* das estirpes de *R. altiplani* formaram um clado monofilético com 100% de identidade entre elas.

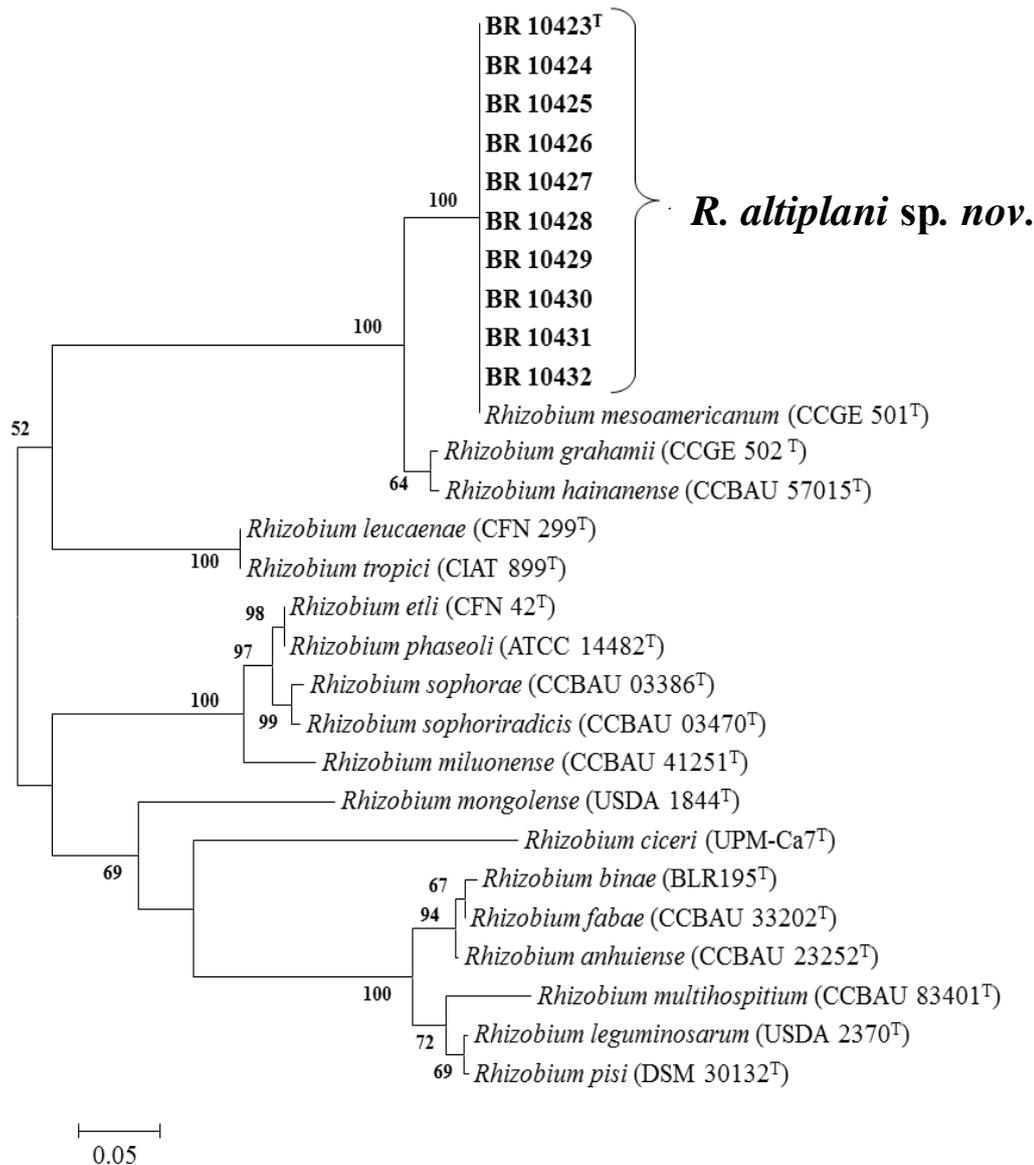


Figura 23. Filogenia Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *nodC* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (< 60%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 5 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo J.

Diferente da análise do gene *nodC* nenhuma estirpe tipo foi agrupada juntas com as estirpes de *R. altiplani*. Entretanto as divergências filogenéticas não ultrapassaram 2%, sendo as sequências mais próximas as de *R. mesoamericanum*, *R. grahamii*, *R. hainanense*, *R. azibense*, *R. galicum*. Os resultados evidenciam que o gene *nifH* destas espécies tem uma origem comum e que se manteve conservado ao longo da evolução dos táxons.

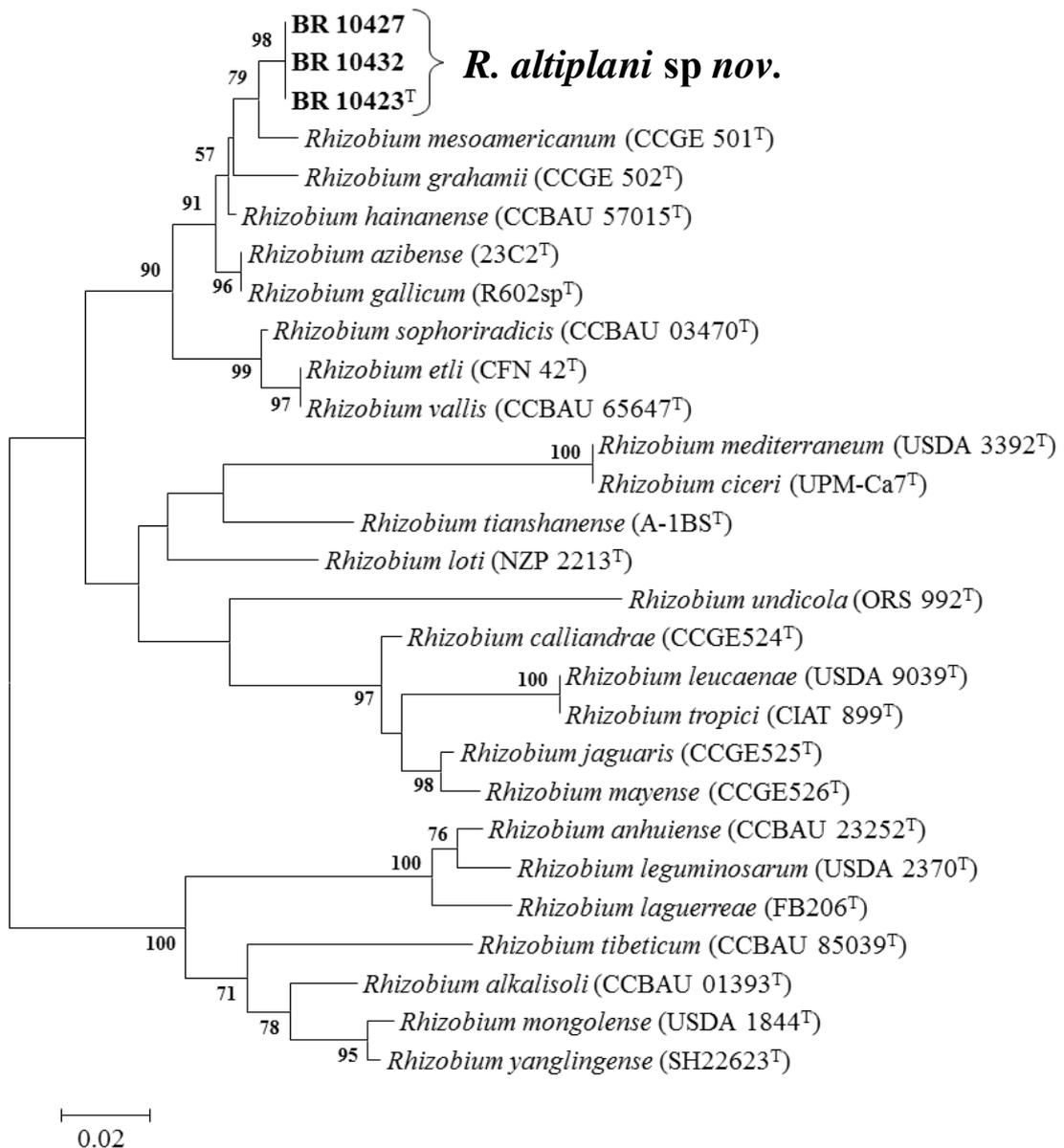


Figura 24. Filogenia Maximum-likelihood baseada em seqüências parciais do gene *nifH* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp. nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (< 50%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo J.

4.5.5. Experimento de inoculação cruzada de isolados de *Rhizobium altiplani*

A capacidade nodulífera foi detectada logo aos 16 dias após a inoculação (DAI). Neste primeiro momento foram retiradas amostras de nódulos para verificar a viabilidade do fenótipo fluorescente das bactérias marcadas com gene GFP. Todas as leguminosas apresentaram nodulação positiva em ambos os tratamentos inoculados com bactérias selvagem e transformadas, exceto *Arachis hypogaea* (tabela 14).

As plantas tiveram respostas diferenciadas com relação a nodulação, efetividade e resposta da FBN. Quando avaliado a variável nodulação, constatou-se que *P. vulgaris* foi a

planta hospedeira que mais formou nódulos com a estirpe BR 10423^T com média de 43 nódulos por planta, contrastando com as demais espécies de leguminosas que variaram entre 2 e 10 nódulos por planta, incluído *M. pudica*. Este fato pode indicar que *R. altiplani* seja um simbionte eventual de *M. pudica* e outras leguminosas, considerando que sua fisiologia é ajustada para a parceria com *P. vulgaris*, semelhante ao comportamento verificado para *R. mesoamericanum*.

Tabela 14. Capacidade nodulífera da estirpe da *R. altiplani* BR 10423^T com sua hospedeira original e cinco leguminosas de diferentes tribos após 16 dias de cultivo.

Leguminosa hospedeira	Tribo	Nodulação	Resposta da FBN
<i>Mimosa pudica</i>	<i>Mimoseae</i>	++	++
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Phaseoleae</i>	+++	+++
<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Phaseoleae</i>	+	+
<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Crotalarideae</i>	I	+
<i>Lupinus angustifolium</i>	<i>Genisteae</i>	I	+
<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Dabergenedeae</i>	–	–

(+) Nodulação positiva; (–) Sem nodulação; (I) nódulos inefetivos.

Ao avaliar efetividade dos nódulos através da atividade da leg-hemoglobina, somente as plantas das famílias *Mimoseae* e *Phaseoleae* foram efetivos. Os nódulos de *Crotalaria juncea* e *Lupinus angustifolium* apresentaram características de nódulos pequenos, coloração esbranquiçadas e com massa intranodular esverdeado, indicando não haver atividade da leg-hemoglobina. Estas características foram confirmadas através de imagens obtidas através de microscópio confocal, onde foram observadas a presença de poucas células com sinais fluorescentes (Figura 24). Para estas duas leguminosas hospedeiras, a estirpe BR 10423^T induziu a formação de nódulos inefetivos, sugerindo uma incompatibilidade entre os parceiros simbióticos.

Assim como discutido no capítulo anterior, as plantas possuem um sofisticado sistema defesa capaz de detectar e selecionar organismos eficientes na FBN (MORTIER et al., 2012). Este sistema envolve mecanismos de autorregulação da nodulação baseado na resposta feedback na presença de elementos constitutivos das células dos rizóbios e moléculas exsudadas por eles, como por exemplo, os fatores de nodulação específicos. Na presença de organismos ineficientes, rotas de defesas são ativadas com o objetivo de limitar o desenvolvimento da nodulação em todos os estágios (SHUMPP; DEAKIN, 2010; MORTIER et al., 2012). Isto envolve a expressão de vários genes responsáveis pela produção de substâncias inibidoras da nodulação, como por exemplo, fito-hormônios etileno, ácido abscísico e jasmonato, que podem ter feito negativo nos eventos de reconhecimentos de picos de Ca⁺⁺ (MORTIER et al., 2012). O resultado destes mecanismos repressores podem ser verificados em uma limitação do número de nódulos. Em estágios mais avançados, os nódulos colonizados por rizóbios ineficientes podem sofrer “punições” a partir do aumento da permeabilidade celular do córtex radicular ao oxigênio, limitando assim seus crescimentos (SHUMPP e DEAKIN, 2010).

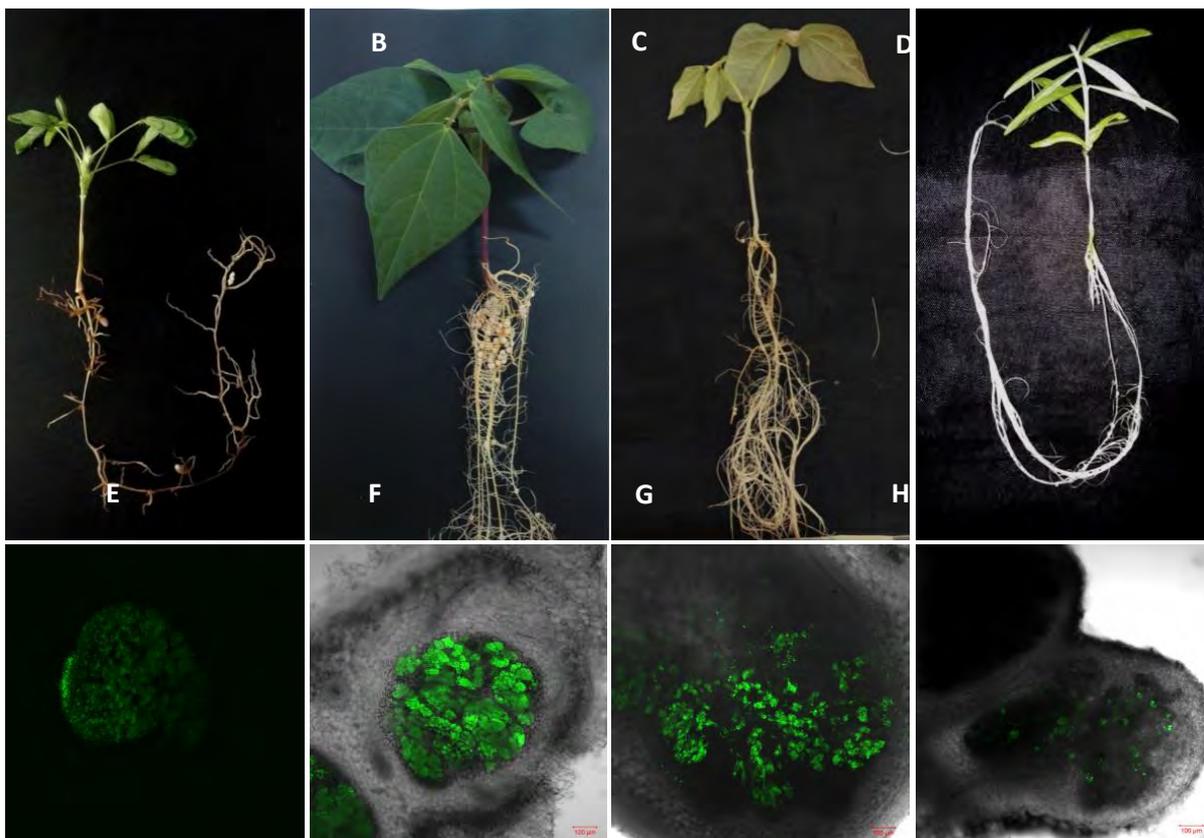


Figura 25. Testes da capacidade nodulífera da estirpe de BR 10423^T em diferentes plantas hospedeiras de leguminosas após 16 dias de inoculação. A – E: *Mimosa pudica*; B – F: *Phaseolus vulgaris*; C – G: *Vigna unguiculata*; D – H: *Crotalaria juncea*. As imagens foram obtidas a partir de fotografias convencionais e microscópio LSM700 (Zeiss) após a excitação de espécimes com um laser de 488 nm. Painéis inferiores mostram imagens integradas de luz transmitida (tons de cinza) e fluorescência verde (bacteróides). Tamanho das barras: 100 μ m.

A nodulação em *Vigna unguiculata* foi semelhante a verificada para *C. juncea* e *L. angustifolium*, embora apresentasse nódulos com atividade da leg-hemoglobina e mais células infectadas (Figura 25).

Apesar de *R. altiplani* ter sido isolado originalmente de *Mimosa pudica*, esta espécie apresentou uma nodulação pouco efetiva. No total foram observados apenas dois nódulos de tamanho grande e exibindo a atividade de FBN, evidenciada pela presença de leg-hemoglobina ativa (rósea). A presença de bactérias expressando o fenótipo verde fluorescente foi detectado ocupando quase todo o nódulo (figura 25). Portanto o processo de nodulação de mimosa induzido pela estirpe BR 10423^T parece ter sido limitado nos estágios pré-nodulares, reduzindo o número de nódulos. Com relação ao desenvolvimento das partes aéreas das plantas de *M. pudica*, verificou-se que a estirpe de *R. altiplani* não contribuiu significativa para a planta hospedeira original, apresentando folhas com tonalidade de verde-amarelado. Este resultado sugere que aos 16 DAI, a estirpe BR 10423^T estabelece uma relação de comensalismo, ou mesmo parasitismo transitório. Barrett e Parker (2006) constataram que duas estirpes de *Rhizobium sp.* que induziram nódulos com atividade de redução do acetileno não contribuíram para o aumento da biomassa vegetal de *M. pudica*, mesmo após 41 dias de cultivo. Uma série de estudos vêm evidenciando que espécies do gênero *Rhizobium* induzem

nodulação não-efetiva em *M. pudica* (MISHRA et al., 2012; KLONOWSKA et al., 2012; LIU et al., 2011, BARRETT; PARKER, 2006).

Surpreendentemente a nodulação de *Phaseolus vulgaris* pela estirpe BR 10423^T foi a única que apresentou alto nível de FBN, sendo observado através do visível incremento da parte aérea e pela tonalidade verde escura das folhas decorrente de um maior acúmulo de N nos tecidos vegetais. Adicionalmente, todos os nódulos mostraram ativos, altamente infectados e sem sinais de limitações (figura 25). Estes resultados sugerem que para estes parceiros simbióticos foi estabelecida uma relação de protocoperação em poucos dias, diferindo do hospedeiro original. A FBN de alta eficiência é um dos pré-requisitos para a recomendação de estirpes para produção de inoculantes, portanto, vale cogitar a possibilidade de estudos complementares para avaliar outros atributos para fins biotecnológicos. López-López et al. (2012) verificaram que estirpes de *R. mesoamericanum*, uma espécie irmã de *R. altiplani*, também foi capaz de induzir nodulação efetiva em *P. vulgaris*, porém, a partir de análises da redução do acetileno verificou-se que os níveis de fixação de N foram menores em comparação com o controle positivo inoculado com *R. etli*.

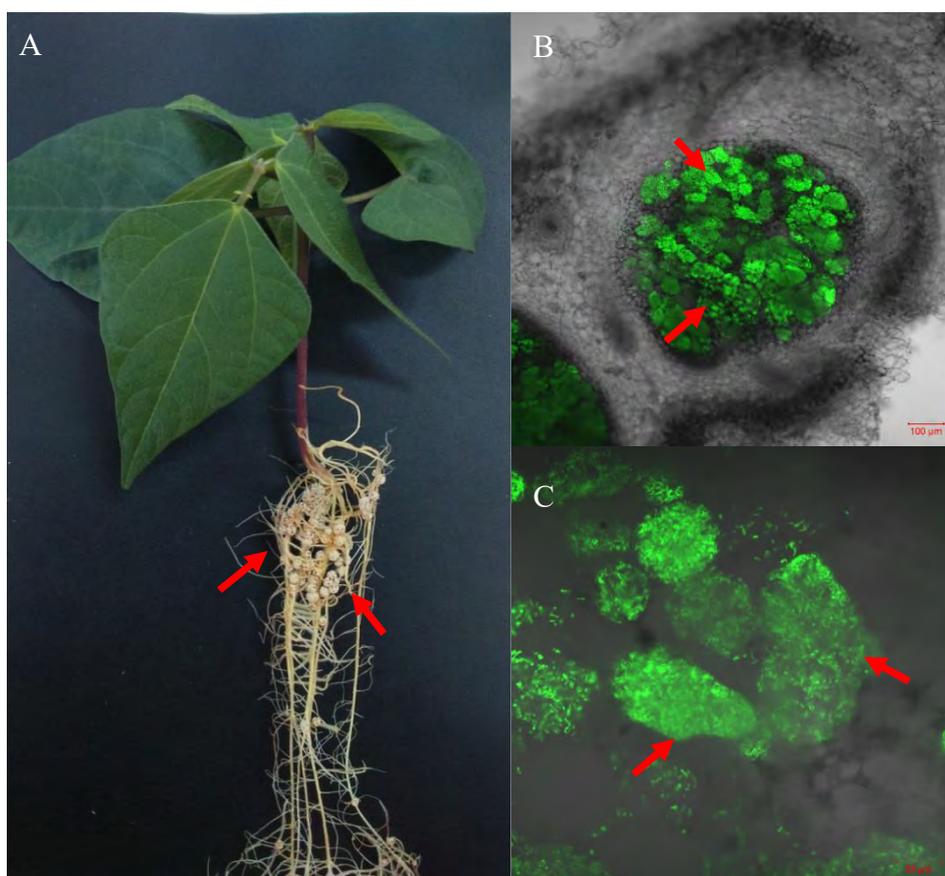


Figura 26. Mudanças de *Phaseolus vulgaris* nodulada pela estirpe BR 10423^T (*R. altiplani*) aos 16 DAI. A) Raiz amplamente nodulada com significativo efeito sobre a parte aérea; B) Imagem confocal dos nódulos mostrando efetivo processo de infecção das células vegetais; C) Imagem confocal mostrando detalhes das células vegetais ocupadas por bacteróides. As setas destacam as características de nodulação e processo de colonização efetivos.

4.5.6. Descrição da espécie *Rhizobium altiplani*

A nomenclatura da espécie provém da região do planalto central do Brasil, localizados no Bioma Cerrado a 1000m de altitude, *Rhizobium altiplani* (al.ti.pla.ni. L. adj. Altus = alto; planum = plano).

As células de *R. altiplani* são móveis com 2-3 flagelos, Gram-negativa, medindo aproximadamente 1,5x0,4 µm, aeróbica e não formadora de esporos. Colônias em meio YMA são circulares, com pigmento amarelo, opaca e tendo diâmetro de 3mm dentro de 4 dias de crescimento a 28°C. A amplitude de pH de crescimento em YMA é de 6,8-10,0, com crescimento ótimo a pH 6,8-7,0. O crescimento ocorre entre 12°C e 35°C, com crescimento ótimo a 28-30°C. Não cresce em concentrações de NaCl (w/v) maiores que 2,0%. Apresenta reação positiva para utilização das fontes de carbono N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, Adonitol, L-arabinose, D-arabitol, celobiose, D-frutose, L-fucose, D-galactose, Gentiobiose, α-D-glucose, mio-inositol, α-D-lactose, lactulose, Maltose, D-manitol, D-manose, melibiose, Metil-B-D-glucosido, D-psicose, rafinose, L-ramnose, D-sorbitol, sacarose, trealose, turanose, xilitol, ácido cis-aconítico, ácido DL-láctico, ácido quínico, L-asparagina, ácido L-aspártico, ácido L-glutâmico, L-histidina, hidroxil-L-prolina, L-ornitina, L-prolina, ácido γ-aminobutírico, ácido urocânico, dextrina, glicerol, Metil piruvato, Monometil succinato e ácido bromossuccínico. Também apresenta reação positiva para as atividades das enzimas catalase, uréase, β-glucosidase, hidrolise da esculina e β-galactosidase, enquanto que a redução do nitrato, triptofano desaminase, fermentação da glicose, arginina dihidrolase e hidrolise de gelatin são negativas. Os ácidos graxos mais abundantes são C_{19:0} ciclo ω8c e soma das características 8 (C_{18:1} ω7c/C_{18:1}ω6c). Constitui-se uma espécie geneticamente próxima *R. mesoamericanum* e *R. grahamii* havendo uma clara distinção nas seqüências de housekeeping e análise de ANI menor que 85,3%.

4.6. CONCLUSÕES

- De acordo com as características fenotípicas e genotípicas as dez estirpes isolados de nódulos de *Mimosa pudica* crescida em solo alcalino do Distrito Federal do Brasil Central são distintas das espécies mais próximas (*R. grahamii* e *R. mesoamericanum*) e pertencem a uma nova espécie, da qual foi denominada *Rhizobium altiplani*.
- As espécies *R. altiplani* e *R. mesoamericanum* possuem homologias quanto as sequências dos genes simbióticos *nifH* e *nodC*, o que é condizente com uma ancestralidade em comum.
- *R. altiplani* é capaz de nodular outras espécies de leguminosas de diferentes tribos além de seu hospedeiro original, incluído *Phaseolus vulgaris* que apresentou um elevado desenvolvimento da parte aérea em decorrência atividade de FBN.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- Beta-rizóbios são dominantes em espécies de mimosas do Brasil. Os resultados desta tese corroboram os estudos prévios realizados no Cerrado e Caatinga (BONTEMPS et al., 2010; DOS REIS JUNIOR et al., 2010), mas acrescentam novas informações importantes para o melhor entendimento ecologia deste simbionte no maior centro de diversidade mimosas do Mundo. Neste novo cenário as espécies de *Cupriavidus* são simbiontes amplamente disseminado fazendo uma ligação entre os isolados de encontrados no Uruguai até a Guiana Francesa. A América do Sul, portanto constitui-se um grande centro de diversidade de *Cupriavidus*.
- Embora as populações de *Cupriavidus* sejam geneticamente muito semelhantes, quando comparados pelos seus genes 16S *rRNA* e *recA*, o mesmo não se reflete para os genes simbióticos, havendo uma clara distinção entre isolados Sul-americanos e de outras partes do mundo.
- Mimosas do Cerrado são noduladas por alfa-rizóbios, entretanto as condições naturais exercem uma pressão seletiva beneficiando *Paraburkholderia*. Quando as condições se alteram pelo aumento do pH *Rhizobium* tornam-se mais competitivos e podendo se tornar o simbionte predominante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; BARAKAT, M.; MARTEL, M. H.; HEULIN, T. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 2, p. 787-794, 1999.
- ACINAS, S. A.; MARCELINO, A. L.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genoma with multiple *rrn* operons. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 9, p. 2629-2635, 2004.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. DE M.; SPAROVEK, GERD. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2014.
- ALLEONI, L. R. F.; CAMARGO, O. A. Óxidos de ferro e de alumínio e a mineralogia da fração argila deferrificada de latossolos ácidos Iron and aluminium oxides and the mineralogy of iron free clay fraction of acric oxisols. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 3, p. 416-421, 1995.
- ANDAM, C. P.; MONDO, S. J.; PARKER, M. A. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texan and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 4686-4690, 2007
- ANDRUS, A. D.; ANDAM, C.; PARKER, M. A. American origin of *Cupriavidus* bacteria associated with invasive *Mimosa* legumes in the Philippines. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. ___, p.747-750, 2012.
- ANGUS, A. A.; HIRSCH, A. M. Insights into the history of the legume betaproteobacterial symbiosis. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 1, p. 28-30, 2010.
- ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J. L.; GILLER, K. E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 4016-4021, 1995.
- AOKI, S.; ITO, M.; IWASAKI, W. From β - to α -Proteobacteria: The Origin and evolution of rhizobial nodulation genes *nodII*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 11, p. 2494-2508, 2013.
- ARAÚJO, W. F.; ANDRADE JÚNIOR, A. S. DE; MEDEIROS, R. D. DE; SAMPAIO, R. A. Precipitação pluviométrica mensal provável em Boa Vista, Estado de Roraima, Brasil provável em Boa Vista, Estado de Roraima, Brasil provável em Boa Vista, Estado de Roraima, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.3, p.563-567, 2001.
- ASERSE, A. A.; WOYKE, T.; KYRPIDES, N. C.; WHITMAN, W. B.; LINDSTRÖM, K. Draft genome sequence of type strain HBR26T and description of *Rhizobium aethiopicum* gen. nov. **Standards in Genomic Sciences**, v.12, n.1, p. 1, 2017.
- BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soil**, v. 30, n. 5-6, p. 485-491, 2000.

BARAÚNA, A. C.; ROUWS, L. F. M.; SIMOES-ARAÚJO, J. L.; DOS REIS JUNIOR, F. B.; IANNETTA, P. P. M.; MALUK, M.; GOI, S. R.; REIS, V. M.; JAMES, E. K.; ZILLI, J. E. *Rhizobium altiplani* sp. nov., isolated from effective nodules on *Mimosa pudica* growing in untypically alkaline soil in central Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 66, p. 1–7, 2016.

BARBOSA, R. L.; CAMPOS, C.; PINTO, F.; FEARNSIDE, P. M. The “Lavrados” of Roraima: biodiversity and conservation of Brasil’s Amazonian savannas. **Ecosystems and Communities**. v. 1, n. 1, p. 1-26, 2007.

BARBOSA, T. R. L.; SILVA, M. P. S. E.; BARROSO, D. G. **Plantio do sabiazeiro em pequenas e médias propriedades**. Niterói: Programa Rio Rural, 2008.

BARCELLOS, F. G.; MENNA, P.; BATISTA, J. S. DA S.; HUNGRIA, M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2635-2643, 2007.

BARNEBY, R. C. *Sensitivae censitae*: A description of the genus *Mimosa* Linnaeus (*Mimosaceae*) in the New World. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 65, p. 1-835, 1991.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of *Paraburkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, n. 1, p. 57-65, 2005.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Paraburkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. Nodule Bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1198-1206, 2006.

BECKER, A.; FRAYSSE, N.; SHARYPOVA, L. Recent Advances in Studies on Structure and Symbiosis-Related Function of Rhizobial K-Antigens and Lipopolysaccharides. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 18, n. 9, p. 899-905, 2005.

BEHRENDT, U.; KAMPFER, P.; GLAESER, S. P.; AUGUSTIN, J.; ULRICH, A. Characterization of the N₂O-producing soil bacterium *Rhizobium azooxidifex* gen. nov., **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2354-2361, 2016.

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

BINDE, D. R.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on sequencing of the 16S rRNA gene of elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.83, n. 5, p. 897-908. 2009.

BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; DOS REIS JÚNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, L. E.; LOUREIRO, M. F.; DE FARIA, S. M.; SPRENT, J. I. JAMES, E. K.; YOUNG, J. P. W. *Paraburkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 1, p. 44-52. 2010.

- BOMFETI, C. A.; FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; CARDOSO, P. G.; GUERREIRO, M. C.; MOREIRA, F. M. S. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 35, n. 3, p. 657-671, 2011.
- BONTEMPS, C.; ROGEL, M. A.; WIECHMANN, A.; MUSSABEKOVA, A.; MOODY, S.; SIMON, M. F.; MOULIN, L.; ELLIOTT, G. N.; LACERCAT-DIDIER, L.; DASILVA, C.; GREETHER, R.; CAMARGO-RICALDE, S. L.; CHEN, W.; SPRENT, J. I.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; YOUNG, J. P.; JAMES, E. K. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **New phytologist**, v. 209, n. 1, p. 319-333, 2016.
- BOURNAUD, C.; FARIA, S. M. de; DOS SANTOS, J. M. F.; TISSEYRE, P.; SILVA, M. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the *Piptadenia* Group (tribe *Mimoseae*). **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 63476. 2013.
- BROUGHTON, W. J.; ZHANG, F.; PERRET, X.; STAEHELIN, C. Signals exchanged between legume and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 129-137, 2003.
- BROUGHTON, W. J.; HANIN, M.; RELIĆ, B.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; ŞİMŞEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUÉRÉ, A.; JABBOURI, S.; FELLAY, R.; PERRET, X.; DEAKIN, W. J. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3654-3663, 2006.
- CAIN, C. C.; HENRY, A. T.; WALDO, R. H.; CASIDA, L. J.; FALKINHAM, J. O. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 4139-4141, 2000.
- CAMPELO, A. B.; CAMPELO, C. R. Eficiência da inoculação cruzada entre espécies da subfamília *Mimosoideae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 333-337, 1970.
- CARVALHO, A. M.; ALVES, B. J. R.; PEREIRA, L. L. **Emissão de óxido nitroso do solo com aplicação de fontes de fertilizantes nitrogenados em sistema plantio direto no cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010. 14 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 281).
- CELADOR-LERA, L.; MENENDEZ, E.; PEIX, A.; IGUAL, J. M.; VELAZQUEZ, E.; RIVAS, R. *Rhizobium zea* gen. nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2306-2311, 2017.
- CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAN, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 330-339. 2007.
- CHANG, Y. L.; WANG, J. Y.; WANG, E. T.; LIU, H. C.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 2496-2502, 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. 1729-35, 2001.

CHEN, W. -M.; JAMES, E. K.; PRESCOTT, A. R.; KIERANS, M.; SPRENT, J. I. Nodulation of *Mimosa* spp. by the β -proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 16, n. 12, p. 1051-1061, 2003a.

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

CHEN, W. -M.; de FARIA, S. M.; ROSÂNGELA, S.; PITARD R. M.; ARAÚJO, J. L. S.; CHOU, J. -H.; CHOU, Y.-J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Proof that *Burkholderia* Strains Form Effective Symbioses with Legumes: a Study of Novel Mimosa-Nodulating Strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7461–7471, 2005a.

CHEN, W. -M.; JAMES, E. K.; CHOU, JUI. -H.; SHEU, S. -Y.; YANG, S. -Z.; SPRENT, J. I. Beta rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **New Phytologist**, v. 168, n. 5, p. 661-675, 2005b.

CHEN, W. -M.; JAMES, E. K.; COENYE, T.; CHOU, J. -H.; BARRIOS, E.; de FARIA, S. M.; ELLIOTT, G. N.; SHEU, S. -Y.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1847-1851, 2006.

CHEN, W.-M.; FARIA, S. M. de; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; LIN, K. -Y.; CHOU, J. – H.; SHEU, S. -Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Paraburkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p.1055-1059, 2007.

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

CHEN, W. -M.; FARIA, S. M. de; CHOU, J.-H.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J. P. W.; VANDAMME, P. *Paraburkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, n. 9, p. 2174-2179, 2008b.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI C. Inoculation of Burkholderia cepacia, Pseudomonas fluorescens and Enterobacter sp. on Sorghum bicolor: Root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1998.

CHOU, Y.-J.; ELLIOTT, G. N.; JAMES, E. J.; LIN, K.-Y.; CHOU, J.-H.; SHEU, S. Y.; SHEU, D.-S.; SPRENT, J. I.; CHEN, W.-M. *Labrys neptuniae* sp. nov., isolated from root

nodules of the aquatic legume *Neptunia oleracea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary**, v. 57, n. 3, p. 577-581, 2007.

CLIMA-DATA. Clima: Brasília. 2007. Disponível em: < <https://pt.climate-data.org/americado-sul/brasil/distrito-federal/brasil-852/>>. Acesso em: 07 abr. 2017.

COELHO, M. R.; MARTINS, V. M.; VIDAL-TORRADO, P.; SOUZA, C. R. DE G.; PEREZ, X. L. O.; VÁZQUEZ, F. M. Relação solo-relevo-substrato geológico nas restingas da planície costeira do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 833-846, 2010.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 719-729, 2003.

COENYE, T.; HENRY, D.; SPEERT, D. P.; VANDAMME, P. *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 623-627, 2004.

COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, n. 4, p. 607–626, 2008.

CORDEIRO, A. B.; RIBEIRO, R. A.; HELENE, L. C. F.; HUNGRIA, M. *Rhizobium esperanzae* gen. nov., a N₂-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 3937-3945, 2017.

CORRÊA, M.; KER, J.; BARRÓN, V.; TORRENT, J.; CURI, N.; PEREIRA TORRES, T. Caracterização física, química, mineralógica e micromorfológica de horizontes coesos e fragipãs de solos vermelhos e amarelos do ambiente tabuleiros costeiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, p. 297-313, 2008.

COSTA, G. S.; FRANCO, A. A.; DAMACENO, R. N.; FARIA S. M. Aporte de nutrientes pela serapilheira em uma área degradada e revegetada com leguminosas arbóreas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 28, n. 5, p. 919-927, 2004.

COUTINHO, L.M. **O Bioma do Cerrado**. In: Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois / Aldo Luiz Klein (org). São Paulo: Editora UNESP; Imprensa Oficial do Estado, 2002.

COUTINHO, L.M. **O conceito de Bioma**. Acta bot. Bras. v.20, n. 1, p. 13-23, 2006

COUTINHO, L.M. **Aspectos do Cerrado**. Disponível em: < http://ecologia.ib.usp.br/cerrado/aspectos_bioma.htm >. Acesso em: 26 dez. 2016.

CUNHA, C. O.; ZULETA, L. F. G.; ALMEIDA, L. G. P.; CIAPINA, L. P.; BORGES, W. L.; PITARD, R. M.; BALDANI, J. I.; STRALIOTTO, R.; FARIA, S. M. de; HUNGRIA, M.; CAVADA, B. S.; MERCANTE, F. M.; VASCONCELOS, A. T. R. Complete Genome Sequence of *Paraburkholderia phenoliruptrix* BR3459a (CLA1), a Heat-Tolerant, Nitrogen-Fixing Symbiont of *Mimosa flocculosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 23, p. 6675-6676, 2012.

DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; DELAMUTA, J. R. M. O.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; ANDRADE, D. S.; MARTÍ-NEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium paranaense* gen. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3222-3229, 2014.

DALL'AGNOL, R. F.; BOURNAUD, C.; FARIA, S. M. de; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) grow in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**. v. 93, n. 4, p. 1-15, 2017.

DAMASCENO, M. M. **Composição bromatológica de forragem de espécies arbóreas da caatinga paraibana em diferentes altitudes**. 2007. 61 f. Tese (Mestrado em Zootecnia) – CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL, Universidade Federal de Campina Grande, Patos. 2007.

DÁVILA, G.; PALACIOS, R. Origins of Genomics in Nitrogen-fixing research. in: Palacios, R.; Newton, W. E. Ed. **Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms**. Dordrecht: Springer, 2006.

DEGANO, I.; BIESAGA, M.; COLOMBINI, M. P.; TROJANOWICZ, M. Historical and archaeological textiles: An insight on degradation products of wool and silk yarns. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 34, p. 5837-5847, 2011.

DENG, Z. S.; ZHAO, L. F.; KONG, Z. Y.; YANG, W. Q.; LINDSTRÖM, K.; WANG, E. T.; WEI, G. H. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of *Loess Plateau* in China. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 76, n.3, p. 463-475. 2011.

DE CASTRO PIRES, R.; DOS REIS JUNIOR, F. B.; ZILLI, J. E.; FISCHER, D.; HOFMANN, A.; JAMES, E. K.; SIMON, M. F. Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of *Mimosa* in central Brazil. **Plant Soil**, v. 423, n. 1-2, p. 411-428, 2018.

DE MEYER, E.; CNOCKAERT, M.; ARDLEY, J. K.; TRENGOVE, R. D.; GARAU, G.; HOWIESON, J. G.; VANDAMME, P. *Burkholderia rhynchosiae* sp. nov., isolated from *Rhynchosia ferulifolia* root nodules Sofie. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 3944-3949, 2013a.

DE MEYER, S. E.; CNOCKAERT, M.; ARDLEY, J. K.; MAKER, G.; YATES, R.; HOWIESON, J. G.; VANDAMME, P. *Burkholderia sprentiae* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 3950-3957, 2013b.

DIAS, L. E. O papel das leguminosas arbóreas noduladas e micorrizadas na recuperação de áreas degradadas (parte 2). In: BALENSIFER, M. (Org.). **Recuperação de áreas degradadas**: curso de atualização. Curitiba: FUPEF, 1996. p. 17-28.

DOS REIS JUNIOR, F. B.; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOTT, G. N.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. de F.; DE QUEIROZ, L. P.; SCOTTI, M. R.; CHEN, W. -M.; NORÉN, A.; RUBIO, M. C.; FARIA, S. M. de; BONTEMPS, C.; GOI, S. R.; YOUNG, J. P.

W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 934-946, 2010.

DOWNIE, J. A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 150-170, 2010.

DUTRA, V. F.; MORIM, M. P. *Mimosa* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23084>>. Acesso em 4 mar 2018.

EAGLESHAM, A. R. J.; AHMAD, M. H.; HASSOUNA, S.; GOLDMAN, B. J. Cowpea Rhizobia Producing Dark Nodules: Use in Competition Studies. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 611-618, 1982.

EKHATOR, F.; UYI, O. O.; IKUENOBE, C. E.; OKEKE, C. O. The distribution and problems of the invasive alien plant, *Mimosa diplotricha* c. wright ex sauvalle (*Mimosaceae*) in Nigeria. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 4, p. 866-877, 2013.

ELLIOTT, G. N.; CHEN, W.-M.; CHOU, J.-H.; WANG, H.-C.; SHEU, S.-Y.; PERIN, L.; REIS, V. M.; MOULIN, L.; SIMON, M. F.; BONTEMPS, C.; SUTHERLAND, J. M.; BESSI, R.; FARIA, S. M. de; TRINICK, M. J.; PRESCOTT, A. R.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. *Paraburkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. **New Phytologist**, v. 173, n. 1, p. 168-180, 2007.

ELLIOTT, G. N.; CHOU, J.-H.; CHEN, W.-M.; BLOEMBERG, G. V.; BONTEMPS, C.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; VELÁZQUEZ, E.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. *Paraburkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 762-778, 2009.

EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2011. 230 p.

ESTRADA, P.; MAYINGUI, P.; COURNOVER, B.; FONTAINE, F.; BALANDREAU, J.; CABALLERO-MELLADO, J. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 285-294, 2002.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2790-2798, 2001.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FARIA, S. M. de; HAY, G. T.; SPRENT, J. I. Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* bentham occurs between epidermal cells. **Microbiology**, v. 134, n. 8, p. 2291-2296, 1988.

FARIA, S. M. de; MACHADO, R. L.; UCHOAS, E. S. Dependência de fungos micorrizicos arbusculares na seleção de estirpes de rizóbios para pau jacaré (*Piptadenia gonoacantha*

(Mart.) Macbr), em substrato autoclavado. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2005. 4 p. (Comunicado técnico 83).

FRAYSSE, N.; JABBOURI, S.; TREILHOU, M.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Symbiotic conditions induce structural modifications of *Sinorhizobium* sp. NGR234 surface polysaccharides, **Glycobiology**, v. 12, n. 11, p. 741-748, 2002.

FRAYSSE, N.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium–legume symbiosis. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 7, p. 1365-1380, 2003.

FERGUSON, B.; MATHESIUS, U. J. Signaling interactions during nodule development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 22, n. 1, p. 47–72, 2003.

FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M. **Análise de perfis de ácidos graxos como ferramenta para estudos em microbiologia do solo**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2010. 37 p. (Documentos 163).

FERNANDES JUNIOR, P. I.; REIS, V. M. Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 33 p, 2008. (Documento 252).

FERNANDEZ-LUQUENO, F.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bioquímica, fisiología y morfología de la senescência nodular: uma revisión crítica. *Terra Latinoam.*, v. 26, n. 2, p. 133-144, 2008.

FISCH, G.; MARENGO, J. A.; NOBRE, C. A. **Clima da Amazônia**. Disponível em: <<http://climanalise.cptec.inpe.br/~rclimanl/boletim/cliesp10a/fish.html>>, Acesso em: fev-2017.

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

FLORENTINO, L. A.; NUNES, A. P. P.; REZENDE, A. V.; MANTOVANI, J. R.; SOUZA, F. R. C.; JUNQUEIRA, G. A. Ocorrência e eficiência do microssimbionte de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. em função das propriedades do solo. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 528-534, 2015.

FONTES, M. P. F.; CAMARGO, O. A.; SPOSITO, G. Eletroquímica das partículas coloidais e sua relação com a mineralogia de solos altamente intemperizados. **Scientia Agricola.**, v. 58, n. 3, p. 627-646, 2001.

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

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F.; SILVA, E. M. R.; FARIA, S. M. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1992. 11 p. (EMBRAPA-CNPAB. Comunicado Técnico, 9).

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C. Manejo nutricional integrado na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade dos sistemas produtivos utilizando a fixação biológica

de nitrogênio como fonte de nitrogênio. p. 201-220. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta – ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa, 2005. 368p.

FRANÇA TEIXEIRA, M. L.; FRANCO, A. A. Infestação por larvas de *Cerotoma arcuata* (Olivier) (Coleoptera: Chysomelidae) em nódulos de feijoeiro em cultivo com cobertura morta ou em consórcio com milho ou com caupi. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1529-1535, 2007.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Yeast Extract – Mannitol agar for laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw Hill, 1928. 145 p.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; FERNANDES, A. R.; SANTOS, C. E. R. S. Biological nitrogen fixation in legume trees of the Brazilian Caatinga. **Journal of Arid Environments**. v. 74, n. 3, p. 344-349, 2010.

FREITAS; A. D. S.; BORGES, W. L.; ANDRADE, M. M. M.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; MULATO, B. M.; LYRA, M. C. C. P. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 8, p. 788 - 796, 2014.

FRUGIER, F.; KOSUTA, S.; MURRAY, J. D.; CRESPI, M.; SZCZYGLOWSKI, K. Cytokinin: secret agent of symbiosis. **Trends in Plant Science** v. 13, n. 3, p. 115-120, 2008.

GEHLOT, H. S.; PANWAR, D.; TAK, N.; TAK, A.; SANKHLA, I. S.; POONAR, N.; PARIHAR, R.; SHEKHAWAT, N. S.; KUMAR, M.; TIWARI, R.; ARDLEY, J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I. Nodulation of legumes from the Thar desert of India and molecular characterization of their rhizobia. **Plants Soil**, v. 357, n. 1-2, p. 227-243, 2012.

GEHLOT, H. S.; TAK, N.; KAUSHIK, M.; MITRA, S.; CHEN, W. –M.; POWELEIT, N.; PANWAR, D.; POONAR, N.; PARIHAR R.; TAK, A.; SANKHLA, I. S.; OJHA, A.; RAO, S. R.; SIMON, M. F., DOS REIS JUNIOR., F. B.; PERIGOLO, N.; TRIPATHI, A. K.; SPRENT, J. I.; PETER, W. Y.; JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P. An invasive *Mimosa* in India does not adopt the symbionts of its native relatives. **Annals of Botany**, v. 112, n. 1, p. 179–196, 2013.

GOMES, J. B. V. **Caracterização, gene e uso de solos de três sítios de restinga sob diferentes coberturas vegetais no Estado do Rio de Janeiro**. 1995. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

GOORMACHTIG, S.; CAPOEN, W.; JAMES, E. K.; HOLSTERS, M. Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. **PNAS**, v. 101, n. 16, p. 6303-6308, 2004.

GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K. T.; KLAPPENBACH, J. A.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; TIEDJE, J. M. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, n. 1, p. 81-91, 2007.

GALTIER, N.; GOUY, M.; GAUTIER, C. SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 12, n. 6, p. 543-548, 1996.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 475-484, 1992.

GRAHAM, P. H. Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. p. 23-58. In: DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON W. E (Ed.). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Netherlands: Springer, 2008. 404 p.

GUAN, Z.-B.; DENG, W.-H.; HUANG, Z.-L.; HUANG, N.-Y.; AI, L.; LI, C.-Y. A preliminary investigation on the alien invasive plants in Xishuangbanna. **Tropical Agricultural Science and Technology**, v. 29, n. 4, p. 35-38, 2006.

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A. M.; MOULIN, L.; CHEN, W. -M.; ELLIOTT, G. N.; BONTEMPS, C.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; GROSS, E.; DOS REIS JUNIOR, F. B.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. J. Legume nodulating β -proteobacteria: diversity, host range and future prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 11, p. 1276-1288, 2011.

HAN, T. X.; WANG, E. T.; WU, L. J.; CHEN, W. F.; GU, J. G.; GU, C. T.; TIAN, C. F.; CHEN W. X. *Rhizobium multihospitium* gen. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, n. 7, p.1693-1699, 2008.

HARA, F. A. S., OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2004.

HARA, F. A. S., OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.40, n.7, p. 667-672, 2005.

HAUSE, B.; SCHAARSCHMIDT, S. The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. **Phytochemistry**, v. 70, n.13-14, p. 1589-1599, 2009.

HAYAT, M. A.; GIAQUINTA, R. Rapid fixation and embedding for electron microscopy. **Tissue and Cell**, v. 2, n. 2, p. 191-195, 1970.

HOWIESON, J. G.; YATES, R. J.; FOSTER, K. J.; LEAL, D.; BESIÉR, R. B. Prospects the future of use legumes. p. 363-393. In: DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON W. E (Ed.). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Netherlands: Springer, 2008. 404 p.

HUNGRIA, M., Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, n.3, p.339-364, 1994.

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

HUNGRIA, M; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. (Comunicado técnico 79).

IBGE. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. Comunicação social, 2004a. Disponível em:<<https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>, acesso em: 14 jan. 2017.

IBGE. **Mapa de Bioma do Brasil. Escala 1:5.000.000**. Rio de Janeiro, 2004b. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 23 dez. 2016.

IBF. Bioma Mata Atlântica. Disponível em <https://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>. Acesso em: 30 de jan. 2017.

JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. *New Phytologist*. v. 11, n. 1, p. 37–50, 1912.

JARVIS, B. D. W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n.3, p. 895-898, 1997.

JESUS, E. C.; SCHIAVO, J. A.; FARIA, S. M de. Dependência de micorrização de leguminosas arbóreas tropicais. **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 545-552, 2005.

JIAO, Y. S.; YAN, H.; JI, Z. J.; LIU, Y. H.; SUI, X. H.; WANG, E. T.; GUO, B. L.; CHEN, W. X.; CHEN, W. F. *Rhizobium sophorae* gen. nov., and *Rhizobium sophoriradicis* gen. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 65, n. 2, p. 497-503, 2015.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Ames, v. 32, n. 1, p. 136-139, 1982.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, London: Academic Press, 1969.

KAIYA, S.; RUBABA, O.; YOSHIDA, N.; YAMADA, T.; HIRAIISHI, A. Characterization of *Rhizobium naphthalenivorans* sp. nov. with special emphasis on aromatic compound degradation and multilocus sequence analysis of housekeeping genes. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 211-224, 2012.

KAMST, E.; SPAINK, H. P.; KAFETZOPOULOS, D. Biosynthesis and Secretion of Rhizobial Lipochitin-Oligosaccharide Signal Molecules. In: BISWAS, B. B., DAS H. K. (eds) **Plant-Microbe Interactions. Subcellular Biochemistry**, v. 29. Boston: Springer, 1998.

KARAFIN, M.; ROMAGNOLI, M.; FINK, D. L.; HOWARD, T.; RAU, R.; MILSTONE, A. M.; CARROLL, K. C. Fatal Infection Caused by *Cupriavidus gilardii* in a Child with Aplastic Anemia? **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 3, p. 1005-1007, 2010.

KIM, C.-H. L.; KIM, H.-G.; LEE, H.-S. Anthraquinones isolated from *Cassia tora* (*Leguminosae*) seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6096-6100, 2004.

KLINK, C. A.; MACHADO, M. B. A conservação do Cerrado Brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KLONOWSKA, A.; CHAINTREUIL, C.; TISSEYRE, P.; MELKONIAN, L. M. R.; DUCOUSSO, M.; LAGUERRE, G.; BRUNEL, B.; MOULIN, L. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 81, n. 3, p. 618-635, 2012.

KLONOWSKA, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; MOULIN, L.; ARDLEY, J.; GOLLAGHER, M.; MARINOVA, D.; TIAN, R.; HUNTEMANN, M.; REDDY, T.B.K.; VARGHESE, N.; WOYKE, T.; MARKOWITZ, V.; IVANOVA, N.; SESHADRI, R.; BAESHEN, M. N.; BAESHEN, N. A.; KYRPIDES, N.; REEVE, W. High-quality draft genome sequence of *Rhizobium mesoamericanum* strain STM6155, a *Mimosa pudica* microsymbiont from New Caledonia. **Standards in Genomic Sciences**, v. 12, n. 1, p.1, 2017.

KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J. Fine-tuning of symbiotic genes in rhizobia: flavonoid signal transduction cascade. p. 117-152. In: DILWORTH, M. J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; NEWTON W. E (Ed.). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Netherlands: Springer, 2008. 404 p.

KULKARI, S; NAUTIYAL. Effects of salt and pH stress on temperature-tolerant *Rhizobium* sp. NBRI330 nodulating *Prosopis juliflora*. **Current Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 221-226, 2000.

KUMAR, V.; PATHAK, D. V.; DUDEJA, S. S.; SAINI, R.; GIRI, R.; NARULA, S.; ANAND, R. C. Legume nodule endophytes more diverse than endophytes from roots of legume or non legumes in soil of haryana, Índia. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**. v. 3, n. 3, p. 83-92, 2013.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

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.

LARKIN, R. P.; FRAVEL, D. R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* Wilt of Tomato. **Plant Disease**, v. 82, n. 9, p. 1022-1028, 1998.

LAUS, M. C.; LOGMAN, T. J.; LAMERS, G. E.; BRUSSEL, A. A. N. V.; KIJNE, RUSSELL, W. C. J. W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. **Molecular Microbiology**. v. 59, n. 6, p. 1704-1713, 2006.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M. T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: IMPERATO, F. **Phytochemistry: Advances in Research**, 2006. p. 23-67.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Editora Universitária UFPE, 2003. 822 p.

LEINZ, V. Contribuição à geologia dos derrames basálticos do sul do Brasil. **Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras**, Universidade de São Paulo, Geologia, v. 5, p. 1-59, 1949.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. **Legumes of the world**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005.

LIMA, L. C. L. **Espécies de Mimosa L. (Leguminosae) do semi-árido nordestino: palinologia, fenologia, biologia floral e potencial apícola**. 2007. 96 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2007.

LIU, X. Y.; WU, W.; WANG, E. T.; ZHANG, B.; MACDERMOTT, J.; CHEN, W. X. Phylogenetic relationships and diversity of b-rhizobia associated with *Mimosa* species grown in Sishuangbanna, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 334-342, 2011.

LIU, X. Y.; WEI, S.; WANG, F.; JAMES, E. K.; GUO, X. Y.; ZHANG, C.; XIA, L. G.; DONG, X.; WANG, Y. P. *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in Southern China. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 2, p. 417-426, 2012.

LOPEZ-LARA, I. M.; ORGAMBIDE, G.; DAZZO, F. B.; OLIVARES, J.; TORO, N. Characterization and symbiotic importance of acidic extracellular polysaccharides of *rhizobium* sp. strain GRH2 isolated from acacia nodules. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 10, p. 2826-2832, 1993.

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ROGEL, M. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* gen. nov., **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 322-327, 2010.

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ROGEL-HERNÁNDEZ, M. A.; BAROIS, I.; ORTIZ CEBALLOS, A. I.; MARTÍNEZ, J.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium grahamii* sp. nov., from *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea* nodules and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica* nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2264-2271, 2012.

LOUREIRO, R. S.; SARAIVA, J. M.; SARAIVA, I.; SENNA, R. C.; FREDÓ, A. S. Estudo dos eventos extremos de precipitação ocorridos em 2009 no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 29, p. 83-94, 2014.

LOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S.; POORTER, M. DE. **100 of the world's worst invasive alien species: A selection from the global invasive species database**. World Conservation Union (IUCN), Auckland, New Zealand. 2000.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P.; CALDAS, E.; GONÇALVES, D.; SANTOS, N.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativa de perda da área do Cerrado Brasileiro**. Conservação Nacional do Brasil, Brasília, 2004.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAGNAGO, L. F. S.; MARTINS, S. V.; SCHAEFER, C. E. G. R.; NERI, A. V. Gradiente fitofisionômico-edáfico em formações florestais de Restinga no Sudeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 24, n. 3, p. 734-746. 2010.

MAKKAR, N. S.; CASIDA Jr., L. E. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 323-326, 1987.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

MARCHETTI, M.; CATRICE, O.; BATUT, J.; MASSON-BOIVIN, C. *Cupriavidus taiwanensis* bacteroids in *Mimosa pudica* indeterminate nodules are not terminally differentiated. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 6. p. 2161-2164 2011.

MARKMANN, K.; GICZEY, G.; PARNISKE, M. Functional adaptation of a plant receptor kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. **Plos Biology**, v. 6, n. 3, p. 497-506, 2008.

MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; SALAZAR-SALAZAR, C.; MÉNDEZ, R. D.; CABALLERO-MELLADO, J.; HIRSCH, A. M.; VÁSQUEZ-MURRIETA, M. S.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 6, p 1063-1071, 2013.

MARTINS, A. C. L.; RÊGO, M. M. C.; CARREIRA, L. M. M.; de ALBUQUERQUE, P. M. C. Espectro polínico de mel de tiúba (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, *Hymenoptera*, *Apidae*). **Acta Amazônica**, v. 41, n. 2, p. 183-190, 2011.

MARTINS, P. G. S.; JUNIOR, M. A. L.; FRACETTO, G. G. M.; DA SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R. P.; LYRA, M. do C. C. P. de. *Mimosa caesalpiniiifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 3, p. 459-469, 2015.

MÁTHÉ, I.; TÓTH, E.; MENTES, A.; SZABÓ, A.; MÁRIALIGETI, K.; SCHUMANN P.; FELFÖLDI, T. A new Rhizobium species isolated from the water of a crater lake, description of *Rhizobium aquaticum* sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1110-0>.

MELKONIAN, R.; MOULIN, L.; BÉNA, G.; TISSEYRE, P.; CHAINTREUIL, C.; HEULIN, K.; REZKALLAH, N.; KLONOWSKA, A.; GONZALEZ, S.; SIMON, M.; CHEN, W. -M.; JAMES, E. K.; LAGUERRE, G. The geographical patterns of symbiont diversity in the invasive legume *Mimosa pudica* can be explained by the competitiveness of its symbionts and by the host genotype. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 2099-2111, 2014.

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. 1-17, 2009.

MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. de O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. A. *Lecaena leucocephala* as a trap – host for *Rhizobium tropici* strain from the Brazilian “Cerrado” region. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 1, p. 49-58, 1998.

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

MEYER, S. L. F.; MASSOUD, S. I.; DAVID, J. Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, v. 2, n. 8, p. 871-879, 2000.

MIRANDA, H. S.; SATO, M. N.; NETO, W. N.; AIRES, F. S. Fires in the Cerrado, the Brazilian savanna. in: MARK, A. C. **Tropical Fire Ecology: Climate Change, Land Use, and Ecosystem Dynamics**. Berlin: Springer, 2009. p. 427-450.

MISHRA, R. P. N.; TISSEYRE, P., MELKONIAN, R.; CHAINTREUIL, C.; KLONOWSKA, L. M. A.; GONZALEZ, S.; BENA, G. LAGUERRE, G.; MOULIN, L. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 2, p. 487–503, 2012.

MNASRI, B.; LIU, T. Y.; SAIDI, S.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X.; ZHANG, X. X.; MHAMDI, R. *Rhizobium azibense* gen. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1501-1506, 2014.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.

MORTIER, V.; HOLSTERS, M.; GOORMACHTIG, S. Never too many? How legumes control nodule numbers. **Plant, Cell and Environment**. v. 35, n. 2, p. 245-258, 2012.

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

MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; DELOGU, A. T. G.; CAPPUCCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENGUEDOUAR, H. B. A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F. B.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 63, n. 3, p. 383-400, 2008.

NORRIS, D. O.; T’MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. In relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 29, n. 3, p. 214-235, 1964.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 872-879, 2003.

NURUDDIN, A. A.; CHANG, M. Responses of herbaceous mimosa (*Mimosa strigillosa*), a new reclamation species, to soil pH. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 27, n. 3, p. 287-298, 1999.

OLDROYD, G. E. D., ENGSTROM, E. M.; LONG, S. R. Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. **Plant Cell**. v.13, n. 8, p. 1835-1849, 2001.

OLDROYD, G. E. D.; DOWNIE, J. A. Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Biol. v.5, p. 566-576, 2004.

OLIVEIRA, L. J.; ROGGIA, S.; SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; FERNANDES, P. M.; OLIVEIRA, C. M. Insetos que atacam raízes e nódulos da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga, cap. 2**. Brasília: Embrapa, p. 75- 144, 2012.

PALLERONI, N. J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic Acid Homologies in the Genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, n. 4, p. 333-339, 1973.

PARTE, A. C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **Nucleic Acids Research**, v. 68, n. D1, p. 1825-1829, 2018.

PEIX, A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 14, p. 1927-1935, 2001.

PENG, G.; YUAN, Q.; LI, H.; ZHANG, W.; TAN, Z. *Rhizobium oryzae* gen. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n.9, p. 2158-2163, 2008.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLES, R.; ESTRADA-DE- LOS SANTOS, P; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H.V.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO. J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown *Maize* and sugarcane. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v.72, n. 5, p. 3103-3110, 2006a.

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. **O gênero Burkholderia: Um importante componente da comunidade microbiana**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Documentos 219, 2006b.

PERRET, X.; STAEHELIN, S.; BROUGHTON, W. L. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 180-201, 2000.

PLATERO, R.; JAMES, E. K.; RIOS, C.; IRIARTE, A.; SANDES, L.; ZABALETA, M.; BATTISTONI, F.; FABIANO, E. Novel *Cupriavidus* strains isolated from root nodules of

native Uruguayan *Mimosa* species. **Applied and Environment Microbiology**, 2016. DOI:10.1128/AEM.04142-15

POLY F.; JOCTEUR MONROZIER, L.; BALLY, R. Improvement in RFLP procedure to study the community of nitrogen fixers in soil through the diversity of nifH gene. **Research in Microbiology**, v.152, n. 1, p. 95-103, 2001.

PONTES, M. M. C. M.; PONTES NETO, C. P.; CHAVES, L. DE F. DE C.; ALBUQUERQUE, S. F. DE; OLIVEIRA, J. DE P.; FIGUEIREDO, M. DO V. B. Dupla inoculação β -rizóbio e micorriza em sabiazeiro visando à recuperação de áreas degradadas. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 17, n. 1, p. 37-45, 2012.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, R. I.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Eds.) **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2003. 823p.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**, Universidade Estadual de Feira de Santana, Royal Botanic Gardens, 2009.

RADL, V.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; LEITE, J.; PASSOS, S. P.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; BALDANI, J. I.; ZILLI, J. E. Microvirga vignae sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 725-730, 2014.

RAMIREZ-BAHENA, M. H.; GARCIA-FRAILE, P.; PEIX, A.; VALVERDE, A.; RIVAS, R.; IGUAL, J. M.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 58, p. 11, p. 2484-2490, 2008.

RECEPE, K.; SAHIN, F.; DEMIRCI, E.; EKEN, C. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains, **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 194-198 2009.

REN, D. W.; CHEN, W. F.; SUI, X. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. *Rhizobium vignae* gen. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 61, n. 3, p. 580-586, 2011.

RIBASKI, J.; LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, V. R. de; DRUMOND, M. A. **Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*): árvore de múltiplo uso no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 4p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 104).

RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F. L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 297-306, 2009.

RIBEIRO, R. A.; MARTINS, T. B.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARCON DELAMUTA, M. J. R.; ROGEL, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium ecuadorensis* gen. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3162-3169, 2015.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of The National Academy of Sciences Of The United States Of America-Biological Sciences**, v. 106, p. 19126-19131, 2009.

RIVAS, R.; WILLEMS A.; PALOMO, J. L.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P. F., MARTÍNEZ-MOLINA E.; GILLIS, M. and 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.

RIVAS, R.; MARTENS, M.; LAJUDIE, P.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analyse of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and Applied Microbiology. Stuttgart**, v. 32, n. 2, p.101-110, 2009.

RIZZINI, C. T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e Florísticos**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., 1997. 747p.

ROSOLEM, C. A. Brazil: acid soils and agriculture. 4p. (Documento apresentado antes do **International Steering Committee of the Symposium Plant-Soil Interactions at Low pH**, Beckley, USA, 24-29 June 1990).

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

SAINI, R.; KUMAR, V.; DUDEJA, S. S.; PATHAK, D. V. Beneficial effects of inoculation of endophytic bacterial isolates from roots and nodules in chickpea. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. n. 10, p. 207-221, 2015.

SALLES, J. F.; ELSAS, J. D.; VEEN, J. A. Effect of agricultural management regime on *Burkholderia* community structure in soil. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 2, p 267–279, 2006.

SAMAC, D. A.; GRAHAM, M. A. Recent advances in legume-microbe interactions: recognition, defense response, and symbiosis from a genomic perspective. **Plant Physiology**, v. 144, n. 2, p. 582-587, 2007.

SAFRONOVA, V. I.; PILUZZA, G.; ZINOVKINA, N. Y.; KIMEKLIS, A. K.; BELIMOV, A. A.; BULLITTA, S. Relationships between pasture legumes, rhizobacteria and nodule bacteria in heavy metal polluted mine waste of SW Sardinia. **Symbiosis**, v. 58, n. 1-3, p. 149-159, 2012.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman e Cia, 1973. 573 p.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S; FERREIRA, L. G. **Mapeamento de cobertura vegetal do bioma Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 205, p.60, 2008.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. **A formação do nódulo em leguminosas**. Seropédica: Embrapa agrobiologia, Documento 251, 2008.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 2014. doi: 10.3389/fgene.2014.00429

SCHUMPP, O; CRÈVECOEUR, M.; BROUGHTON, W. J.; DEAKIN, W. J. Delayed maturation of nodules reduces symbiotic effectiveness of the *Lotus japonicus*–*Rhizobium* sp. NGR234 interaction. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 581-590, 2009.

SCHUMPP, O.; DEAKIN, W. J. How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules? **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 4, p. 1360-138, 2010.

SEO, H. S; LI, J.; LEE, S.-Y. ; YU, J.-W.; KIM, K.-H.; LEE, S.-H.; LEE, I.-J.; PAEK, N.-C. The Hypernodulating nts Mutation Induces Jasmonate Synthetic Pathway in Soybean Leaves. **Molecules and Cells**, v. 24, n. 2, p. 185-193, 2007.

SFB. Os Biomas e Suas Florestas. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/os-biomas-e-suas-florestas>. Acesso em: 23 dez. 2016.

SHEU, S. Y.; CHOU, J. H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; GROSS, E.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; CHEN, W. M. *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 2272-2278, 2012.

SHEU, S. Y.; CHOU, J. H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; GROSS, E., dos REIS JUNIOR F. B.; MELKONIAN, R.; MOULIN, L.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; CHEN, W. M. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 435-441, 2013.

SHEU, S. -Y.; HUANG, H. -W.; YOUNG, C. -C.; CHEN, W. -M. *Rhizobium alvei* gen. nov., isolated from a freshwater river. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 472-478, 2015.

SHIRAISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Beta-proteobacteria *Paraburkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, n. 5, p. 269-274, 2010.

SILVA, K.; FLORENTINO, L. A.; DA SILVA, K. B.; BRANDT, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F. M. S. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with

different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 175-182, 2012.

SILVA, G. B. S.; MELLO, A. Y. I.; STEINKE, V. A. Unidades de conservação no bioma cerrado: desafios e oportunidades para a conservação no Mato Grosso. **Geografia**, v. 37, n. 3, p. 541-554, 2012.

SIMON, M. F.; PROENÇA C. Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high altitude centers of endemism? **Biological Conservation**. v. 96, n.3, p. 279-296, 2000.

SIMON, M. F.; GREYER R.; DE QUEIROZ, L. P.; SÄRKINEN, T. E.; DUTRA, V. F.; HUGHES, C. E. The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): towards a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, v. 98, p. 1201-1221. 2011.

SKORUPSKA, A.; JANCZAREK, M.; MARCZAK, M.; MAZUR, A.; KRÓL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**, Volume 5, Number 7, p. 1-19, 2006.

SOPHEARETH, M.; CHAN, S.; NAING, K.W.; LEE, Y S.; HYUN, H.N.; KIM, Y.C.; Kim, K.Y. Biocontrol of late blight (*Phytophthora capsici*) disease and growth promotion of pepper by *Burkholderia cepacia* MPC-7. **Plant Pathol J.**, v. 29, n. 1, p. 67–76, 2013.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J. C.; DUTRA, S. Germinação de sementes de plantas daninhas de pastagens cultivadas: *Mimosa pudica* e *Ipomoea asarifolia*. **Planta daninha**, Viçosa, v. 19, n. 1, p. 23-31, 2001.

SOS MATA ATLÂNTICA. **Rio Doce - O retrato da qualidade da água**. 2016. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/wp-content/uploads/2017/03/SOSMA_Expedicao_Rio-Doce.pdf> Acesso em: 14 fev 2018.

SPAINK, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **Annual Review of Microbiology**. v. 54, n. 1, p. 257-288, 2000.

SPRENT, J. I. Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4-5, p. 401–407, 1995.

SPRENT, J. I. **Legume nodulation: A global perspective**. Wiley-Blackwell: Chichester, 2009. 184 p.

SPRENT, J. I.; ARDLEY, J.; JAMES, E. K. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. **New phytologist**, v. 215, n. 1, p. 40-56, 2017.

STACKEBRANDT, E.; MURRAY, R. G. E.; TRUPER, H. G. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the 'purple bacteria and their relatives. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 3, p. 321-325, 1988.

STACKEBRANDT, E. Defining Taxonomic Ranks. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H.; Stackebrandt, E. (eds) **The Prokaryotes**. New York: Springer, 2006.

STRALIOTTO, R. Diversidade do rizóbio – Evolução dos estudos taxonômicos. p. 222-254. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta** –

ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 2005. 368p.

SUN, J.; CARDOZA, V.; MITCHELL, D. M.; BRIGHT, L.; OLDROYD, G.; HARRIS, J. M. Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. **The Plant Journal**. v. 46, p. 961-970, 2006. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02751.x

TABARELLI, M; PINTO, L.P. SILVA, J.M.C.; HIROTA, M.M. & BEDÊ, L.C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica. **Megadiversidade**, v.1, n. 1, p. 132-138, 2005.

TAULÉ, C.; ZABALETA, M.; MAREQUE, C.; PLATERO, R.; SANJURJO, L.; SICARDI, M.; FRIONI, L.; BATTISTONI, F.; FABIANO, E. New Betaproteobacterial Rhizobium strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 6, p.1692-1700, 2012.

TROVÃO, D. M. DE B. M.; FERNANDES, P. D.; DE ANDRADE, L. A.; NETO, J. D. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.3, p. 307-311, 2007.

URANO, F. S.; PIRES, A. V.; SUSIN, I.; MENDES, C. Q.; RODRIGUES, G. H.; ARAUJO, R. C. DE; MATTOS, W. R. S. Desempenho e características da carcaça de cordeiros confinados alimentados com grãos de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.10, p. 1525-1530, 2006.

VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; EARDLY, B. D. Phylogenetic relationships among Rhizobium species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International journal of systematic bacteriology**, v.46, n. 1, p. 240-244, 1996.

VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, T. A.; EARDLY, B. D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. **International journal of systematic bacteriology**. v. 48, n. 1 , p. 13-22 1998.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.-M.; VOS, P.; WILLEMS, A. *Paraburkholderia tuberum* sp. nov. and *Paraburkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 25, n. 4, p. 507-512, 2002.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2285-2289, 2004.

VANDAMME, P.; GIOVAN, J.; LIPUMA, J. J. Diversity and role of *Burkholderia* spp. In. COENYE, T.; VANDAMME, P. (Eds). **Burkholderia: Molecular Biology and Genomics**. Norwich: Horizon Scientific Press, 2007, pp. 1–27.

VALE JÚNIOR, J. F.; DE SOUZA, M. I. L; DO NASCIMENTO, P. P. R. R.; CRUZ, D. L. S. Solos da Amazônia: etnopedologia e desenvolvimento sustentável. **Revista Agroambiente on-line**, v. 5, n. 2, p.158-165, 2011.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1979-1983, 2003.

VALVERDE, A.; IGUAL, J. M.; PEIX, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium lusitanum* gen. nov., a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 56, n. 11, p. 2631-2637, 2006.

VINUESA, P.; SILVA, C.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMEROA, 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.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M.. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**. v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 89-103, 2001.

YOUNG, J. M. Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzar and Jones 2001) comb. nov., **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 149, 2004.

WALLACE, A. R. On the monkeys of the Amazon. **Proceedings of the Zoological Society of London.**, v. 14, n.84, p. 451-454, 1852.

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, 2013a.

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 nodules of soybean grown in Daqing City of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 616-624, 2013b.

WALSBY, A. E. Cyanobacterial heterocysts: terminal pores proposed as sites of gas exchange. **Trends in Microbiology**, v.15, n. 8, p. 340-349, 2007.

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

WINK, M. Chapter 11 - Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. In. RAI, M.; CARPINELLA, M. C. Advances in

Phytomedicine (Ed.). **Advances in Phytomedicine**. Elsevier, v. 3, 2006. p. 251-268. doi.org/10.1016/S1572-557X(06)03011-X.

ZHANG, X.; LI, B.; WANG, H.; SUI, X.; MA, X.; HONG, Q.; JIANG, R. *Rhizobium petrolearium* gen. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 1871-1876, 2012.

ZHANG, X. -X.; TANG, X.; SHEIRDIL, R. A.; SUN, L.; MA, X. -T. *Rhizobium rhizoryzae* gen. nov., isolated from rice roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1373-1377, 2014.

ZHANG, X. X.; GAO, J. S.; CAO, Y. H.; SHEIRDIL, R. A.; WANG, X. C.; ZHANG, L. *Rhizobium oryzicola* gen. nov., potential plant-growth-promoting endophytic bacteria isolated from rice roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 2931-2936, 2015.

ZHANG, S.; YANG, S.; CHEN, W.; CHEN, Y.; ZHANG, M.; ZHOU, X.; FAN, G.; FENG, F. Y. *Rhizobium arenae* gen. nov., isolated from the sand of Desert Mu Us, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2098-2103, 2017.

ZHAO, J. J.; ZHANG, J.; SUN, L.; ZHANG, R. J.; ZHANG, C. W.; YIN, H. Q.; ZHANG, X. X. *Rhizobium oryziradicis* sp. nov., isolated from rice roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 963-968, 2017.

ZILLI, J. E.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. **A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009a. 356p.

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 Amazônica**. v. 39, n.4, p. 749-758, 2009b.

ZULETA, L. F. G.; CUNHA, C. O.; DE CARVALHO, F. M.; CIAPINA, F.A M.; SOUZA, R. C.; MERCANTE, F. M.; FARIA, S. M. de; BALDANI, J. I.; STRALIOTTO, R.; HUNGRIA, M.; VASCONCELOS, A. T. R. The complete genome of *Paraburkholderia phenoliruptrix* strain BR3459a, a symbiont of *Mimosa flocculosa*: highlighting the coexistence of symbiotic and pathogenic genes. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 535. 2014.

7. ANEXOS

7.1. Anexo A - Sítios de Coleta

Tabela 15. Dados de localização, características e análise química do solo dos sítios de coleta.

Sítio de coleta	Localização	Altitude	Características da área	pH	Análise Química do solo						COT (%)
					H+Al	AL ⁺³	Mg	Ca	P	K	
					----- cmolc.dm3 -----						
1. Boa Vista (RR)	2°49'48.8", N 60°42'50.0"W	90 m	Perímetro urbano	4,96	-	0,34	0,06	0,12	0,01	0,07	0,21
2. Caracará (RR)	1°49'49.6"N, 61°07'18.0"W	52 m	Solo antropizado - Terra baldio	5,73	-	0,08	0,16	2,59	0,01	0,06	1,28
3. Itapemirim (ES)	20°53'48.9"S, 40°46'47.5"W	5 m	Solo antropizado - Guarapará	6,68	0,04	0,00	0,5	2,52	0,04	0,40	-
4. Itapemirim (ES)	20°53'58.1"S 40°46'53.8"W	7 m	Solo antropizado - Guarapará	6,08	0,05	-	0,12	1,17	0,02	0,04	-
5. Seropédica (RJ)	22°45'58.3"S, 43°40'33.1"W	20 m	Perímetro urbano	6,85	0,00	-	1,04	5,21	0,13	0,43	-
6. Seropédica (RJ)	22°45'37.3"S, 43°41'30.2"W	34 m	Próximo ao Lago da UFRRJ	4,90	5,36	0,56	0,11	0,35	0,01	0,07	1,52
7. Seropédica (RJ)	22°45'34.2"S, 43°41'14.3"W	31 m	Beira de estrada (PESAGRO)	5,47	4,77	0,16	1,36	2,19	0,02	0,43	1,55
8. Rio de Janeiro (RJ)	23°2'56.0"S, 43°31'52.6"W	11 m	Reserva ecológica de Grumarí	-	-	-	-	-	-	-	-
9. Casimiro de Abreu (RJ)	22°28'53.32"S, 42°08'42.5"W	16 m	Beira de estrada	4,88	0,14	-	0,25	2,26	0,04	0,16	-
10. Pentecoste (CE)	3°49'31.4"S, 39°20'38.9"W	-	Caatinga/campo limpo	5,57	12,05	0,20	6,70	5,80	0,00	1,98	3,00
11. Fortaleza (CE)	3°44'24.7"S, 38°34'25.2"W	-	Campus da UFC	5,35	9,90	0,20	2,60	12,60	0,01	2,76	2,67
12. Brasília (DF)	15°43'50.6"S, 47°53'48.1"W	1016 m	Jardim da Embrapa CPAC	7,75	0,75	0,00	0,775	8,10	0,00	0,17	2,43
13. Brasília (DF)	15°43'46.3"S, 47°38'17.3"W	983 m	Antropizada/cobertura de mata	5,45	0,00	0,05	0,86	3,63	0,01	0,72	-
14. Brasília (DF)	15°43'54.1"S 47°53'48.7"W	1016 m	Jardim da Embrapa CPAC	7,60	0,00	-	0,54	8,74	0,01	0,26	-
15. Bananal (SP)	22°37'26.2"S, 44°14'30."3W	484 m	Beira de estrada/Pasto	7,70	-	0,00	0,69	2,85	0,09	0,36	-
16. Bananal (SP)	22°37'26.2"S, 44°14'30."3W	484 m	Beira de estrada/Pasto	6,00	-	0,01	0,25	2,33	0,01	0,31	-
17. Patrocínio de Muriaé (MG)	21°07'43.7"S, 42°11'58.5"W	196 m	Beira de estrada	5,54	-	0,05	1,22	1,65	0,02	0,12	-
18. Lavras (MG)	21°13'00.1"S, 45°02'00.0"W	-	Área de pasto	5,60	-	0,10	2,44	4,17	0,04	0,66	-
19. Morretes (PR)	25°26'43.4"S, 48°48'36.3"W	22 m	Estrada próxima a mata nativa	5,50	2,40	0,00	1,00	2,90	0,08	0,07	1,08
20. Paranaguá (PR)	25°34'17.6"S, 48°39'16.9"W	50 m	Área desmatada para pasto	4,90	3,70	0,60	1,20	1,50	0,01	0,12	1,60
21. Ibicará (BA)	14°53'25.3"S 39°36'50.9"W	34 m	Campo limpo/pasto	5,84	-	0,00	2,82	3,98	0,01	0,19	-
22. Uruçuca (BA)	14°28'12.2"S, 39°04'30.6"W	107	Beira de estradas/próximo a mata	5,86	-	0,00	8,83	5,26	0,05	0,09	-
23. Ilhéus (BA)	14°47'47.4"S, 39°10' 26.8"W	28 m	Áreas do Campus da UESC	-	-	-	-	-	-	-	-
24. Pirenópolis (GO)	15°48'11.0"S, 48°50'29.0"W	1212 m	Cerradão/vegetação nativa	-	-	-	-	-	-	-	-
25. Pirenópolis (GO)	15°48'15.0"S, 48°55'05.0"W	980 m	Cerradão/vegetação nativa	-	-	-	-	-	-	-	-

7.2. Anexo B – Isolados em *M. pudica*

Tabela 16. Resultado da autenticação dos isolados representantes da coleção em *M. pudica* aos 45 dias de cultivo. Sendo: NBR = Número de bactérias representadas; NN = Número de nódulos; † Isolados selecionados para a caracterização molecular estão destacados em negrito; ‡ Padrões de nodulação de acordo com a Figura 12; Nódulo: Pequeno (< 2mm), Médio (2 - 4 mm), Grande (> 4mm).

Isolado†	Hospedeiro original	Grupo	NBR	NN	Perfil de Nodulação‡	BLASTn
----- Bahia -----						
MIM 608	<i>M. tenuiflora</i>	BA-G1	6	27	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. nodosa</i>
MIM 614	<i>M. tenuiflora</i>	BA-G1	*	23	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. nodosa</i>
MIM 507	<i>M. pudica</i>	BA-G2	1	0	SN	–
MIM 511	<i>M. pudica</i>	BA-G3	1	19	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. phymatum</i>
MIM 512	<i>M. pudica</i>	BA-G3	1	13	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 600	<i>M. pudica</i>	BA-G4	3	0	SN	–
MIM 573	<i>Mimosa sp.</i>	BA-G5	5	0	SN	<i>C. gilardii</i>
MIM 585	<i>Mimosa sp.</i>	BA-G5	*	0	SN	<i>Lys. boronitolerans</i>
MIM 584	<i>Mimosa sp.</i>	BA-G5	*	0	SN	<i>C. gilardii</i>
MIM 574	<i>Mimosa sp.</i>	BA-G5	*	0	SN	<i>Lys. macroides</i>
MIM 589	<i>M. pudica</i>	BA-G6	27	15	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 594	<i>M. pudica</i>	BA-G6	*	10	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 508	<i>M. pudica</i>	BA-G6	2	15	(C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo	<i>P. diazotrophica</i>
MIM 509	<i>M. pudica</i>	BA-G6	*	17	(C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo	<i>P. diazotrophica</i>
MIM 588	<i>M. pudica</i>	BA-G6	*	11	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 578	<i>M. pudica</i>	BA-G7	1	0	SN	–
MIM 582	<i>M. pudica</i>	BA-G8	2	0	SN	<i>Lysi. fusiformis</i>
MIM 577	<i>M. pudica</i>	BA-G9	3	0	SN	–
MIM 510	<i>M. pudica</i>	BA-G10	1	10	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>P. diazotrophica</i>
MIM 611	<i>M. pudica</i>	BA-G11	1	0	SN	–
MIM 576	<i>M. pudica</i>	BA-G12	2	0	SN	–
MIM 579	<i>M. pudica</i>	BA-G12	*	0	SN	–
MIM 586	<i>M. pudica</i>	BA-G13	1	0	SN	–
MIM 581	<i>M. pudica</i>	BA-G14	1	0	SN	–
----- Ceará -----						
MIM 155	<i>M. quadrivalvis</i>	CE -G1	4	12	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 150	<i>M. tenuiflora</i>	CE-G2	1	0	SN	–
MIM 144	<i>M. pudica</i>	CE-G3	1	0	SN	<i>Ba. subtilis</i>
MIM 151	<i>M. tenuiflora</i>	CE-G4	1	0	SN	–
MIM 129	<i>Mimosa sp.</i>	CE-G5	2	0	SN	<i>Pse. Alcaligenes</i>
MIM 165	<i>M. pudica</i>	CE-G6	1	0	SN	<i>Paeni. jamilae</i>
MIM 153	<i>M. pudica</i>	CE-G7	1	0	SN	–
MIM 148	<i>Mimosa sp.</i>	CE-G8	2	13	(C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo	<i>P. diazotrophica</i>

Continua...

MIM 200.1	<i>M. pudica</i>	CE-G9	7	7	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>P. diazotrophica</i>
MIM 238b	<i>M. pudica</i>	CE-G10	1	18	(C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo	<i>P. diazotrophica</i>
MIM 223.1	<i>M. pudica</i>	CE-G11	2	5	(A) Pequeno/Claro/Ativo	–
MIM 212	<i>M. pudica</i>	CE-G12	16	9	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. diazotrophica</i>
MIM 188	<i>M. tenuiflora</i>	CE-G13	1	10	(E) Médio/Claro/ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 231	<i>M. tenuiflora</i>	CE-G14	2	8	(E) Médio/Claro/Ativo	–
MIM 223	<i>M. pudica</i>	CE-G15	11	6	(A) Pequeno/Claro/ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 224	<i>M. pudica</i>	CE-G15	*	8	(A) Pequeno/Claro/ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 225	<i>M. pudica</i>	CE-G15	*	14	(A) Pequeno/Claro/ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 205	<i>M. pudica</i>	CE-G16	20	12	(C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo	<i>P. diazotrophica</i>
MIM 221.1	<i>M. pudica</i>	CE-G17	1	0	SN	<i>Dyella marensis</i>
MIM 149	<i>M. tenuiflora</i>	CE-G18	1	14	(A) Pequeno/Claro/ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 162	<i>M. quadrivalvis</i>	CE-G19	1	0	SN	–
MIM 209	<i>M. pudica</i>	CE-G20	1	14	(B) Pequeno/Claro/inativo	<i>R. multihospitium</i>
----- Distrito Federal -----						
MIM 401	<i>M. caesalpinifolia</i>	DF-G1	1	0	SN	–
MIM 357	<i>M. pudica</i>	DF-G2	26	2	(J) Grande/Claro/Ativo	<i>R. altiplani</i>
MIM 373	<i>M. pudica</i>	DF-G2	*	3	(J) Grande/Claro/Ativo	<i>R. altiplani</i>
MIM 382	<i>M. pudica</i>	DF-G3	14	8	(D) Pequeno/Claro e Escudo/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 413	<i>M. setosa</i>	DF-G4	*	16	(A) Pequeno/Claro/Ativo	–
MIM 417	<i>M. setosa</i>	DF-G4	14	23	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 412	<i>M. setosa</i>	DF-G4	*	20	(C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo	–
MIM 424	<i>M. candolei</i>	DF-G5	1	0	SN	–
MIM 425	<i>M. pudica</i>	DF-G6	1	14	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 395	<i>M. candolei</i>	DF-G7	2	0	SN	–
MIM 400	<i>M. candolei</i>	DF-G8	4	9	(E) Médio/Claro/Ativo	–
MIM 377	<i>M. candolei</i>	DF-G9	1	0	SN	–
MIM 371	<i>M. pudica</i>	DF-G10	1	0	SN	–
MIM 399	<i>M. candolei</i>	DF-G11	1	0	SN	–
MIM 423	<i>M. pudica</i>	DF-G12	1	0	SN	–
MIM 378.1	<i>M. candolei</i>	DF-G13	2	15	(C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo	<i>P. diazotrophica</i>
MIM 525	<i>M. pudica</i>	DF-G14	57	3	(J) Grande/Claro/Ativo	<i>R. altiplani</i>
MIM 542	<i>M. pudica</i>	DF-G14	*	2	(J) Grande/Claro/Ativo	<i>R. altiplani</i>
MIM 571	<i>M. pudica</i>	DF-G14	*	3	(J) Grande/Claro/Ativo	<i>R. altiplani</i>
MIM 540	<i>M. pudica</i>	DF-G14	*	3	(J) Grande/Claro/Ativo	<i>R. altiplani</i>
MIM 528	<i>M. pudica</i>	DF-G15	1	0	SN	<i>P. phenoliruptrix</i>
MIM 553	<i>M. pudica</i>	DF-G16	1	0	SN	<i>Sphi. Endophytica</i>
----- Espírito Santo -----						
MIM 317	<i>Ma. atropurpureum</i>	ES-G1	1	0	SN	–
MIM 320	<i>Ma. atropurpureum</i>	ES-G2	1	0	SN	–
MIM 319	<i>Ma. atropurpureum</i>	ES-G3	1	0	SN	–

Continua...

MIM 156	<i>Mimosa sp.</i>	ES-G4	2	11	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 157b	<i>Mimosa sp.</i>	ES-G4	*	13	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 316	<i>M. pudica</i>	ES-G5	1	13	(G) Médio/Claro/Ativo e Inativo	<i>P. mimosarum</i>
MIM 326	<i>M. candollei</i>	ES-G6	1	34	(B) Pequeno/Claro/Inativo	<i>P. phenoliruptrix</i>
MIM 159	<i>Mimosa sp.</i>	ES-G7	3	0	SN	–
MIM 322	<i>M. candollei</i>	ES-G8	4	0	SN	–
MIM 323	<i>Ma. atropurpureum</i>	ES-G9	1	35	(G) Médio/Claro/Ativo e Inativo	<i>P. mimosarum</i>
MIM 158	<i>Mimosa sp.</i>	ES-G10	1	0	SN	–
----- Goiás -----						
MIM 404	<i>M. setosa</i>	GO-G1	1	0	SN	<i>Pse. intermedium</i>
MIM 402	<i>M. setosa</i>	GO-G2	2	0	SN	–
MIM 406	<i>M. setosa</i>	GO-G3	2	0	SN	–
MIM 407	<i>M. candollei</i>	GO-G4	2	20	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 736	<i>M. gracilis</i>	GO-G5	11	9	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 739	<i>M. pyrynea</i>	GO-G5	*	13	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 741	<i>M. pyrynea</i>	GO-G5	*	10	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 730	<i>M. speciosissima</i>	GO-G5	4	25	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. nodosa</i>
MIM 735	<i>M. speciosissima</i>	GO-G5	*	22	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. nodosa</i>
MIM 753	<i>M. somnians</i>	GO-G6	8	15	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 745	<i>M. pyrynea</i>	GO-G6	*	14	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 761	<i>M. radula</i>	GO-G6	2	20	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. nodosa</i>
MIM 763	<i>M. radula</i>	GO-G7	2	13	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. mimosarum</i>
MIM 749	<i>M. macrocephala</i>	GO-G8	2	12	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 759	<i>M. radula</i>	GO-G8	16	27	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. nodosa</i>
MIM 734	<i>M. speciosissima</i>	GO-G8	*	30	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. nodosa</i>
----- Minas Gerais -----						
MIM 472	<i>Ma. atropurpureum</i>	MG-G1	2	0	SN	–
MIM 471	<i>Ma. atropurpureum</i>	MG-G2	5	0	SN	–
MIM 476	<i>Ma. atropurpureum</i>	MG-G3	1	0	SN	–
MIM 501	<i>V. unguiculata</i>	MG-G4	1	0	SN	<i>Brady. elkani</i>
MIM 499	<i>V. unguiculata</i>	MG-G5	5	0	SN	–
MIM 466	<i>Ma. atropurpureum</i>	MG-G6	5	0	SN	–
MIM 444	<i>M. pudica</i>	MG-G7	46	11	(H) Médio/Claro e Escuro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 450	<i>M. pudica</i>	MG-G8	1	9	(H) Médio/Claro e Escuro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 474	<i>Ma. atropurpureum</i>	MG-G9	1	0	SN	–
MIM 475	<i>Ma. atropurpureum</i>	MG-G10	1	0	SN	–
MIM 470	<i>Ma. atropurpureum</i>	MG-G11	1	0	SN	–
MIM 463	<i>Ma. atropurpureum</i>	MG-G12	2	0	SN	–
MIM 502	<i>V. unguiculata</i>	MG-G13	1	0	SN	–
MIM 468	<i>Ma. atropurpureum</i>	MG-G14	1	0	SN	–
MIM 479	<i>S. virgata</i>	MG-G15	1	0	SN	–

Continua...

MIM 484	<i>S. virgata</i>	MG-G16	1	0	SN	<i>Az. Doebereineriae</i>
MIM 313	<i>M. pudica</i>	MG-G17	11	0	SN	–
MIM 485	<i>S. virgata</i>	MG-G17	*	0	SN	–
MIM 473	<i>Ma. atropurpureum</i>	MG-G18	1	4	(D) Pequeno/Claro e Escuto/Ativo	<i>Rhizobium pisi</i>
----- Paraná -----						
MIM 619	<i>M. pudica</i>	PR-G1	2	12	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. mimosarum</i>
MIM 622	<i>M. pudica</i>	PR-G2	14	0	SN	–
MIM 633	<i>M. pudica</i>	PR-G2	*	0	SN	–
MIM 631	<i>M. pudica</i>	PR-G3	13	15	(B) Pequeno/Claro/Inativo	–
MIM 647	<i>M. pudica</i>	PR-G3	*	14	(B) Pequeno/Claro/Inativo	–
MIM 626	<i>M. pudica</i>	PR-G4	1	13	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. mimosarum</i>
MIM 646	<i>M. pudica</i>	PR-G5	14	0	SN	<i>Enterobacter asburiae</i>
MIM 650	<i>M. pudica</i>	PR-G5	*	0	SN	–
MIM 660	<i>M. pudica</i>	PR-G5	*	0	SN	–
MIM 648	<i>M. pudica</i>	PR-G6	2	0	SN	–
----- Rio de Janeiro -----						
MIM 146	<i>M. pudica</i>	RJ-G1	16	0	SN	–
MIM 430	<i>M. pudica</i>	RJ-G2	1	21	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 255	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G3	28	11	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>P. mimosarum</i>
MIM 139	<i>M. pudica</i>	RJ-G4	1	20	(B) Pequeno/Claro/Inativo	<i>Rhizobium sp.</i>
MIM 86	<i>M. pudica</i>	RJ-G5	38	16	(B) Pequeno/Claro/Inativo	<i>P. mimosarum</i>
MIM 327	<i>M. pudica</i>	RJ-G6	4	10	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. mimosarum</i>
MIM 103	<i>M. pudica</i>	RJ-G7	4	0	SN	<i>Ba. pumilus</i>
MIM 330	<i>M. pudica</i>	RJ-G8	2	9	(C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo	<i>P. mimosarum</i>
MIM 56	<i>M. pudica</i>	RJ-G9	3	12	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 79	<i>M. pudica</i>	RJ-G10	18	13	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 69	<i>M. pudica</i>	RJ-G11	4	12	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>C. necator</i>
MIM 67	<i>M. pudica</i>	RJ-G12	5	13	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 85	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G13	2	0	SN	–
MIM 251	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G14	3	13	(C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo	<i>P. mimosarum</i>
MIM 73	<i>M. pudica</i>	RJ-G15	2	9	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 10	<i>M. pudica</i>	RJ-G16	3	9	(B) Pequeno/Claro/inativo	<i>P. sabiae</i>
MIM 283.1	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G17	3	16	(B) Pequeno/Claro/Inativo	<i>P. sabiae</i>
MIM 137	<i>M. pudica</i>	RJ-G18	3	0	SN	–
MIM 270	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G19	4	5	(E) Médio/Claro/Ativo	–
MIM 37	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G20	14	23	(D) Pequeno/Claro e Escuto/Ativo	<i>P. nodosa</i>
MIM 51	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G20	*	48	(D) Pequeno/Claro e Escuto/Ativo	<i>P. nodosa</i>
MIM 506	<i>Phaseolus vulgaris</i>	RJ-G21	2	0	SN	–
MIM 492	<i>V. unguiculata</i>	RJ-G21	*	0	SN	–
MIM 167	<i>M. pudica</i>	RJ-G22	1	0	SN	–
MIM 166	<i>Sophora tomentosa</i>	RJ-G23	1	0	SN	–

Continua...

MIM 84	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G24	1	0	SN	–
MIM 78	<i>M. pudica</i>	RJ-G25	1	13	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>R. multihospitium</i>
MIM 263	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G26	3	9	(C) Pequeno/Claro/Ativo e Inativo	–
MIM 145	<i>M. pudica</i>	RJ-G27	1	0	SN	–
MIM 23	<i>M. pudica</i>	RJ-G28	10	23	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. phymatum</i>
MIM 12	<i>M. quadrivalvis</i>	RJ-G29	*	11	(A) Pequeno/Claro/Ativo	–
MIM 14	<i>M. pudica</i>	RJ-G29	12	17	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. phymatum</i>
MIM 27	<i>M. pudica</i>	RJ-G30	4	11	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. nodosa</i>
MIM 29	<i>M. pudica</i>	RJ-G31	7	15	(B) Pequeno/Claro/Inativo	–
MIM 59	<i>M. pudica</i>	RJ-G32	3	17	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 147	<i>M. pudica</i>	RJ-G33	1	0	SN	–
MIM 57	<i>M. pudica</i>	RJ-G34	3	14	SN	<i>Herb. aquaticum</i>
MIM 260	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G35	1	14	(F) Médio/Claro/Inativo	<i>P. mimosarum</i>
MIM 83	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G36	1	0	SN	–
MIM 54	<i>M. pudica</i>	RJ-G37	1	17	(H) Médio/Claro e Escuro/Ativo	<i>C. necator</i>
MIM 62	<i>M. pudica</i>	RJ-G38	1	0	SN	<i>Labrys neptuniae</i>
MIM 140	<i>M. pudica</i>	RJ-G39	1	0	SN	–
MIM 126	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G40	1	0	SN	–
MIM 127	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G41	1	0	SN	–
MIM 49	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G42	1	16	SN	<i>Paeni. favisporus</i>
MIM 52	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G43	1	36	(D) Pequeno/Claro e Escuro/Ativo	<i>P. nodosa</i>
MIM 53	<i>Mimosa sp.</i>	RJ-G44	1	31	(H) Médio/Claro e Escuro/Ativo	<i>P. nodosa</i>
MIM 617	<i>M. velloziana</i>	RJ-G45	2	15	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 618	<i>M. velloziana</i>	RJ-G46	1	0	SN	–
----- São Paulo -----						
MIM 331	<i>M. pudica</i>	SP-G1	2	16	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 332	<i>M. pudica</i>	SP-G1	*	12	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 333	<i>M. pudica</i>	SP-G2	1	15	(B) Pequeno/Claro/Inativo	<i>P. phenoliruptrix</i>
----- Roraima -----						
MIM 347	<i>Mimosa sp.</i>	RR-G1	1	9	(E) Médio/Claro/Ativo	<i>P. diazotrophica</i>
MIM 339	<i>Mimosa sp.</i>	RR-G2	2	9	(B) Pequeno/Claro/Inativo	<i>P. phenoliruptrix</i>
MIM 338	<i>Mimosa sp.</i>	RR-G3	1	11	(D) Pequeno/Claro e Escuro/Ativo	<i>P. phenoliruptrix</i>
MIM 340	<i>Mimosa sp.</i>	RR-G3	9	9	(D) Pequeno/Claro e Escuro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 345	<i>M. pudica</i>	RR-G4	2	12	(I) Médio/Escuro/Ativo	<i>P. diazotrophica</i>
MIM 175	<i>M. pudica</i>	RR-G4	2	11	(I) Médio/Escuro/Ativo	<i>P. tuberum</i>
MIM 180	<i>M. pudica</i>	RR-G5	13	3	(J) Grande/Claro/Ativo	<i>R. mesoamericanum</i>
MIM 185	<i>M. pudica</i>	RR-G5	*	2	(J) Grande/Claro/Ativo	<i>R. mesoamericanum</i>
MIM 170	<i>M. pudica</i>	RR-G6	4	32	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 168	<i>M. pudica</i>	RR-G6	*	24	(A) Pequeno/Claro/Ativo	<i>C. taiwanensis</i>
MIM 179	<i>M. pudica</i>	RR-G7	1	0	SN	–
MIM 349	<i>Mimosa sp.</i>	RR-G8	1	0	SN	–

* NBR incluso em informações de outro representante do grupo.

7.3. Anexo C – Marcadores Moleculares

Tabela 17. Protocolos de amplificação dos marcadores moleculares utilizado na caracterização dos isolados.

Gene	Primer	Gênero alvo	Sequência do primer (5' – 3')	Reação	Ciclos de amplificação	Literatura
----- <i>Fingerprinting</i> -----						
Box-PCR	BoxAR1	Todos	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75mM; dNTP 0,3μM; Primers: 1μM; Taq pol.: 1U/μL)	30x (T1: 95°C, 60 sec T2: 53°C, 60 sec T3: 65°C, 480 sec)	Hungria et al. (2008)
----- <i>Gene Ribossomal</i> -----						
16S <i>rRNA</i>	27 F 1492 R	Todos	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75mM; dNTP 0,3μM; Primers: 1μM; Taq pol.: 1U/μL)	30x (T1: 94°C, 60 sec T2: 53°C, 120 sec T3: 72°C, 120 sec)	Weisburg et al. (1991)
----- <i>Gene housekeeping</i> -----						
<i>recA</i>	Burk recA F Burk recA R	<i>Paraburkholderia</i>	GATCGARAAGCAGTTCGGCAA TTGTCCTGCCCTGRCCGAT	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol.: 1,25 U/μL)	35x (T1: 94°C, 30 sec T2: 55°C, 30 sec T3: 72°C, 30sec)	Mishra et al. (2012)
	Cupri recA F Cupri recA R	<i>Cupriavidus</i>	CAGATYGAGAAGCAGTTTGGCAA TCGATGATYTCACCCTGGCG	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol.: 1,25 U/μL)	35x (T1: 94°C, 60 sec T2: 53°C, 45 sec T3: 72°C, 60 sec)	Andrus et al. (2012)
	41 F 640 R	<i>Rhizobium</i>	TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG ACATSACRCCGATCTTCATGC	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol.: 1,25 U/μL)	35x (T1: 95°C, 45 sec T2: 56°C, 60 sec T3: 72°C, 90 sec)	Vinuesa et al. (2005)
----- <i>Gene Simbióticos</i> -----						
<i>nodC</i>	nodCBurk2 F nodCBurk2 R	<i>Paraburkholderia</i>	ACTSATACTYAACGTMGAYTC GMRAAYCCRAGAAATCGAAG	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol.: 1,25 U/μL)	35x (T1: 95°C, 30 sec T2: 51°C, 30 sec T3: 72°C, 120 sec)	Bontemps et al. (2010)

Continua...

<i>nodC</i>	nocCCtai468 F	<i>Cupriavidus</i>	TGATYGAYATGGARTAYTGGCT	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol.: 1,25 U/μL)	35x (T1: 95°C, 60 sec T2: 50°C, 60 sec T3: 72°C, 120 sec)	Mishra et al. (2012)
	nocCCtai1231 R		CGYGACARCCARTCGCTRRTG			
	540 F	<i>Rhizobium</i>	TGATYGAYATGGARTAYTGGCT	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol.: 1,25 U/μL)	35x (T1: 94°C, 30 sec T2: 50°C, 30 sec T3: 72°C, 45 sec)	Mishra et al. (2012)
	1160 R		CGYGACARCCARTCGCTRRTG			
<i>nifH</i>	Burk nifH F	<i>Paraburkholderia</i>	CGCNWTYTACGNAARGGNGG	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol.: 1,25 U/μL)	35x (T1: 95°C, 60 sec T2: 50°C, 120 sec T3: 72°C, 120 sec)	Chen et al. (2005)
	Burk nifH R		GNKCR TAYTSGATNACNGTCAT			
	nhcf3	<i>Cupriavidus</i>	AAGTCGACTACCTCGCAGAACAC	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol.: 1,25 U/μL)	40x (T1: 94°C, 60 sec T2: 50°C, 120 sec T3: 72°C, 120 sec)	Adam et al. (2007)
	nhcr4		CCTTCGCTCGTTACAGATCAAC			
	nifH F	<i>Rhizobium</i>	CGCIWTYTACGGIAARGGIGG	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 3 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 1 μM; Taq pol.: 2,5 U/μL)	35x (T1: 94°C, 45 sec T2: 50°C, 60 sec T3: 72°C, 60 sec)	Chen et al. (2005)
	nifH R		GGIKCR TAYTSGATIACIGTCAT			
	Pol F	Todos	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 3 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 1 μM; Taq pol.: 2,5 U/μL)	35x (T1: 94°C, 45 sec T2: 50°C, 60 sec T3: 72°C, 60 sec)	Poly et al. (2001)
	Pol R		ATSGCCATCATYTCRCCGGA			

*T1, T2 e T3 referem-se as etapas de desnaturação, anelamento extensão dos fragmentos de DNA, respectivamente.

7.4. Anexo D – Estudo Taxonômico

Tabela 18. Número de acesso das sequências utilizadas no estudo taxonômico das bactérias isoladas de nódulos de mimosas do Brasil.

Isolado	Estado	pH do solo	Planta hospedeira	BLASTn (16S <i>rRNA</i>)	Número de referência			
					16S <i>rRNA</i>	<i>recA</i>	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
----- Isolados Nodulíferos -----								
MIM 185	RR	5,73	<i>M. pudica</i>	<i>R. mesoamericanum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 139	RJ	6,85	<i>M. pudica</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	(Submetido)	(Submetido)	-	(Submetido)
MIM 373	DF	-	<i>M. pudica</i>	<i>R. altiplani sp nov.</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 180	RR	5,73	<i>M. pudica</i>	<i>R. mesoamericanum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 78	RJ	6,85	<i>M. pudica</i>	<i>R. multihospitium</i>	(Submetido)	(Submetido)	-	(Submetido)
MIM 473	MG	5,6	<i>Planta isca</i>	<i>R. pisi</i>	(Submetido)	(Submetido)	-	(Submetido)
MIM 209 (A)	CE	5,57	<i>M. pudica</i>	<i>R. multihospitium</i>	(Submetido)	(Submetido)	-	(Submetido)
MIM 542	DF	7,75	<i>M. pudica</i>	<i>R. altiplani sp nov.</i>	KX022638	KX022648	KX022678	KX022685
MIM 357	DF	-	<i>M. pudica</i>	<i>R. altiplani sp nov.</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 525	DF	7,75	<i>M. pudica</i>	<i>R. altiplani sp nov.</i>	KX022634	KX022644	KX022674	KX022684
MIM 571	DF	7,75	<i>M. pudica</i>	<i>R. altiplani sp nov.</i>	KX022643	KX022653	KX022683	KX022686
MIM 540	DF	5,45	<i>M. pudica</i>	<i>R. altiplani</i>	-	-	-	-
MIM 332	SP	7,7	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 331	SP	7,7	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 170	RR	5,73	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 168	RR	5,73	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 450	MG	5,6	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 67	RJ	6,85	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)

Continua...

MIM 430	RJ	6,85	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 79	RJ	6,85	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 59	RJ	6,85	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 56	RJ	6,85	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 155 a1	CE	5,57	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 192 b2	CE	5,57	<i>M. tenuiflora</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 188 b	CE	5,57	<i>M. tenuiflora</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 190 a	CE	5,57	<i>M. tenuiflora</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 213 c	CE	5,57	<i>M. tenuiflora</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 224 a	CE	5,57	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 149 c	CE	5,57	<i>M. tenuiflora</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 223 b	CE	5,57	<i>M. pudica</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 157 b	ES	6,68	<i>Mimosa sp.</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 156	ES	6,68	<i>Mimosa sp.</i>	<i>C. taiwanensis</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 69	RJ	6,85	<i>M. pudica</i>	<i>C. necator</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 54	RJ	6,85	<i>M. pudica</i>	<i>C. necator</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 86	RJ	4,9	<i>M. pudica</i>	<i>P. mimosarum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 330	RJ	4,88	<i>M. pudica</i>	<i>P. mimosarum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 327	RJ	4,88	<i>M. pudica</i>	<i>P. mimosarum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 260	RJ	5,47	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. mimosarum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 255	RJ	5,47	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. mimosarum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 251	RJ	5,47	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. mimosarum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 619	PR	5,5	<i>M. pudica</i>	<i>P. mimosarum</i>	-	(Submetido)	-	-

Continua...

MIM 626	PR	5,5	<i>M. pudica</i>	<i>P. mimosarum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 316	ES	6,08	<i>M. pudica</i>	<i>P. mimosarum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 763	GO	ND	<i>M. radula</i>	<i>P. mimosarum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 53	RJ	5,7	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 52	RJ	5,7	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 51	RJ	5,7	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 37	RJ	5,7	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 27	RJ	5,7	<i>M. pudica</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 614	BA	5,84	<i>M. pudica</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 730	GO	ND	<i>M. speciosissima</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 734	GO	ND	<i>M. speciosissima</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 735	GO	ND	<i>M. speciosissima</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 761	GO	ND	<i>M. radula</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 759	GO	ND	<i>M. radula</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 608	BA	5,84	<i>M. tenuiflora</i>	<i>P. nodosa</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 73	RJ	6,85	<i>M. pudica</i>	<i>P. tuberosum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 444	MG	5,64	<i>M. pudica</i>	<i>P. tuberosum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 407	GO	5,59	<i>M. candollei</i>	<i>P. tuberosum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 739	GO	ND	<i>M. pyrinaea</i>	<i>P. tuberosum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 748	GO	ND	<i>M. macrocephala</i>	<i>P. tuberosum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 753	GO	ND	<i>M. somnians</i>	<i>P. tuberosum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 749	GO	ND	<i>M. macrocephala</i>	<i>P. tuberosum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 741	GO	ND	<i>M. pyrinaea</i>	<i>P. tuberosum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 736	GO	ND	<i>M. gracilis</i>	<i>P. tuberosum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)

Continua...

MIM 340	RR	4,96	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. tuberum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 175	RR	5,73	<i>M. pudica</i>	<i>P. tuberum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 512	BA	ND	<i>M. pudica</i>	<i>P. tuberum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 417	DF	4,85	<i>Mimosa setosa</i>	<i>P. tuberum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 589	BA	5,86	<i>M. pudica</i>	<i>P. tuberum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 594	BA	5,86	<i>M. pudica</i>	<i>P. tuberum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 617	RJ	ND	<i>M. velloziana</i>	<i>P. tuberum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 588	BA	5,87	<i>M. pudica</i>	<i>P. tuberum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 425	DF	5,19	<i>M. pudica</i>	<i>P. tuberum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 745	GO	ND	<i>M. pyrinaea</i>	<i>P. tuberum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 382	DF	5,19	<i>M. pudica</i>	<i>P. tuberum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 333	SP	7,7	<i>M. pudica</i>	<i>P. phenoliruptrix</i>	(Submetido)	(Submetido)	-	(Submetido)
MIM 339	RR	4,96	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. phenoliruptrix</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 326	ES	6,08	<i>M. candollei</i>	<i>P. phenoliruptrix</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 528	DF	7,75	<i>M. pudica</i>	<i>P. phenoliruptrix</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 338	RR	4,96	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. phenoliruptrix</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 323	ES	6,08	<i>M. candollei</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	-	(Submetido)
MIM 200 (B)	CE	5,35	<i>M. pudica</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 148 c2	CE	5,57	<i>M. tenuiflora</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 378.1	DF	4,97	<i>M. candollei</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	-	(Submetido)
MIM 345	RR	4,96	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 200.1	CE	5,35	<i>M. pudica</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 212	CE	5,35	<i>M. tenuiflora</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)

Continua...

MIM 238 b	CE	5,35	<i>M. pudica</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 509	BA	5,87	<i>M. pudica</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 510	BA	5,87	<i>M. pudica</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 508	BA	5,87	<i>M. pudica</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 347	RR	4,96	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. diazotrophica</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 23	RJ	5,7	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. phymatum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 511	BA	5,87	<i>M. pudica</i>	<i>P. phymatum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 14	RJ	5,7	<i>M. quadrivalvis</i>	<i>P. phymatum</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 283.1	RJ	5,47	<i>Mimosa sp.</i>	<i>P. sabiae</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
MIM 688	BA	6,87	<i>M. polydactyla</i>	-	-	-	-	-
MIM 10	RJ	ND	<i>M. pudica</i>	<i>P. sabiae</i>	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)	(Submetido)
----- Isolados não-nodulíferos -----								
MIM 573	BA	6,92	<i>Mimosa sp.</i>	<i>Cupriavidus gilardii</i>	(Submetido)	-	-	-
MIM 584	BA	6,92	<i>M. pudica</i>	<i>Cupriavidus gilardii</i>	(Submetido)	-	-	-
MIM 404	GO	4,8	<i>M. setosa</i>	<i>Ps. intermedius</i>	(Submetido)	-	-	-
MIM 501	MG	5,60	<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Brady.. elkanii</i>	(Submetido)	-	-	-
MIM 484	MG	5,60	<i>Sesbania virgata</i>	<i>Azorhi.. doebereineriae</i>	-	-	-	-
MIM 737	GO	ND	<i>M. gracilis</i>	<i>Burkholderia latens</i>	-	-	-	-
MIM 221.1	CE	5,57	<i>M. pudica</i>	<i>Dyella sp.</i>	-	-	-	-
MIM 646	PR	4,9	<i>M. pudica</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	-	-	-	-
MIM 57	RJ	ND	<i>M. pudica</i>	<i>Herbaspirillum sp.</i>	-	-	-	-
MIM 62	RJ	ND	<i>M. pudica</i>	<i>Labrys sp.</i>	-	-	-	-

Continua...

MIM 585	BA	ND	<i>M. pudica</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	–	–	–	–
MIM 582	BA	ND	<i>M. pudica</i>	<i>Lysinibacteria fusiformis</i>	–	–	–	–
MIM 574	BA	ND	<i>M. pudica</i>	<i>Lysini. macroides</i>	–	–	–	–
MIM 144	CE	5,35	<i>M. pudica</i>	<i>Bacillus sp.</i>	–	–	–	–
MIM 103	RJ	4,9	<i>M. pudica</i>	<i>Bacillus sp.</i>	–	–	–	–
MIM 49	RJ	ND	<i>Mimosa sp.</i>	<i>Paenibacillus sp.</i>	–	–	–	–
MIM 165b	CE	5,35	<i>Mimosa sp.</i>	<i>Paenibacillus sp.</i>	–	–	–	–
MIM 129B	CE	5,35	<i>Mimosa sp.</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	–	–	–	–
MIM 553	DF	5,73	<i>M. pudica</i>	<i>Sphing. endophytica</i>	–	–	–	–
MIM 743	GO	ND	<i>M. pyrinaea</i>	<i>Steno.maltophilia</i>	–	–	–	–
MIM 225B	CE	ND	<i>M. pudica</i>	<i>Steno.maltophilia</i>	–	–	–	–
MIM 719	GO	ND	<i>M. speciosissima</i>	<i>Steno. maltophilia</i>	–	–	–	–

----- Estirpes de referência/ Estirpes de outros estudos -----

CCGE501 ^T	México	López-Lopés et al. (2012)	<i>R. mesoamericanum</i>	JF424606	JF424620	JN021931	JN021929
STM 3625	Guiana Francesa	Mishra et al. (2012)	<i>R. mesoamericanum</i>	FN908411	FR865167	FR853109	FN908430
CCGE502 ^T	México	López-Lopés et al. (2012)	<i>R. grahamii</i>	JF424608	JF424622	JN021932	JN021930
CIAT899 ^T	–	van Berkum et al. (1998)	<i>R. tropici</i>	U89832	EU488815	JN580681	JX863573
CCBAU85039 ^T	China		<i>R. tibeticum</i>	NR116254	HQ735075	FNXB01000073	EU407189
CFN42 ^T	–	van Berkum et al. (1996)	<i>R. etli</i>	U28916	CP000133	U80928	NC004041
DSM30132 ^T	–	Ramirez-Bahena et al. (2008)	<i>R. pisi</i>	AY509899	EF113134	HQ394248	HQ394248
CCBAU83401 ^T	China	Han et al. (2008)	<i>R. multihospitium</i>	EF035074	EF490029	EF050781	EF490070
LMG 8453 ^T	Estados Unidos	Balkwill (1999)	<i>C. necator</i>	AF191737	AF312928	–	–
UFLA02-71	Brasil	Silva et al. (2012)	<i>C. necator</i>	HQ684034	–	HQ684066	HQ684060

Continua...

UFLA01-669	Brasil	Silva et al. (2012)	<i>C. necator</i>	HQ684033	–	HQ684065	HQ684059
UYPR2.55	Uruguai	Taule et al. (2012)	<i>C. necator</i>	JF683702	–	HQ684062	JF683709
UYPR2.512	Uruguai	Taule et al. (2012)	<i>C. necator</i>	JF683703	KB903159	KB903211	KB902882
UYMS13B	Uruguai	Platero et al. (2016)	<i>C. necator</i>	KP733700	KT198756	–	KP733707
LMG 19424 ^T	Taiwan	Chen et al. (2001)	<i>C. taiwanensis</i>	AF300324	CU633749	AJ505303	AJ505320
STM6018	Guiana Francesa	Mishra et al. (2012)	<i>C. taiwanensis</i>	FN908410	FR669122	FR853112	FN908429
Mapud10.1	Costa Rica	Barrett et al. (2006)	<i>C. taiwanensis</i>	AY691392	HM145811	KP135647	EF374081
Tpig.6A	Costa Rica	Barrett et al. (2006)	<i>C. taiwanensis</i>	AY691391	HM145813	KP135663	EF374078
SWF65028	China	Liu et al. (2012)	<i>C. taiwanensis</i>	GU045471	–	–	HQ896498
UYMM02A	Uruguai	Platero et al. (2016)	<i>C. pinatubonensis</i>	KP733704.	KT198755	–	KP733706
STM 678 ^T	Guiana Francesa	Moulin et al. (2001)	<i>P. tuberum</i>	AJ302311	HQ849162	AJ306730	AJ302315
STM3649	Guiana Francesa	Mishra et al. (2012)	<i>P. tuberum</i>	FN908403	FR669125	FR853110	FN908425
JPY481	Brasil	Bontemps et al. (2010)	<i>P. tuberum</i>	FN543764	FN543907	FN543625	FN544043
BR3437 ^T	Brasil	Chen et al. (2007)	<i>P. nodosa</i>	NR043181	EU294398	–	–
BRUESC947	Brasil	Silva et al. (2015)	<i>P. nodosa</i>	KT390930	KT390889	KT390848	KT390807
JPY294	Brasil	Bontemps et al. (2010)	<i>P. nodosa</i>	FN543688	FN543831	FN543550	FN543971
STM7353	Brasil	Bournaud et al.(2013)	<i>P. nodosa</i>	–	–	HF536767	HF536761
PAS44 ^T	Taiwan	Chen et al. (2006)	<i>P. mimosarum</i>	NR043167	EU294396	EU386155	AY883420
JPY321	Brasil	Bontemps et al. (2010)	<i>P. mimosarum</i>	FN543702	FN543845	FN543566	FN543985
STM3621	Guiana Francesa	Mishra et al. (2012)	<i>P. mimosarum</i>	FN908408	FR669124	FR853108	FN908428
JPY461 ^T	Brasil	Bontemps et al. (2010)	<i>P. diazotrophica</i>	FN543755	FN543898	FN543616	FN544034
STM4206	Guiana Francesa	Mishra et al. (2012)	<i>P. diazotrophica</i>	FN908402	FR669126	FR853111	FN908424
STM815 ^T	Venezuela	Vandamme et al. (2002)	<i>P. phymatum</i>	NR074668	AY619667	NC010627	AJ505319

Continua...

BR3407 ^T	Brasil	Chen et al. (2005a)	<i>P. sabiae</i>	AY533862	EU294397	–	AY533867
BRUESC861	Brasil	Silva et al. (2015)	<i>P. sabiae</i>	KT390907	KT390866	KT390825	KT390784
AC1100 ^T	–	Coenye et al. (2004)	<i>P. phenoliruptrix</i>	AY435213	HQ398589	–	–
BR3459a	Brasil	Cunha et al. (2012)	<i>P. phenoliruptrix</i>	–	–	NC018696	CP003865
MWAP64 ^T	Caribe	Achouak et al. (1999)	<i>P. caribensis</i>	NR026462	HQ398576	–	–
JPY268	Brasil	Bontemps et al. (2010)	<i>Paraburkholderia sp.</i>	FN543672	FN543815	FN543534	FN543955
JPY585	Brasil	Bontemps et al. (2010)	<i>Paraburkholderia sp.</i>	FN543776	FN543919	FN543634	FN544054

7.5. Anexo E – Capacidade de Oxidação de Fontes de Carbono

Tabela 19. Capacidade de estirpes de *Rhizobium altiplani*, *R. grahamii* e *R. mesoamericanum* oxidar fontes de carbono isoladas em microplacas Biolog GN2. Resultados obtidos a partir dos valores médios de três repetições após 72h de incubação a 28°C (+ = Reação positiva; F = Reação fraca; – = Reação negativo). As categorias de fontes de carbono estão dispostas de acordo com Garland & Mills (1991). 1 = BR 10423^T; 2 = BR 10424; 3 = BR 10427; 4 = BR 10432; 5 = CCGE 501^T; 6 = CCGE 502^T.

Carboidratos	1	2	3	4	5	6	Ácido Carboxílico	1	2	3	4	5	6	Amino ácidos	1	2	3	4	5	6
N-Acetil-D-galactosamina	+	+	+	+	–	+	Ácido Acético	–	–	–	–	–	–	D-Alanina	–	–	–	–	–	–
N-Acetil-D-glucosamina	+	+	+	+	+	+	Ácido cis-Acônico	+	+	+	+	+	–	L-Alanina	–	–	–	–	–	F
Adonitol	+	+	+	+	+	+	Ácido Cítrico	–	–	–	–	+	–	L-Alanil-glicina	–	F	–	–	–	–
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	Ácido Fórmico	–	F	–	–	+	–	L-Asparagina	F	F	F	+	–	–
D-Arabitól	+	+	+	+	+	+	Ácido Lactona D-Galactônico	–	–	–	–	–	–	Ácido L-Aspártico	F	F	F	+	F	–
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	Ácido D-Galacturônico	–	–	–	–	–	–	Ácido L-Glutâmico	+	+	+	+	F	F
i-Eritritol	–	–	–	–	–	+	Ácido D-Glucônico	–	–	–	–	–	–	Ácido Glicil-L-aspártico	–	–	–	–	–	–
D-Frutose	+	+	+	+	+	+	Ácido D-Glucosaminico	–	–	–	–	+	–	Ácido Glicil-L-glutâmico	–	–	–	F	–	–
L-Fucose	+	+	+	+	+	+	Ácido D-Glucurônico	–	–	–	–	–	–	L-Histidina	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	Ácido α -Hidroxi-butírico	–	–	–	–	–	–	Hidroxi-L-prolina	+	+	+	+	+	+

Continua...

Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	Ácido β-Hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	L-Leucina	-	-	-	-	-	-
α-D-Glucose	+	+	+	+	+	+	Ácido □-Hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	L-Ornitina	+	+	+	+	+	+
m-Inositol	+	+	+	+	+	+	Ácido p-Hidroxifenilacético	-	-	-	-	-	-	L-Fenilalanina	-	-	-	-	-	-
α-D-Lactose	+	+	+	+	+	+	Ácido itacónico	-	-	-	-	-	-	L-Prolina	+	+	+	+	+	+
Lactulose	+	+	+	+	+	+	Ácido α-Cetobutírico	-	-	-	-	-	-	Ácido L-Piroglutâmico	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	Ácido α-cetoglutárico	-	-	-	-	-	-	D-Serina	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	Ácido α-Cetovalérico	-	-	-	-	-	-	L-Serina	-	-	-	-	-	-
D-Manose	+	+	+	+	+	+	Ácido D.L-láctico	F	F	F	+	-	F	L-Treonina	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	Ácido Malônico	-	-	-	-	-	-	D.L-Carnitina	-	-	-	-	+	-
β-Metil-D-Glucoside	F	F	F	F	+	+	Ácido propiónico	-	-	-	-	-	-	Ácido γ-Aminobutírico	F	-	F	F	-	-
D-Psicose	+	+	+	+	+	+	Ácido quínico	F	F	-	F	+	-	Ácido Urocânico	+	+	+	+	+	+
D-Rafinose	+	+	+	+	+	+	Ácido D-Sacárico	-	-	-	-	-	-	Inosina	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	Ácido Sebácico	-	-	-	-	-	-	Uridina	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	Ácido Succínico	+	+	+	+	+	+	Timidina	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	Álcool	1	2	3	4	5	6	Amidas	1	2	3	4	5	6
D-Trealose	+	+	+	+	+	+	2,3-Butanodiol	-	-	-	-	-	-	Ácido succinâmico	-	-	-	-	-	-
Turanose	+	+	+	+	+	+	Glicerol	+	+	+	+	+	+	Glucuronamida	-	-	-	-	-	-
Xilitol	F	+	F	+	-	+	Ésteres	1	2	3	4	5	6	L-Alaninamida	-	-	F	F	-	-
Polímeros	1	2	3	4	5	6	Metil piruvato	+	+	+	+	-	F	Aminas	1	2	3	4	5	6
α-Ciclodextrina	-	-	-	-	-	-	Mono-Metil-Succinato	F	F	F	F	-	F	Feniletilamina	-	-	-	-	-	-
Dextrina	F	F	F	F	-	+	Químicos fosforilados	1	2	3	4	5	6	Putrescine	-	-	-	-	-	-
Glicogeno	-	-	-	-	-	-	D.L-α-Glicerol fosfato	-	-	-	-	-	-	2-Aminoetanol	-	-	-	-	-	-
Tween 40	-	-	-	-	-	-	□-Glucose-1-fosfato	-	-	-	-	-	-	Químicos bromados	1	2	3	4	5	6
Tween 80	-	-	-	-	-	-	D-Glucose-6-fosfato	-	-	-	-	-	-	Ácido succínico bromo	+	+	+	+	F	+

7.6. Anexo F – Ácidos Graxos

Tabela 20. Comparação dos perfis de ácidos graxos entre estirpes de *Rhizobium altiplani* estirpes tipo de *R. mesoamericanum* (CCGE 501^T) e *R. grahamii* CCGE 502^T).

Ácidos graxos	BR 10423 ^T	BR 10424	BR 10427	BR 10432	CCGE 501 ^T	CCGE 502 ^T
16:00	6,67	6,46	5,78	6,08	4,08	5,99
15:0 2OH	2,26	1,4	1,23	1,28	2,15	1,87
17:0 ciclo	–	–	–	–	–	0,78
16:0 3OH	2,12	2,02	1,84	1,95	–	2,29
18:00	10,19	9,61	10,14	9,82	11,17	6,4
19:0 ciclo w8c	20,76	13,29	13,17	12,25	16,75	29,75
18:0 3OH	3,89	2,95	3,06	3,1	3,61	3,85
Summed Feature 2 (14:0 3OH/16:1 iso I)	5,14	5,06	4,9	5,06	4,46	4,56
Summed Feature 8 (18:1 w7c/18:1 6c)	48,97	59,21	59,88	60,46	57,79	44,51

7.7. Anexo G – Sensibilidade a Antibióticos

Tabela 21. Comparação dos perfis de sensibilidade a antibióticos entre estirpes de *Rhizobium altiplani* estirpes tipo de *R. mesoamericanum* (CCGE501^T) e *R. grahamii* CCGE502^T).

Antibióticos	BR 10423 ^T	BR 10424	BR 10427	BR 10432	CCGE 501 ^T	CCGE 502 ^T
Kanamicina (30 mg)	–	–	–	–	–	–
Ampicilina (10 mg)	–	–	–	–	–	+
Ampicilina (25 mg)	–	–	–	–	–	+
Streptomina (10 mg)	–	–	–	–	–	–
Streptomina (25 mg)	–	–	–	–	–	–
Eritromicina (15 mg)	+	+	+	–	+	+
Eritromicina (30 mg)	+	+	+	–	–	+
Gentamicina (10 mg)	–	–	–	–	–	–
Gentamicina (30 mg)	–	–	–	–	–	–
Rifampicina (5 mg)	–	–	–	–	–	–
Rifampicina (30 mg)	–	–	–	–	–	–
Clorofenicol (30 mg)	–	–	–	–	–	–
Clorofenicol (50 mg)	–	–	–	–	–	–
Tetraciclina (10 mg)	–	–	–	–	–	–
Tetraciclina (30 mg)	–	–	–	–	–	–
Troleadomicina †	+	+	+	+	NT	NT
Rifamicina SV †	+	+	+	+	NT	NT
Minociclina †	–	–	–	–	NT	NT
Lincomicina †	+	+	+	+	NT	NT
Vancomicina †	+	–	+	–	NT	NT

+ = Reação positiva; – = Reação negativa; NT = Não testado; (†) Antibióticos testados em a partir das placas de Biolog GenIII. Concentrações não informada pelo fabricante.

7.8. Anexo H – Atividade Enzimática

Tabela 22. Comparação dos perfis de atividade enzimática entre estirpes de *Rhizobium altiplani* estirpes tipo de *R. mesoamericanum* (CCGE 501^T) e *R. grahamii* CCGE 502^T.

Reação/Enzima	BR 10423 ^T	BR 10424	BR 10427	BR 10432	CCGE 501 ^T	CCGE 502 ^T
Nitrato redutase	–	–	–	–	–	+
Nitrito redutase	–	–	–	–	–	+
Produção de Indol	–	–	–	–	–	–
Fermentação de Glicose	–	–	–	–	–	–
Arginina Di-hidrolase	–	–	–	–	–	–
Uréase	+	+	+	+	+	+
β-glucosidase	+	+	+	+	+	+
Protease	–	–	–	–	–	–
β-galactosidase	+	–	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	–
Oxidase	–	–	–	–	–	+

+ = Reação positiva; – = Reação negativa.

7.9. Anexo I – Caracterização Molecular

Tabela 23. Protocolos utilizados para a caracterização molecular das estirpes de *Rhizobium altiplani*.

Gene	Primer	Sequência do primer (5' – 3')	Reação	Ciclos de amplificação*
----- <i>Gene Ribossomal</i> -----				
16S <i>rRNA</i>	27 F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75mM; dNTP 0,3μM; Primers: 1μM; Taq pol. : 1U/μL)	30x (T1: 94°C, 1 min T2: 53°C, 2 min T3: 72°C, 8 min)
	1492 R	GGTTACCTTGTTACGACTT		
----- <i>Genes Housekeeping</i> -----				
<i>recA</i>	41 F	TTCGGCAAGGGMTCGRSATSATG	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol. : 1,25 U/μL)	35x (T1: 94°C, 1 min T2: 60°C, 2 min T3: 72°C, 2 min)
	640 R	ACATSACRCCGATCTTCATGC		
<i>gyrB</i>	gyrB343 F	TTCGACCAGAAATCCTAYAAGG	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol. : 1,25 U/μL)	35x (T1: 94°C, 1 min T2: 60°C, 2 min T3: 72°C, 2 min)
	gyrB1043 R	AGCTTGTCCTTSGTCTGCG		
<i>rpoB</i>	rpoB83 F	CCTSATCGAGGTTACAGAAAGGC	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol. : 1,25 U/μL)	35x (T1: 94°C, 1 min T2: 57°C, 2 min T3: 72°C, 2 min)
	rpoB1061 R	AGCGTGTTGCGGATATAGGCG		
<i>glnII</i>	TsglnII F	AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 0,8 μM; Taq pol. : 1,25 U/μL)	35x (T1: 94°C, 1 min T2: 57°C, 2 min T3: 72°C, 2 min)
	TsglnII R	SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG		
----- <i>Genes Simbióticos</i> -----				
<i>nodC</i>	540 F	TGATYGAYATGGARTAYTGGCT	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 1,75mM; dNTP 0,2μM; Primers: 0,8μM; Taq pol. : 1,25 U/μL)	35x (T1: 94°C, 1 min T2: 50°C, 2 min T3: 72°C, 2 min)
	1160 R	CGYGACARCCARTCGCTRTTG		
<i>nifH</i>	nifH for	CGCIWTYTACGGIAARGGIGG	(Tampão: 1X; MgCl ₂ : 3 mM; dNTP 0,2 μM; Primers: 1 μM; Taq pol. : 2,5 U/μL)	35x (T1: 94°C, 45 sec T2: 50°C, 1 min T3: 72°C, 1 min)
	nifH ver	GGIKCRTAYTSGATIACIGTCAT		

*T1, T2 e T3 referem-se as etapas de desnaturação, anelamento extensão dos fragmentos de DNA, respectivamente.

7.10. Anexo J – Genes no GenBank

Tabela 24. Número de acesso no GenBank dos genes usados para a descrição de *Rhizobium altiplani*.

Estirpes	16S rRNA	<i>recA</i>	<i>glnII</i>	<i>rpoB</i>	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
----- <i>Rhizobium altiplani</i> -----						
BR 10423 ^T	KX022634	KX022644	KX022654	KX022664	KX022674	KX022684
BR 10424	KX022635	KX022645	KX022655	KX022665	KX022675	–
BR 10425	KX022636	KX022646	KX022656	KX022666	KX022676	–
BR 10426	KX022637	KX022647	KX022657	KX022667	KX022677	–
BR 10427	KX022638	KX022648	KX022658	KX022668	KX022678	KX022685
BR 10428	KX022639	KX022649	KX022659	KX022669	KX022679	–
BR 10429	KX022640	KX022650	KX022660	KX022670	KX022680	–
BR 10430	KX022642	KX022651	KX022661	KX022671	KX022681	–
BR 10431	KX022642	KX022652	KX022662	KX022672	KX022682	–
BR 10432	KX022643	KX022653	KX022663	KX022673	KX022683	KX022686
----- <i>Estirpes Tipo de Rhizobium</i> -----						
<i>Rhizobium grahamii</i> CCGE 502 ^T	JF424608	JF424618	JF424622	AEYE02000009.1	JN021932	JN021930
<i>Rhizobium mesoamericanum</i> CCGE501 ^T	JF424606	JF424617	JF424620	KM491527	JN021931	JN021929
<i>Rhizobium tibeticum</i> LMG24453 ^T	NR116254	EU407190	HQ735075	–	–	EU407189
<i>Rhizobium metallidurans</i> ChimEc512 ^T	JX678769	–	KF863912	–	–	–
<i>Rhizobium cauense</i> CCBAU 101002 ^T	NR_133049	JQ308332	JQ308335	KM491524	–	–
<i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCBAU 03470 ^T	KJ831225	KJ831237	KJ831248	–	KJ831245	KM396547
<i>Rhizobium binae</i> BLR195 ^T	JN648932	–	JN649058	–	JN649012	–
<i>Rhizobium bangladeshense</i> BLR175 ^T	JN648931	JN648979	JN649057	–	JN649011	–
<i>Rhizobium lentis</i> BLR27 ^T	JN648905	JN648976	JN649031	–	–	–
<i>Rhizobium phaseoli</i> LMG 8819 ^T	EF141340	JN580716	EF113136	FJ392879	HM441255	–
<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 ^T	AY509899	JN580715	EF113134	JQ795190	HQ394248	–

Continua...

<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	NR115872	EF579935	EF579941	FJ392877	JN580683	–
<i>Rhizobium elii</i> CFN 42 ^T	U28916	CP000133	CP000133	CP000133	U80928	NC004041
<i>Rhizobium mesosinicum</i> CCBAU 25010 ^T	NR043548	–	EU120732	GU552995	EU120728	–
<i>Rhizobium alarii</i> GBV016 ^T	AM931436	–	GU552971	GU552994	–	–
<i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	KJ831229	KJ831241	KJ831252	–	KJ831243	–
<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	NR118274	JN558671	JN558681	–	KC608575	JN55869
<i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 ^T	KF111868	JQ585847	JQ585891	KR183848	KF111957	JQ585800
<i>Rhizobium trifolii</i> ATCC 14480 ^T	AY509900	–	EF113135	–	FJ895269	–
<i>Rhizobium endophyticum</i> CCGE 2052 ^T	EU867317	JF424619	HM142767	KM491525	–	–
<i>Rhizobium tubonense</i> CCBAU 85046 ^T	NR116255	–	EU288696	KM491531	–	–
<i>Rhizobium sullae</i> IS123 ^T	Y10170	FJ816280	FJ816279	FJ816276	–	–
<i>Rhizobium yanglingense</i> SH22623 ^T	NR028663	AY929462	AY907359	–	–	AY929541
<i>Rhizobium leguminosarum</i> LMG 14904 ^T	NR114989	EU155089	AM182125	AM295352	FJ596038	DQ450935
<i>Rhizobium loessense</i> CCBAU 7190B ^T	NR115125	–	HQ735076	–	–	–
<i>Rhizobium gallicum</i> R602sp ^T	U86343	AF529015	AY907357	CP006877	AF217266	AF218126
<i>Rhizobium mongolense</i> USDA 1844 ^T	U89817	AY929453	HQ735071	KM491528	NG036832	AY929535
<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU 65647 ^T	NR116835	GU211771	GU211770	KM491532	GU211769	GU211767
<i>Rhizobium indigoferae</i> CCBAU 71042 ^T	NR025157	JN580717	EF027965	JN580755	–	JN580790
<i>Rhizobium jaguaris</i> CCGE525 ^T	JX855169	–	JX855212	–	–	JX855222
<i>Rhizobium mayense</i> CCGE526 ^T	JX855172	–	JX855195	–	–	JX855225
<i>Rhizobium calliandrae</i> CCGE524 ^T	JX855162	–	JX855189	–	–	JX855219
<i>Rhizobium leucaenae</i> LMG 9517 ^T	X67234	AF169583	AJ294372	JN580756	X98514	NZ_AUFB010000 50
<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	D14501	KF206735	KF206819	KF206907	–	AY945954
<i>Rhizobium lusitanum</i> P1–7 ^T	AY738130	EF639841	DQ431674	FJ816277	HM852098	AY943644
<i>Rhizobium azibense</i> 23C2 ^T	JN624691	–	JN624700	–	–	JN624727

Continua...

<i>Rhizobium freirei</i> PRF 81 ^T	EU488742	EU488789	EU488827	NZ_AQHN01000082	–	–
<i>Rhizobium paranaense</i> PRF 35 ^T	EU488753	EU488787	EU488826	–	–	–
<i>Rhizobium multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T	EF035074	EF490040	EF490029	JN580754	EF050781	–
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	EF061096	HM047120	HM047131	KF206945	JN580680	–
<i>Rhizobium subbaraonis</i> JC85 ^T	FR714938	–	HE572579	–	–	–
<i>Rhizobium soli</i> DS–42 ^T	EF363715	–	GQ260192	–	–	–
<i>Rhizobium hainanense</i> I66 ^T	U71078	GU726294	HM047132	JN580753	DQ010039	AY934876
<i>Rhizobium petrolearium</i> SL–1 ^T	EU556969	–	EU556970	–	–	FJ712276
<i>Rhizobium huautlense</i> LMG 18254 ^T	AF025852	KF206740	AM182128	EF217309	–	AY688613
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T	U89832	EU488791	EU488815	CP004015	JN580681	JX863573
<i>Rhizobium paknamense</i> NBRC 109338 ^T	AB733647	AB739027	AB739029	–	–	–
<i>Rhizobium vignae</i> CCBAU 05176 ^T	GU128881	GU128895	GU128902	KF278574	–	–
<i>Rhizobium oryzae</i> Alt 505 ^T	EU056823	–	FJ712274	–	–	–
<i>Rhizobium halophytocola</i> YC6881 ^T	GU322905	HQ174466	HQ174465	KM491526	–	–
<i>Rhizobium endolithicum</i> JC140 ^T	HE818072	–	–	–	–	–
<i>Rhizobium giardinii</i> H152 ^T	U86344	EU488778	NZ_KB902579	NZ_KB902635	–	–
<i>Rhizobium flavus</i> YW14 ^T	KC904963	KF931400	KF609368	KF931402	–	–
<i>Rhizobium fredii</i> LMG 6217 ^T	X67231	AF169591	AM182145	AM295358	GU994072	–
<i>Rhizobium herbae</i> CCBAU 83011 ^T	GU565534	EU513322	GU565549	–	–	–
<i>Rhizobium meliloti</i> AM 12611 ^T	D14509	DQ767676	AM182133	AM295384	EF209423	–
<i>Rhizobium yantingense</i> H66 ^T	KC934840	KM029982	KM029983	–	–	–
<i>Rhizobium galegae</i> ATCC 43677 ^T	D11343	KF206809	KF206896	KF206983	–	–
<i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 ^T	DQ855276	–	AM286427	–	–	–
<i>Rhizobium radiobacter</i> IAM 12048 ^T	AB247615	KF206734	KF206818	KF206906	–	–
<i>Rhizobium rhizoryzae</i> J3-AN59 ^T	EF649779	KT365232	KF384476	–	–	–

Continua...

<i>Rhizobium smilacinae</i> PTYR-5 ^T	KF551141	KF738709	KF738708	–	–	–
<i>Rhizobium rosettiformans</i> W3 ^T	EU781656	–	GU562963	KM491529	–	GQ241353
<i>Rhizobium daejeonense</i> L61 ^T	AY341343	–	GU559875	–	–	AY428644
<i>Rhizobium borbori</i> DN316 ^T	EF125187	–	GQ289385	HQ823557	–	–
<i>Rhizobium pseudoryzae</i> J3-A127 ^T	DQ454123	HM132108	EU732539	–	–	–
<i>Rhizobium capsici</i> CC-SKC2 ^T	HQ113369	–	KJ863428	–	–	–
<i>Rhizobium straminoryzae</i> CC-LY845 ^T	KF444510	–	KJ863426	–	–	–
<i>Rhizobium sphaerophysae</i> CCNWGS0238 ^T	FJ154088	–	GQ226006	LN876266	–	–
<i>Rhizobium selenitireducens</i> B1 ^T	EF440185	AB685476	GU559877	KM491530	–	–
<i>Rhizobium pusense</i> NRCPB10 ^T	FJ969841	–	HQ166059	FR871204	–	–
<i>Rhizobium larrymoorei</i> ATCC 51759 ^T	Z30542	–	NZ_KI912457	NZ_JADW01000049	–	–
<i>Rhizobium tarimense</i> PL-41 ^T	HM371420	–	JF508523	–	–	–
<i>Rhizobium alkalisoli</i> CCBAU 01393 ^T	EU074168	EU672475	EU672490	–	EU872245	EU872238
<i>Rhizobium rubi</i> ICMP ^T	AY626395	BBJU01000003	KF206814	KF206905	–	–
<i>Rhizobium nepotum</i> LMG 26435 ^T	FR870231	–	HE646687	FR871201	–	–
<i>Rhizobium undicola</i> ORS 992 ^T	Y17047	–	EF457952	NZ_JHXQ01000031	–	NZ_JHXQ01000006
<i>Rhizobium lemnae</i> L6-16 ^T	NR_126174	AB746181	AB746183	–	–	–
<i>Rhizobium skierniewicense</i> Ch11 ^T	HQ823551	–	HE610311	FR754367	–	–
<i>Rhizobium vitis</i> K309 ^T	U45329	–	FR847962	AM295392	–	–
<i>Rhizobium taibaishanense</i> CCNWSX 0483 ^T	HM776997	KF206804	KF206891	KF206978	–	–
<i>Rhizobium mediterraneum</i> LMG 17148 ^T	AM181745	AF169578	AJ294369	AM295350	GQ167241	EU267716
<i>Rhizobium oryzicola</i> ZYY136 ^T	JX446583	–	JX443617	JX443618	–	–
<i>Rhizobium populi</i> K-38 ^T	KC609734	–	KF951420	–	–	KF939630
<i>Rhizobium tianshanense</i> A-1BS ^T	AF041447	AF169579	EU249392	GQ847885	DQ450943	DQ450934
<i>Rhizobium huakuii</i> IFO 15243 ^T	D13431	AF169588	EU249391	FJ393283	KC854806	–
<i>Rhizobium loti</i> ATCC 33669 ^T	D14514	AF169581	EU039875	FJ393277	DQ450939	DQ450929

Continua...

<i>Rhizobium loti</i> ATCC 33669 ^T	D14514	AF169581	EU039875	FJ393277	DQ450939	DQ450929
<i>Rhizobium ciceri</i> UPM-Ca7 ^T	U07934	AF169580	AJ294367	–	DQ407292	DQ450928
<i>Rhizobium alvei</i> TNR-22 ^T	HE649224	–	–	–	–	–
<i>Rhizobium aggregatum</i> IFAM 1003 ^T	NR_026115	–	GU559874	KM491523	–	–
<i>Rhizobium ecuadorensis</i> CNPSO 671 ^T	JN129381	–	NZLFIO01000381	NZ_LFIO01001107	–	–
<i>Rhizobium lupini</i> DSM 30140 ^T	X87273	–	KM114867	–	–	–
<i>Rhizobium japonicum</i> USDA 6 ^T	U69638	HQ587875	AM168341	AM295349	AB573867	HM047126

7.11. Anexo K – Similaridades de Estirpes

Tabela 25. Similaridade entre a estirpe tipo de *Rhizobium altiplani* (BR 10423^T) e outras estirpes tipo de espécies de *Rhizobium* baseadas em sequências dos genes 16S rRNA, housekeeping e simbióticos.

Estirpe	Similaridade com BR 10423 ^T (%)					
	16S rRNA	<i>glnII</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
Outras estirpes de <i>Rhizobium altiplani</i>	0,99–1,00	0,99–1,00	0,99–1,00	0,99–1,00	0,99–1,00	0,99–1,00
<i>Estirpes Tipo de Rhizobium</i>						
<i>Rhizobium grahamii</i> CCGE 502 ^T	0,988	0,86	0,88	0,92	0,94	0,97
<i>Rhizobium mesoamericanum</i> CCGE 501 ^T	0,987	0,91	0,88	0,92	1,00	0,99
<i>Rhizobium tibeticum</i> LMG24453 ^T	0,987	0,90	0,88	–	–	0,86
<i>Rhizobium metallidurans</i> ChimEc512 ^T	0,985	–	0,88	–	–	–
<i>Rhizobium cauense</i> CCBAU 101002 ^T	0,985	0,89	0,91	0,92	–	–
<i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCBAU 03470 ^T	0,983	0,85	0,87	–	0,69	0,96
<i>Rhizobium binae</i> BLR195 ^T	0,981	–	0,87	–	0,66	–
<i>Rhizobium bangladeshense</i> BLR175 ^T	0,98	0,88	0,88	–	0,66	–
<i>Rhizobium lentis</i> BLR27 ^T	0,98	0,87	0,90	–	–	–
<i>Rhizobium phaseoli</i> LMG 8819 ^T	0,98	0,86	0,89	0,85	0,69	–

Continua...

<i>Rhizobium pisi</i> DSM 30132 ^T	0,98	0,86	0,88	0,84	0,67	–
<i>Rhizobium fabae</i> CCBAU 33202 ^T	0,98	0,85	0,87	0,85	0,66	–
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 ^T	0,98	0,86	0,89	0,83	0,69	0,95
<i>Rhizobium mesosinicum</i> CCBAU 25010 ^T	0,98	–	0,89	0,87	0,63	–
<i>Rhizobium alarii</i> GBV016 ^T	0,98	–	0,82	0,86	–	–
<i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 ^T	0,98	0,86	0,87	–	0,69	–
<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 ^T	0,98	0,85	0,85	–	0,66	0,86
<i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 ^T	0,98	0,81	0,86	0,84	0,65	0,86
<i>Rhizobium trifolii</i> ATCC 14480 ^T	0,98	–	0,88	–	0,63	0,90
<i>Rhizobium endophyticum</i> CCGE 2052 ^T	0,97	0,87	0,91	0,88	–	–
<i>Rhizobium tubonense</i> CCBAU 85046 ^T	0,97	–	0,83	0,70	–	–
<i>Rhizobium sullae</i> IS123 ^T	0,97	0,87	0,85	0,87	–	–
<i>Rhizobium yanglingense</i> SH22623 ^T	0,97	0,86	0,90	–	–	0,88
<i>Rhizobium leguminosarum</i> LMG 14904 ^T	0,97	0,86	0,87	0,85	0,67	0,85
<i>Rhizobium loessense</i> CCBAU 7190B ^T	0,97	–	0,87	–	–	–
<i>Rhizobium gallicum</i> R602sp ^T	0,97	0,86	0,88	0,86	0,72	0,98
<i>Rhizobium mongolense</i> USDA 1844 ^T	0,97	0,85	0,90	0,87	0,69	0,87
<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU 65647 ^T	0,97	0,86	0,87	0,85	0,69	0,95
<i>Rhizobium indigoferae</i> CCBAU 71042 ^T	0,97	0,85	0,87	0,85	–	–
<i>Rhizobium jaguaris</i> CCGE525 ^T	0,96	–	0,86	–	–	0,90
<i>Rhizobium mayense</i> CCGE526 ^T	0,96	–	0,86	–	–	0,90
<i>Rhizobium calliandrae</i> CCGE524 ^T	0,96	–	0,85	–	–	0,92
<i>Rhizobium leucaenae</i> LMG 9517 ^T	0,96	0,89	0,86	0,84	0,71	0,90
<i>Rhizobium rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T	0,96	0,87	0,87	0,85	–	–

Continua...

<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7 ^T	0,96	0,86	0,85	0,84	0,71	–
<i>Rhizobium azibense</i> 23C2 ^T	0,96	–	0,89	–	–	0,98
<i>Rhizobium freirei</i> PRF 81 ^T	0,96	0,88	0,87	0,85	–	–
<i>Rhizobium paranaense</i> PRF 35 ^T	0,96	0,87	0,88	–	–	–
<i>Rhizobium multihospitium</i> CCBAU 83401 ^T	0,96	0,88	0,86	0,85	0,65	–
<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251 ^T	0,96	0,87	0,86	0,84	0,68	–
<i>Rhizobium subbaraonis</i> JC85 ^T	0,96	–	0,83	–	–	–
<i>Rhizobium soli</i> DS-42 ^T	0,96	–	0,90	–	–	–
<i>Rhizobium hainanense</i> I66 ^T	0,96	0,88	0,87	0,85	0,94	0,99
<i>Rhizobium petrolearium</i> SL-1 ^T	0,96	–	0,87	–	–	–
<i>Rhizobium huautlense</i> LMG 18254 ^T	0,96	0,87	0,87	0,51	–	–
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T	0,96	0,87	0,88	0,83	0,71	–
<i>Rhizobium paknamense</i> NBRC 109338 ^T	0,96	0,87	0,86	–	–	–
<i>Rhizobium vignae</i> CCBAU 05176 ^T	0,96	0,86	0,85	0,88	–	–
<i>Rhizobium oryzae</i> Alt 505 ^T	0,95	–	0,83	–	–	–
<i>Rhizobium halophytocola</i> YC6881 ^T	0,95	0,86	0,86	0,83	–	–
<i>Rhizobium endolithicum</i> JC140 ^T	0,95	–	–	–	–	–
<i>Rhizobium giardinii</i> H152 ^T	0,95	0,87	0,85	0,80	–	–
<i>Rhizobium flavus</i> YW14 ^T	0,95	0,85	0,81	0,84	–	–
<i>Rhizobium fredii</i> LMG 6217 ^T	0,95	0,83	0,81	0,81	0,69	–
<i>Rhizobium herbae</i> CCBAU 83011 ^T	0,95	0,83	0,85	–	–	–
<i>Rhizobium meliloti</i> IAM 12611 ^T	0,95	0,80	0,81	0,82	0,69	–
<i>Rhizobium yantingense</i> H66 ^T	0,95	0,84	0,86	–	–	–
<i>Rhizobium galegae</i> ATCC 43677 ^T	0,95	0,84	0,86	0,86	–	–

Continua...

<i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 ^T	0,95	–	0,88	–	–	–
<i>Rhizobium radiobacter</i> IAM 12048 ^T	0,95	0,86	0,85	0,85	–	–
<i>Rhizobium rhizoryzae</i> J3–AN59 ^T	0,95	0,86	0,84	–	–	–
<i>Rhizobium smilacinae</i> PTYR–5 ^T	0,95	0,85	0,87	–	–	–
<i>Rhizobium rosettiformans</i> W3 ^T	0,95	–	0,87	0,85	–	–
<i>Rhizobium daejeonense</i> L61 ^T	0,94	–	0,85	–	–	–
<i>Rhizobium borbori</i> DN316 ^T	0,94	–	0,82	0,84	–	–
<i>Rhizobium pseudoryzae</i> J3–A127 ^T	0,94	0,87	0,87	–	–	–
<i>Rhizobium capsici</i> CC–SKC2 ^T	0,94	–	0,86	–	–	–
<i>Rhizobium straminoryzae</i> CC–LY845 ^T	0,94	–	0,86	–	–	–
<i>Rhizobium sphaerophysae</i> CCNWGS0238 ^T	0,94	–	0,82	0,82	–	–
<i>Rhizobium selenitireducens</i> B1 ^T	0,94	0,84	0,88	0,86	–	–
<i>Rhizobium pusense</i> NRCPB10 ^T	0,94	–	0,88	0,85	–	–
<i>Rhizobium larrymoorei</i> ATCC 51759 ^T	0,94	–	0,85	0,86	–	–
<i>Rhizobium tarimense</i> PL–41 ^T	0,94	–	0,81	–	–	–
<i>Rhizobium alkalisoli</i> CCBAU 01393 ^T	0,94	0,87	0,87	–	0,68	0,88
<i>Rhizobium rubi</i> ICMP ^T	0,94	0,86	0,83	0,83	–	–
<i>Rhizobium nepotum</i> LMG 26435 ^T	0,94	–	0,86	0,86	–	–
<i>Rhizobium undicola</i> ORS 992 ^T	0,94	–	0,85	0,09	–	0,88
<i>Rhizobium lemnae</i> L6–16 ^T	0,94	0,86	0,84	–	–	–
<i>Rhizobium skierniewicense</i> Ch11 ^T	0,94	–	0,83	0,81	–	–
<i>Rhizobium vitis</i> K309 ^T	0,94	–	0,79	0,83	–	–
<i>Rhizobium taibaishanense</i> CCNWSX 0483 ^T	0,94	0,83	0,84	0,85	–	–
<i>Rhizobium mediterraneum</i> LMG 17148 ^T	0,94	0,83	0,84	0,75	0,67	0,88

Continua...

<i>Rhizobium orydicola</i> ZYY136 ^T	0,94	–	0,89	0,85	–	–
<i>Rhizobium populi</i> K-38 ^T	0,93	–	0,86	–	–	0,87
<i>Rhizobium tianshanense</i> A-1BS ^T	0,93	0,86	0,80	0,77	0,73	0,92
<i>Rhizobium huakuii</i> IFO 15243 ^T	0,93	0,85	0,83	0,77	0,67	–
<i>Rhizobium loti</i> ATCC 33669 ^T	0,93	0,84	0,85	0,77	0,69	0,92
<i>Rhizobium ciceri</i> UPM-Ca7 ^T	0,93	0,84	0,83	–	0,67	0,88
<i>Rhizobium alvei</i> TNR-22 ^T	0,93	–	–	–	–	–
<i>Rhizobium aggregatum</i> IFAM 1003 ^T	0,93	–	0,86	0,87	–	–
<i>Rhizobium ecuadorensense</i> CNPSO 671 ^T	0,92	–	0,88	0,84	–	–
<i>Rhizobium lupini</i> DSM 30140 ^T	0,89	–	0,77	–	–	–
<i>Rhizobium japonicum</i> USDA 6 ^T	0,89	0,84	0,77	0,74	0,67	0,78

7.12. Anexo L – Gene *recA*

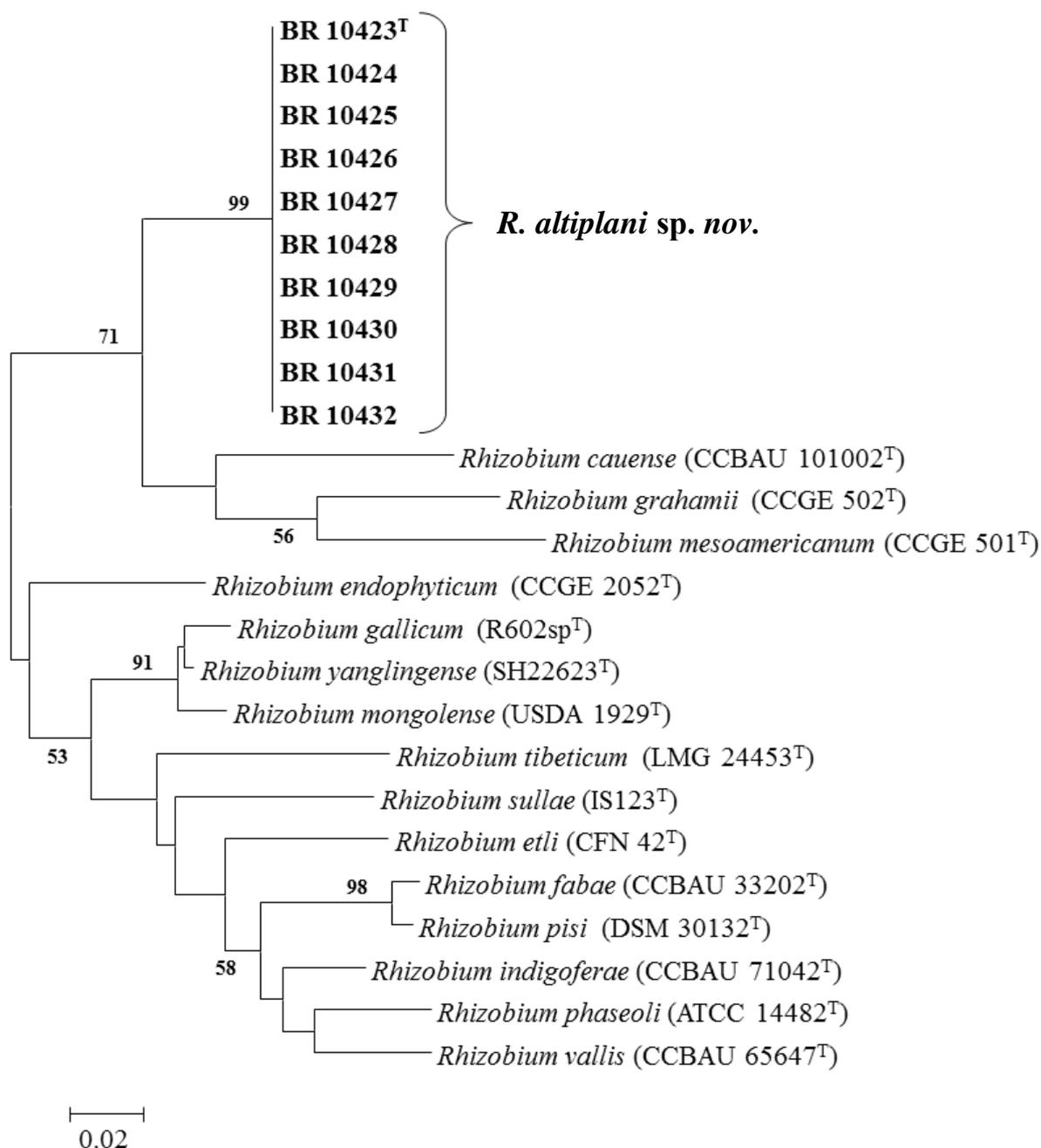


Figura 27. Filogenia Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *recA* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp. nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (<50%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo K.

7.13. Anexo M – Gene *glnII*

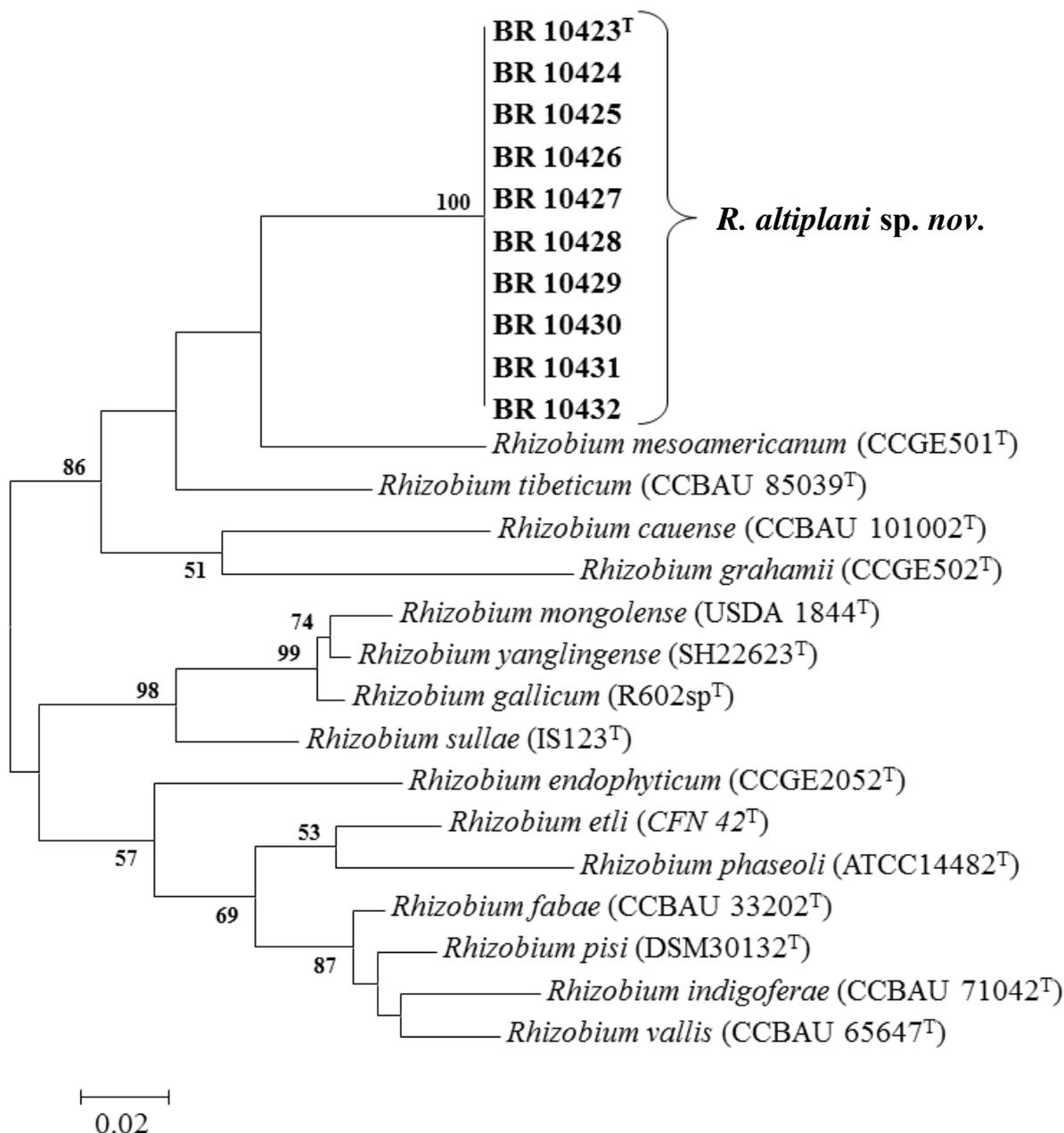


Figura 28. Filogenia Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *glnII* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp. nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (<50%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo J

7.14. Anexo N – Gene *rpoB*

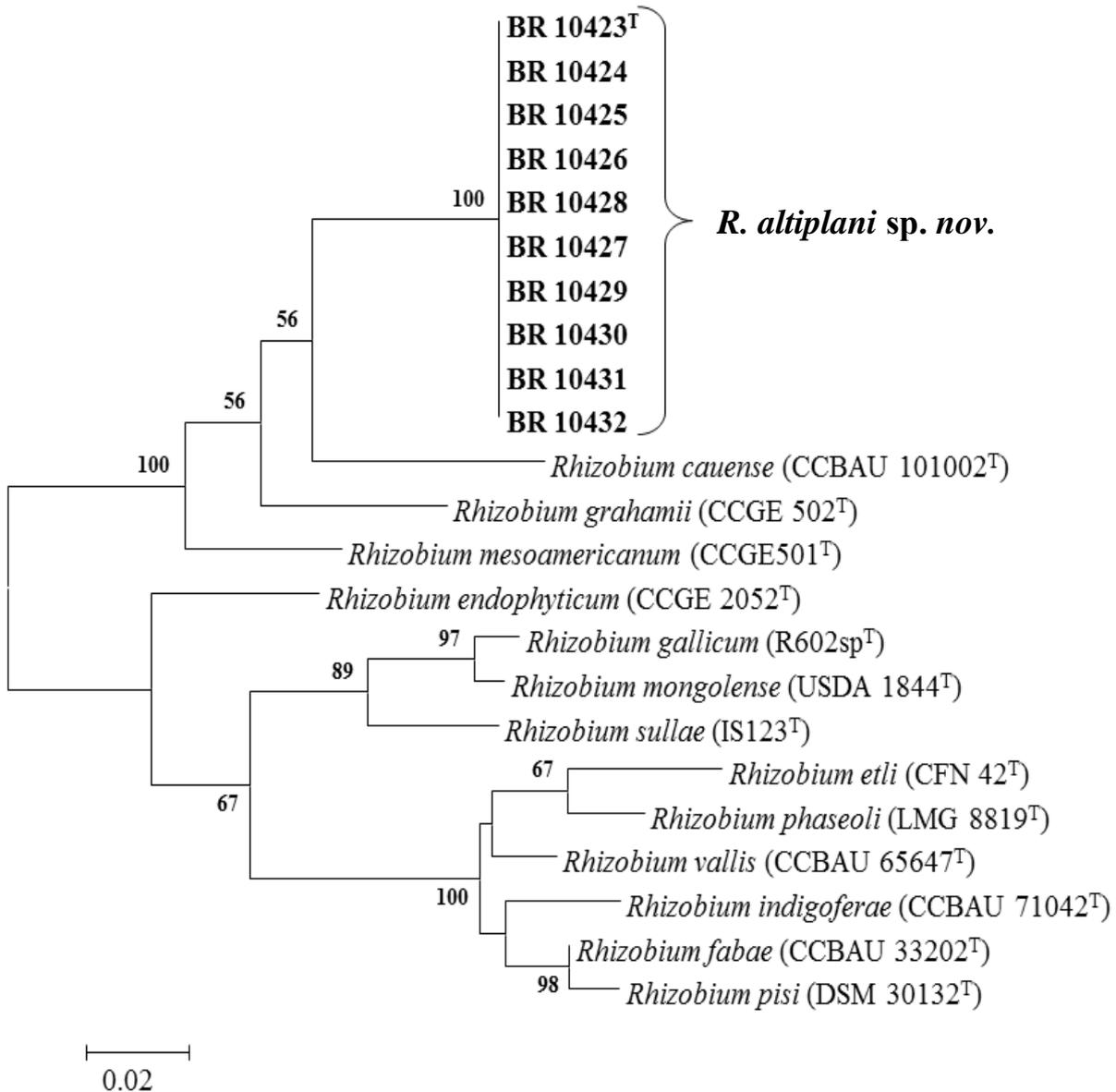


Figura 29. Filogenia Maximum-likelihood baseada em sequências parciais do gene *rpoB* mostrando a relação entre as estirpes de *R. altiplani* sp. nov. (em destaque negrito) e outros membros mais próximos do gênero *Rhizobium*. A significância de cada ramo está indicada pelos valores de bootstrap (<50%) calculado a partir de 1000 repetições. Barra de escala, 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos. Os números de acessos NCBI das estirpes estão listadas em anexo J.