



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
CÂMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS  
MOLECULARES

AILTON JÚNIO CANTUÁRIA DE OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS  
DE MUCUNA (*Mucuna aterrima*) DO CERRADO GOIANO**

Anápolis – GO  
2016

AILTON JÚNIO CANTUÁRIA DE OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS  
ISOLADAS DE NÓDULOS DE MUCUNA  
(*Mucuna aterrima*) DO CERRADO GOIANO**

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para aprovação no exame de qualificação.

Área: Química Orgânica

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Claudia Cristina Garcia  
Martin Didonet

Anápolis – GO  
2016

Oliveira, Ailton Júnio Cantuária.

Prospecção Genética de Bactérias Isoladas de Nódulos de Mucuna (Mucuna aterrima) do Cerrado Goiano. – 2016.

146folhas. il figuras.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2016.

1. Bactérias Endofíticas. 2. Mucuna. 3. Inoculantes. I. Título.

PROSPECÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE MUCUNA  
(*Mucuna aterrima*) DO CERRADO GOIANO

**Ailton Junio Cantuária de Oliveira**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada em 31/05/2016 por:

---

Profa. Dra. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet (UEG)

---

Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG)

---

Profa. Dra. Karina Freire D'Eca Nogueira Santos (UFPR)

*Dedico este trabalho a Ailton José, Sandra Regina, Victor e Lorena, família amada, que durante os anos foi meu amparo emocional e a inspiração contínua para conclusão de meus sonhos e projetos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Sinceros agradecimentos à minha orientadora, Professora Doutora Claudia Cristina Garcia Martin Didonet pela confiança e orientações pontuais. Com elas o trabalho ganhou em consistência científica, relevância social e expressividade acadêmica. Obrigado pelos anos de amizade e confiança.

Aos colegas de laboratório, ao Dr. Enderson (pesquisador da Embrapa) e a minha grande amiga Bruna que contribuíram de alguma forma para consolidação do projeto e construção do conhecimento.

Aos meus familiares, em especial meus pais, irmãos e tio Leonardo, que sempre me apoiaram em minhas decisões, por mais difíceis e desastrosas que fossem com paciência e compreensão. Meu alicerce nos momentos mais difíceis.

À CAPES pelo apoio financeiro e incentivo ao desenvolvimento do trabalho.

A Deus, meu bem maior. Sempre me ajudando a superar barreiras e desafios.

Obrigado a todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho. Sem vocês nada seria possível!

*"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;  
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias triste em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver..."*

*Martin Luther King*

## RESUMO

A mucuna é uma leguminosa usada como adubo verde, no período de entressafras, em sistemas agrícolas. Sua simbiose com microrganismos capazes de realizar fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma forma alternativa, e vantajosa de promoção de crescimento e melhoramento da qualidade do solo. Este trabalho objetiva realizar a caracterização da estrutura genômica por métodos moleculares de 24 bactérias obtidas dos nódulos das raízes da mucuna (*Mucuna aterrima*) cultivadas em três regiões do estado de Goiás: Rio Verde, Porangatú e Santo Antônio de Goiás. A caracterização molecular foi baseada na separação do DNA genômico pela técnica de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) e pela amplificação de regiões conservadas e não conservadas do genoma pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Também foi realizado o sequenciamento da região 16S rRNA e sua restrição com a endonuclease *HaeIII* (ARDRA). Os resultados obtidos nos ensaios foram tratados pela análise de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard e o algoritmo UPGMA, com construção de dendrogramas de similaridade, a fim de estimar a relação filogenética dos isolados. A análise pelo PFGE revelou a presença de material genético circular de alto peso molecular junto a um replicon de peso 1,2 Mb para maioria dos isolados. As regiões IRS 16-23S rRNA e REP foram consideradas de alto valor discriminatório a nível intraespécies. O estudo das regiões *housekeeping* (*glnII* e *atpD*) mostraram-se inadequado para o teste de MLSA (Análise de Sequências Multilocus), contudo podem ser empregados em estudo filogenéticos de polimorfismo, assim como o gene *melA*. O gene *nifH* foi exibido para seis isolados de mucuna. Já o gene *nodC* não foi evidenciado para nenhum isolado. A região 16S rRNA apresentou fragmentos com 1,5 kb para todos os isolados e sua restrição com a enzima *HaeIII* apresentou um bom agrupamento para separação filogenética. Os dados do sequenciamento foram comparados com sequências de banco de dados do NCBI para obtenção da identificação das bactérias estudadas. Foram identificados 11 isolados com similaridade acima de 91% sendo consideradas dos gêneros *Enterobacter*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas*. As elucidações dessas características genotípicas visam fornecer subsídio para o entendimento da relação entre bactérias isoladas dos nódulos e plantas hospedeiras, assim como investigar a dinâmica da estrutura genômica destes procariontes e a diversidade das bactérias associadas a mucuna. O estudo ainda pode auxiliar na estratégia de seleção de grupos de bactérias para serem utilizadas como inoculantes para a cultura da mucuna.

**Palavra-chave:** genoma, mucuna, bactérias endofíticas, inoculantes e simbiose.

## ABSTRACT

*Mucuna* is a legume used as green manure, during intercrop period, in farming system. The plant association with microorganisms, which are able to perform biological nitrogen fixation (BNF), is an alternative and advantageous way of promoting growth as well as to improve soil quality. The aim of this study is to characterize, by molecular methods, the genomic structure of 24 bacteria which were isolated from root nodules of mucuna (*Mucuna aterrima*). *Mucuna* plants were grown in soil collected from 3 different cities in Goias state: Rio Verde, Porangatu and Santo Antônio de Goiás. Molecular methods were based on genome separation using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique, and by using amplification of conserved and non-conserved regions of genome through polymerase chain reaction (PCR) technique. It was also performed the sequencing of the 16S rRNA region, and its restriction by using restriction endonuclease *HaeIII* (ARDRA). The assays results obtained were treated by using similarity analysis based on Jaccard's coefficient and UPGMA algorithm to construct a similarity dendrogram, in order to estimate phylogenetic relation of the bacterial isolates. The sequencing were compared to the sequences of endophytic bacteria from NCBI database. PFGE analysis showed a circular genetic material with high molecular weight and replicon of 1,2 Mb for most of isolates. IRS 16-23S and REP regions have been considered high discriminatory power intraspecies. The study of the housekeeping (*glnII* e *atpD*) regions has shown to be unsuitable for MLSA (Multilocus Sequence Analysis) test, however it can be used in phylogenetic polymorphism studies as well in *melA* gene. The *nifH* gene was presented in 6 isolates of mucuna. Whereas the *nodC* gene was not found in any of the isolates. The 16S rRNA region presented fragments of 1,5kb for all the isolates and its restriction to *HaeIII* enzyme presented a better clustering for phylogenetic separation. The sequencing database were compared to NCBI database sequences to obtain bacteria identification. There were identified 11 isolates with similarity over 91% considering genus *Enterobacter*, *Bacillus*, and *Stenotrophomonas*. These genotypic features aim to aid understanding the relation between bacteria which were isolated from nodules and host plants, as well as to investigate the dynamic of the genomic structure of these prokaryotes, and the diversity of bacteria associated with mucuna. The study can also help in the strategy of selecting groups of bacteria to be used as inoculants to mucuna culture in the 'Cerrado goiano'.

**Keywords:** genome, mucuna, endophytic bacteria and symbiosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização geográfica dos Biomas brasileiros e evidenciação do Cerrado em seus respectivos estados. ....	24
Figura 2 – Camada de adubo verde cobrindo o solo.....	28
Figura 3 – <i>Mucuna aterrima</i> (PIPER & TRACY) HOLLAND. ....	30
Figura 4 – Nodulação de raízes de leguminosas por rizóbios.....	35
Figura 5 – Representação gráfica das etapas que constituem o processo de infecção vegetal por rizóbios e nodulação das raízes de leguminosas. ....	39
Figura 6 – Modelo da estrutura do complexo nitrogenase (Mo/Fe-proteína ou dinitrogenase em azul e Fe-proteína ou dinitrogenase redutase em verde). ....	43
Figura 7 – Disposição esquemática dos genes nif em <i>Klebsiella pneumoniae</i> , com 20 genes e 8 operons. ....	45
Figura 8 – Esquema ilustrativo das etapas do processo de preparação de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE). ....	56
Figura 9 – Perfil eletroforético do DNA genômico, pela técnica de PFGE, de 24 isolados de mucuna e 10 estirpes controles em gel de agarose (1%) com marcador molecular DNA Size Standards – Lambda Labber.....	70
Figura 10 – Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região intergênica (16S-23S rRNA) de 22 isolados de nódulos de mucuna e 10 estirpes controles em gel de agarose (1,7%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.....	72
Figura 11 – Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA obtidos em gel de	

agarose (1,7%) nas análise molecular de 22 bactérias isoladas de nódulos de mucuna e 10 bactérias controle. ....	74
Figura 12 – Perfil eletroforético da amplificação em PCR das regiões palindrômicas extragênicas repetitivas (REP) de 24 isolados de nódulos de mucuna e 11 estirpes controles em gel de agarose (1,7%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.....	76
Figura 13 – Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos das regiões palindrômicas extragênicas repetitivas (REP) obtidos em gel de agarose (1,7%) nas análise molecular de 24 bactérias isoladas de nódulos de mucuna e 11 bactérias controle. ....	78
Figura 14 – Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região 16S rRNA de 24 isolados de nódulos de mucuna e 11 estirpes controles em gel de agarose (1,0%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder. ....	80
Figura 15 – Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região <i>glnII</i> de 23 isolados de nódulos de mucuna e 4 estirpes controles em gel de agarose (1,3%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder. ....	81
Figura 16 – Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região <i>atpD</i> de 8 isolados de nódulos de mucuna e 4 estirpes controles em gel de agarose (1,3%) com marcador molecular 100pb-DNA-Ladder. ....	83
Figura 17 – Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região <i>nifH</i> para rizóbios de 11 isolados de nódulos de mucuna e 11 estirpes controles em gel de agarose (1,7%) com marcadores moleculares 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.....	85
Figura 18 – Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos da região <i>nifH</i> de rizóbios obtidos em gel de agarose (1,7%) nas análise molecular de 11 bactérias isoladas de nódulos de mucuna e 11 bactérias controle. ....	89

Figura 19 – Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região <i>mela</i> de 15 isolados de nódulos de mucuna e 5 estirpes controles em gel de agarose (1,7%) com marcadores moleculares 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.....	90
Figura 20 – Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos da região <i>mela</i> obtidos em gel de agarose (1,7%) nas análise molecular de 15 bactérias isoladas de nódulos de mucuna e 5 bactérias controle. ....	92
Figura 21 – Perfil eletroforético de ARDRA de produtos PCR amplificados da região 16S rRNA de 18 isolados de nódulos de mucuna e 10 estirpes controles em gel de agarose (2,0%) com marcadores moleculares 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder. ....	95
Figura 22 – Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos da “digestão” da região 16S rRNA pela endonuclease <i>HaeIII</i> obtidos em gel de agarose (2,0%) nas análise molecular de 18 bactérias isoladas de nódulos de mucuna e 8 bactérias controle. ....	96
Figura 23 – Gráfica da representatividade dos gêneros obtidos pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de 11 isolados de nódulos de mucuna identificados por homologia com sequências gênicas 16S rRNA de bactérias contidas no banco de dados do NCBI ( <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> ). ....	98
Figura 24 – Relação evolutiva do gene 16S rRNA em isolados de mucuna. A história evolutiva foi inferida usando o método UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973). A relação filogenética consenso de <i>bootstrap</i> foi realizada a partir de 1000 repetições e representa a história da evolução do gene 16S rRNA para 11 isolados de mucuna e 20 bactérias de referencia obtidas no banco de dados do NCBI (FELSENSTEIN, 1985). Ramos reproduzido em menos de 50% das repetições de <i>bootstrap</i> foram retirados. A percentagem de árvores idênticas, em	

que a taxa associada agrupados no teste de *bootstrap* foram de 1000 replicas e podem ser observados ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Probabilidade Composição máxima (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004), sendo essas unidades do número de substituições de bases por local. A análise envolveu 31 sequências de nucleótidos. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 444 posições no conjunto de dados final. As análises foram realizadas em MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2015)..... 100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Código dos isolados obtidos a partir de nódulos de mucuna preta (planta isca) com seus respectivos municípios, local de coleta e quantidade de isolados.....	54
Tabela 2 – Concentração dos reagentes utilizados no sistema de reação para amplificação por PCR e respectivas regiões.....	60
Tabela 3 – Primers utilizados com suas respectivas sequências para amplificação de sequências genicas: IRS 16S-23S rRNA, REP, 16S rRNA, <i>glnII</i> , e <i>nifH</i> . ....	61
Tabela 4 – Condições dos ciclos (tempo e temperatura) utilizados para amplificação pela PCR para os diferentes oligonucleotídeos.....	62
Tabela 5 – Sistema de reação de Sequenciamento utilizada para amplificação da região 16S rRNA.....	65
Tabela 6 – Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de mucuna e identificação por homologia com sequências gênicas 16S rRNA de bactérias contidas no banco de dados do NCBI ( <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> ). ....	97
Tabela 7 – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas de IRS 16S-23S rRNA pela reação de PCR de 22 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 10 estirpes controles. ....	136
Tabela 8 – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas de REP pela reação de PCR de 24 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 11 estirpes controles.....	138
Tabela 9 – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas da região <i>nifHr</i> pela reação de PCR de 7 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 11 estirpes controles.....	140
Tabela 10 – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas da região <i>glnII</i> pela reação de PCR de 23 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 4 estirpes controles.....	142

Tabela 11 – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas da região <i>atpD</i> pela reação de PCR de 8 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 4 estirpes controles. ....	143
Tabela 12 – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas da região <i>mela</i> pela reação de PCR de 15 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 5 estirpes controles. ....	144
Tabela 13 – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas da restrição enzimática, pela <i>HaeIII</i> , do gene 16S rRNA pela reação de PCR de 18 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 8 estirpes controles. ....	145

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$  – alfa

A – adenina

ATP – adenosina trifosfato

ADP – adenosina difosfato

AIA – ácido indol acético

ARDRA – análise de restrição de amplicados de DNA ribossomal (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)

atm – atmosfera

$\beta$  – beta

C – carbono ou citosina ou celsius

CaCl<sub>2</sub> – cloreto de cálcio

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

DMSO – dimetilsufóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – desoxirribonucleotídeos fosfatados

D.O. – densidade óptica

$\epsilon$  – épsilon

e<sup>-</sup> – elétron(s)

Embrapa – empresa brasileira de pesquisa Agropecuária

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

$\delta$  – delta

FBN – fixação biológica de nitrogênio

Fe – ferro

$\gamma$  – gama

g – gramas

G – ganina

GO – estado de Goiás

GSII – glutamina sintetase II

h – horas

H – hidrogênio

H<sub>2</sub> – gás hidrogênio

H<sub>2</sub>O – água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

ha – hectare

HCl – ácido clorídrico

I – inosina

ID – identidade

IRS – região espaçadora intergênica

kb – kilopares de bases

KCl – cloreto de potássio

kg – kilogramas

Km – quilômetros

L – litros

LCOs – oligossacarídeos de lipoquitinas

M – mol

Mb – megapares de bases

MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio

min – minutos

mL – mililitros

mM – milimolar

Mo – molibdênio

N – nitrogênio

N<sub>2</sub> – gás nitrogênio

NaCl – cloreto de sódio

NH<sub>3</sub> – amônia

NH<sub>4</sub> – amônio

NO<sup>3</sup> – nitrato

Nods – fatores de nodulação

O<sub>2</sub> – oxigênio gasoso

P – fósforo

P.A. – para análise

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia de polimerase

PEG – polietilenoglicol

PFGE – gel de eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*)

pH – potencial hidrogeniônico

P<sub>i</sub>/ PO<sub>4</sub> – fosfato inorgânico

PY – meio peptona levedura (*peptone yeast*)

q.s.p. – quantidade suficiente para

REP – regiões palindrômicas repetitivas

rDNA – DNA ribossomal

RNA – ácido ribonucleico

RNase – ribonuclease

RPCP/V – rizobactérias promotoras de crescimento em plantas/vegetais

rRNA – RNA ribossomal

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

seg – segundos

T – timina

TBE – tampão tris/borate/EDTA

TCA – ciclo do ácido tricarbóxico

T<sub>m</sub> – temperatura de *melting*

Tris – tris (hidroximetil) aminometano

tRNA – ribossomo transportador

UEG – Universidade Estadual de Goiás

UPGMA – método de agrupamento por média aritmética não ponderada  
(*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*)

UV – ultravioleta

V – volts

µg – micrograma

µL – microlitro

YMA – agar levedura manito (*yeast manitol agar*)

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 CERRADO.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 O SOLO E SEUS MICRORGANISMOS.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.1 Comunidade Microbiana do Solo.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3 ADUBAÇÃO VERDE.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4 <i>Mucuna aterrima</i> (PIPER &amp; TRACY) HOLLAND.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5 ASSOCIAÇÃO PLANTA– BACTÉRIAS .....</b>	<b>30</b>
<b>2.6 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6.1 Diazotrofos Simbióticos.....</b>	<b>34</b>
<b>2.6.2 Nodulação .....</b>	<b>36</b>
<b>2.7 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO – FBN .....</b>	<b>40</b>
<b>2.7.1 Nitrogenase .....</b>	<b>42</b>
<b>2.8 ESTUDO DA DIVERSIDADE.....</b>	<b>46</b>
<b>2.9 ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÔMICA POR PFGE .....</b>	<b>51</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>53</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 MATERIAL AMOSTRAL - BACTÉRIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 CARACTERIZAÇÃO DA ARQUITETURA GENÔMICA .....</b>	<b>55</b>
<b>4.3 ANÁLISE MOLECULAR PELA PCR.....</b>	<b>57</b>
<b>4.4 TRATAMENTO DOS DADOS .....</b>	<b>64</b>
<b>4.5 SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S rDNA .....</b>	<b>64</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>5.1 ARQUITETURA GENÔMICA – PFGE .....</b>	<b>67</b>
<b>5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PELA PCR.....</b>	<b>71</b>

5.2.1 Região Espaçadora Intergênica 16-23S (IRS 16-23S)-PCR.....	71
5.2.2 Regiões Palindrômicas Extragênicas Repetitivas (REP)-PCR.....	75
5.2.3 Regiões Conservadas – Genes 16S rRNA e <i>Housekeeping</i> ( <i>atpD</i> e <i>gnIII</i> ).....	80
5.2.4 Regiões Rizobiais – Gene <i>nifH</i> ( <i>nifHr</i> e <i>nifHi</i> ) e <i>nodC</i> .....	84
5.2.5 Região para Melanina – Gene <i>melA</i> .....	90
5.2.6 ARDRA – Gene 16S rRNA .....	94
5.3 SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S rDNA.....	96
6 CONCLUSÃO .....	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104
ANEXO.....	136

# 1 INTRODUÇÃO

Adubação verde é uma prática agrícola que consiste no cultivo de espécies capazes de reciclar os nutrientes para tornar o solo mais fértil e produtivo, possibilitando a redução, ou até mesmo na exclusão, do emprego de fertilizantes nitrogenados minerais, contribuindo para uma maior sustentabilidade da agricultura brasileira e garantindo a conservação de recursos naturais (BARRADAS, 2010). As espécies vegetais capazes de contribuir para o sistema solo-planta, poderão ser cultivadas até o estado vegetativo e então incorporadas ao solo cobrindo o terreno ao longo de alguns meses ou durante todo o ano. Assim a matéria verde pode ser incorporada ao solo por revolvimento ou pode ser mantida em sistema de cobertura do solo (ESPINDOLA; ALMEIDA & GUERRA, 2004).

Dentre as espécies utilizadas como adubo verde, o grupo das leguminosas merece destaque pela sua habilidade em associar-se com bactérias fixadoras biológicas de nitrogênio (FBN). A técnica de adubação verde pode ser trabalhada em sistema de consórcio com espécies da família das gramíneas e das leguminosas onde há a combinação de resíduos com características favoráveis a proteção do solo e nutrição das plantas (PERIN et al., 2004).

A *Mucuna aterrima* conhecida popularmente como mucuna preta é uma planta pertencente à família *Fabaceae*, genericamente denominada de leguminosas (FORMENTINI, 2008; FARIA, 2004). Esta planta pode apresentar associações simbióticas com bactérias diazotróficas, podendo contribuir com a FBN no ambiente pela utilização do método de inoculação. A técnica está descrita em De-Polli e Franco (1985) e consiste em cobrir as sementes com veículos contendo a cultura bacteriana (inoculante), aumentando a eficiência da simbiose

e promovendo a elevação da capacidade de FBN atmosférico e melhor desenvolvimento do vegetal.

A caracterização e identificação genética de bactérias são ferramentas úteis para avaliação da diversidade destes organismos e podem favorecer os programas de seleção e posterior formulação de inoculantes para as leguminosas: visando uma estratégia de seleção de interações mais eficientes e adaptáveis a situações específicas; ampliando a contribuição da FBN nos sistemas agrícolas (HUNGRIA, 1994a; REIS JÚNIOR; TEIXEIRA & REIS, 2004). Para Magalhães e colaboradores (2005) a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é considerada “padrão ouro” para identificação de linhagens bacterianas em estudos moleculares. Sendo um método muito complexo e com elevado poder discriminatório. A PFGE somada a técnicas de análise de multilocus constituem métodos de identificação com alta sensibilidade e poder discriminatório.

Assim foram estudadas 24 bactérias isoladas de nódulos de mucuna quanto as características genômicas e moleculares utilizando a PCR de genes marcadores e genes específicos bem como regiões intergênicas (16-23S rRNA), regiões repetitivas e ARDRA. Foi ainda determinado o perfil em PFGE e realizado o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, com identificação taxonômica de 11 isolados. Os dados obtidos foram utilizados para análises de agrupamento por similaridade o que permitiu a observação da diversidade genética das bactérias associadas à mucuna estudadas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CERRADO

O termo Cerrado é empregado para designar o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central (EITEN, 1977; RIBEIRO et al., 1981).

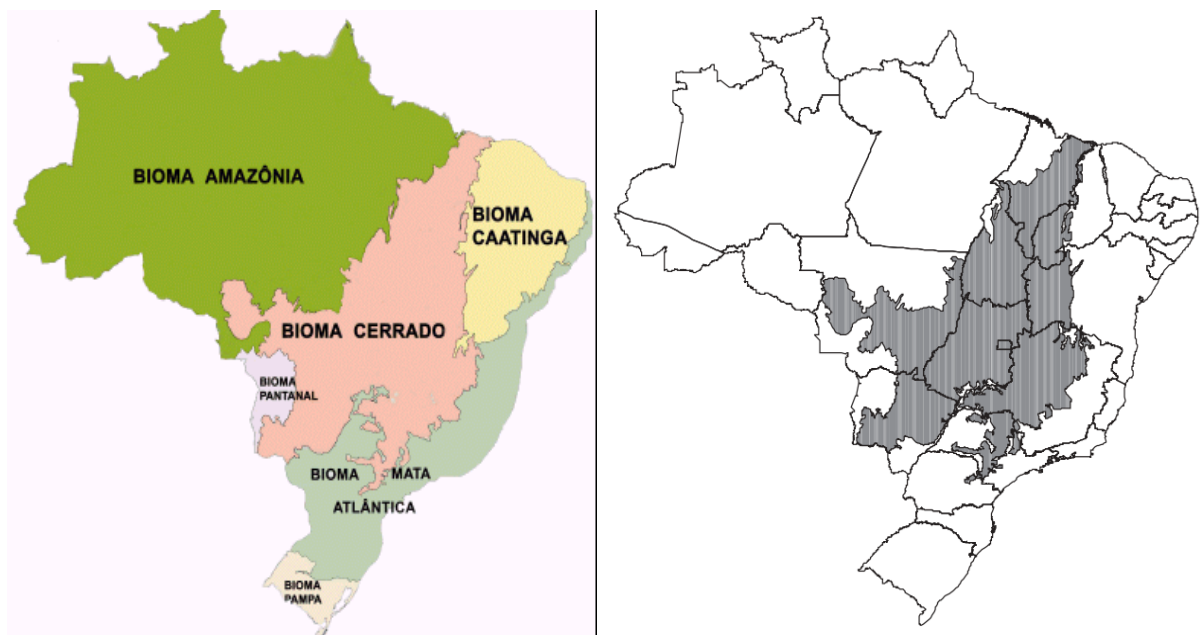
O Cerrado brasileiro, por sua abrangência, é a principal região de savana no continente americano. O Bioma do Cerrado ocupa 23,82% do território brasileiro, cerca de 2.036.448 de Km<sup>2</sup>, e está difundindo desde o limite sul da floresta amazônica até as periferias dos estados de São Paulo e Paraná, cobrindo os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas (Figura 1). Sendo considerado o segundo maior bioma da América do Sul (BOELAUG, 2002; CASTRO et al., 2008; IBGE, 2004; BRASIL, 2015).

Por sua localização central (Figura 1), o Cerrado pode ser considerado um “corredor” para as espécies do Brasil, pois esse faz limite com quase todos os biomas brasileiros (exceto o pampa). Assim sendo, 90% das aves brasileiras se reproduzem nessa região (MOTTA; CURI; FRANZMEIER, 2002).

O Cerrado apresenta extrema abundância de espécies endêmicas. Sua diversidade biológica é reconhecida como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas catalogadas. Os mamíferos representam 199 espécies conhecidas e aves compreendem cerca de 837 espécies. Os números de peixes (1200 espécies), répteis (180 espécies) e anfíbios (150 espécies) são elevados. Esse bioma também abriga 13% das borboletas, 35% das abelhas e 23% dos cupins dos trópicos (BRASIL, 2015; CAVALCANTI; JOLY, 2002).

São conhecidas cerca de 7.000 espécies vegetais, mais de 220 espécies com uso medicinal e mais 416 podem ser usadas na recuperação de solos degradados, como barreiras contra o vento, proteção contra a erosão, ou para criar habitat de predadores naturais de pragas (BRASIL, 2015; MENDONÇA et al., 1998).

**Figura 1** – Localização geográfica dos Biomas brasileiros e evidência do Cerrado em seus respectivos estados.



**Fonte:** <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>

Em Goiás o Cerrado cobre 97% de todo seu território (IBGE, 2004) e seu solo é altamente intemperizado (processo que levam a diminuição da fertilidade do solo por perda de nutrientes) e lixiviado (processo causado pela chuva que ao penetrar no solo, leva consigo elementos químicos essenciais), logo apresenta sérias limitações para as culturas, em termos de fertilidade natural do solo. No geral o solo do Cerrado goiano são ácido e possuem baixa disponibilidade de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, molibdênio e zinco; contudo uma concentração elevada de alumínio pode ser encontrada (LOPES, 1996). Sendo necessário a aplicação de fertilizantes e calcário ao solo para torna-lo produtivo.

## 2.20 SOLO E SEUS MICRORGANISMOS

Para Moreira e Siqueira (2006) o solo é um habitat extremamente peculiar, pois consiste de um arranjo de diversos micro-habitats resultante da combinação de matéria orgânico e mineral, apresentando uma natureza heterogênea complexa e dinâmica em relação a outros habitats terrestres. Dessa maneira o solo pode abrigar organismos com metabolismos díspares, convivendo lado a lado, em estado de equilíbrio dinâmico. Onde, em alguns casos, essa relação pode gerar um sistema de dependência essencial para a sobrevivência de tais organismos.

Portanto é possível inferir que os organismos residentes em cada micro-habitat é natural e evolutivamente mais adaptáveis as condições daquele nicho, devido ao seu maquinário metabólico, permitindo sua colonização e sobrevivência (SCHIMEL, 2001).

As comunidades microbianas são muito abundantes e consistem grande parte da biomassa do solo, podendo ser distribuídas bactérias (incluem actinomicetos e cianobactérias), fungos e algas. O grupo dos procariotos podem apresentar concentrações de  $10^9$  bactérias por grama de solo (GREEN; BOHANNAN, 2006). Sendo que esta concentração pode aumentar significativamente no solo rizosférico devido ao aumento na disponibilidade de substrato (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Segundo Moreira e Siqueira (2006) muito fatores físico (pH, temperatura, umidade, porosidade do solo e pressão) e químicos (salinidade, disposição de nutrientes e toxinas), assim como o tipo de vegetação e a bagagem genética do microrganismo ditam a diversidade microbiana em um micro-habitat.

## 2.2.1 Comunidade Microbiana do Solo

Existem várias formas de classificar e agrupar os microrganismos encontrados nos solos. Entretanto em níveis taxonômicos mais elevados é possível compreender nove filos de bactérias: Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia e Gemmatimonadetes (JANSSEN, 2006).

Para Quirino e colaboradores (2009), por meio do sequenciamento de genes 16S rRNA, o solo do Cerrado apresenta uma proporção média de 18,9% de Alphaproteobactéria, 16,1% de Acidobactéria e 26,85% de Actinobactéria. Os demais grupos (Betaproteobactéria, Gammaproteobactéria, Deltaproteobactéria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia e Gemmatimonadetes) representam 5% da comunidade.

Dois Filos são bem retratados em diversos trabalhos envolvendo microrganismos do solo, Proteobacteria e Firmicutes.

### 2.2.1.1 Proteobacteria

O Filo Proteobacteria é extremamente rico em diversidade morfológica e fisiológica, agrupando grande quantidade de espécies bacterianas. Sua própria denominação origina-se do nome do deus grego dos oceanos, “Proteus”, este era capaz de mudar de forma, refletindo assim a pluralidade do grupo. O Filo contém cerca de 1.875 espécies, distribuídas em 72 famílias e 425 gêneros; agrupando 30% do total de bactérias já descritas (6.250) (GARRITY, 2005).

O grupo das Proteobacteria pode ser subdividido em cinco grupos menores, segundo suas sequências de 16S rRNA. Destes cinco grupos, quatro ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) são facilmente encontrados no solo e um ( $\epsilon$ ) coloniza o trato gastrointestinal de seres humanos e animais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O grupo mais abundante é o das  $\alpha$ -proteobactérias que consiste na maioria dos

gêneros fototróficos e espécies simbióticas de plantas (rizóbios); enquanto as  $\beta$ -proteobactérias são exemplos de mediadores da nitrificação. Já as  $\gamma$ -proteobactérias enquadram espécies de importância científica e médica, tais como as da família *Enterobacteriaceae*, *Xanthomonadaceae* e *Pseudomonadaceae*. As  $\delta$ -proteobactérias incluem, principalmente, bactérias redutoras de sulfato e ferro (HALLMANN et al., 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

### 2.2.1.2 Firmicutes

As bactérias do Filo Firmicutes são procariotos gram-positivos com citologia de cocos ou bacilos, capazes de formar endósporos, e também abrange as bactérias ácidas lácticas. Tais bactérias são enquadradas neste grupo pelo sequenciamento da sua região 16S rRNA e seu baixo conteúdo de guanina e citosina (AHMAD; SELVAPANDIYAN; BHATNAGAR, 2000).

O gênero *Bacillus* é um dos mais importantes do Filo, pois é um importante produtor de proteases extracelulares (DIAS et al., 2008), de ácido indol acético e de bacteriocinas (DIAS et al., 2009). Outro gênero de importância é o do *Clostridium*, pela sua capacidade de fixar nitrogênio no solo (KNIGHT; HARDY, 1966).

## 2.3 ADUBAÇÃO VERDE

A adubação verde/cultura de cobertura pode contribuir para a melhoria da qualidade do solo. Tal contribuição pode ser dada pelo aumento de matéria orgânica, atividade biológica, estabilidade de agregados e infiltração (BARRADAS, 2010). A reciclagem de nutrientes (nitrogênio, carbono e fósforo), que são acumulados durante o seu crescimento e liberados durante a sua decomposição quando mantidas como cobertura do solo são outras

vantagens dos adubos verdes (Figura 2), pois podem disponibilizar estas substâncias para a cultura comercial.

Outros benefícios estão implícitos na fisiologia do vegetal. O extenso sistema radicular com raízes profundas do vegetal possui alta eficiência na descompactação e aeração do solo, contribuindo para a fertilidade e qualidade do ambiente agrário (SULLIVAN, 2003). O uso de leguminosas, no geral, é uma ferramenta para controlar plantas invasoras e melhorar as condições do solo (CAAMAL-MALDONADO et al., 2001). No entanto, segundo Sullivan (2003), alguns adubos verde/culturas de cobertura possuem a desvantagem de servir de hospedeiros de pragas e doenças.

**Figura 2** –Camada de adubo verde cobrindo o solo.



**Fonte:** Grupo Cultivar. Plantas para adubação verde melhoram o solo. Revista agropecuária. Disponível em: <<http://www.revistaagropecuaria.com.br/2011/08/29/plantas-para-adubacao-verde-melhoram-o-solo/>> Acesso em: 02/11/2015.

Contudo um dos maiores benefícios da adubação verde está na associação do grupo das leguminosas, corriqueiramente empregadas como adubos verdes, com bactérias fixadoras biológicas de nitrogênio (FBN), ou diazotróficas. (PERIN et al., 2004). O aumento do aporte de nitrogênio no sistema agrícola aumenta o teor de proteínas nos grãos, elevando seu valor nutricional, e evita a ocorrência de clorose total de folhas mais velhas. A clorose ocorre devido à menor produção de clorofila causada pela depleção de nitrogênio, seguida de

necrose folicular. Ao evitar este processo o vegetal produz mais nutrientes e aumenta sua produtividade (SFREDO; OLIVEIRA, 2010).

De acordo com Okito e colaboradores (2004) e Kumar e colaboradores (2006) a baixa adesão da prática do processo de inoculação de estirpes selecionadas de rizóbios está no fato da capacidade da leguminosa nodular com bactérias nativas da região; entretanto, estudos apontam que a seleção de estirpes mais competitivas e caracterizadas, melhoram a taxa de FBN e o crescimento vegetal. Estudos de seleção e caracterização de rizóbios para adubos verdes como a mucuna preta já vem sendo abordado por trabalhos na região norte do país, que resultaram em estirpes promissoras para o emprego destas como biofertilizantes (LIMA, 2009).

## **2.4 *Mucuna aterrima* (PIPER & TRACY) HOLLAND**

A *Mucuna aterrima* conhecida popularmente como mucuna preta é uma planta pertencente à família *Fabaceae* (leguminosa), originária da África, de porte herbáceo, anual, rasteira, vigorosa, com ramos trepadores volúveis e desenvolvidos que atingem cerca de 0,50 à 1 metro de altura (Figura 3). Possui uma alta resistência a seca e média resistência ao frio. Com flores grandes de coloração violácea ou branca; vagens largas, grossas e com poucas sementes. Suas sementes são grandes, pretas e com hilo branco (FORMENTINI, 2008; FARIA, 2004; MITIDIERI, 1983). O ciclo da cultura é longo, apresenta 140 a 150 dias até o florescimento e 200 a 240 dias até a colheita das vagens (WUTKE, 1993).

As espécies de mucuna são leguminosas que vem sendo utilizadas no processo de adubação verde – principalmente no verão, cobrindo o solo por um período de 4 a 6 meses – apresentando, normalmente, grande rendimento de massa verde por unidade de área, contribuindo como uma importante fonte de

matéria orgânica. Possui sistema radicular bastante ramificado e profundo, o que permite extrair nutrientes das camadas mais profundas do solo (FORMENTINI, 2008).

**Figura 3** –*Mucuna aterrima* (PIPER & TRACY) HOLLAND.



**Fonte:** [www.pirai.com.br/adm/Editor/ckfinder/userfiles/images/pirai\\_mucuna%20preta\\_site.JPG](http://www.pirai.com.br/adm/Editor/ckfinder/userfiles/images/pirai_mucuna%20preta_site.JPG)

Seu desenvolvimento vegetativo muito rápido, sua resistência à baixa disponibilidade hídrica e a solos com baixa fertilidadenatural torna a mucuna a leguminosa de escolha para cultivos e tratamento de solo danificado em regiões não utilizadas para práticas agrícolas convencionais. A mucuna beneficia o solo sendo capaz de aumentar a disponibilização de nitrogênio, quando em condições de inoculação (HOUNGNANDAN et al., 2000; OKITO et al., 2004).

## 2.5 ASSOCIAÇÃO PLANTA– BACTÉRIAS

Muitos microrganismos são capazes de se associar com espécies vegetais. Tais microrganismos recebem o nome de endófitos (termo de origem grega que significa “de dentro da planta”) (CARROLL, 1988). Na visão de Azevedo e Araújo (2007) os microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior de tecidos e/ou órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro. Tais microrganismos são diferentes dos organismos patogênicos, que causam moléstia ao vegetal, e dos epifíticos que vivem na superfície das plantas.

Entretanto tais conceitos são mutáveis, pois alguns microrganismos endofíticos são capazes de se tornar patogênicos segundo o genótipo do hospedeiro e as condições do ambiente; e um epifítico pode, eventualmente, infectar plantas e lá permanecer por determinados períodos (AZEVEDO, 1998).

A infecção de vegetais por endófitos pode ocorrer por diversas “portas”, sendo capazes de penetrar pelas aberturas de estômatos, lenticelas e hidatódios; por injúrias causadas por insetos e máquinas agrícolas; ou por áreas de emergências laterais das raízes, sendo essa última a mais comum, quantitativamente (LODEWYCKX et al., 2002; SPRENT; DE FARIA, 1988). Outra forma de entrada em tecido vegetal é pela produção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular das plantas (LODEWYCKX et al., 2002).

Várias são as razões e interesses biotecnológicos por essa classe de bactérias. Pois as bactérias endofíticas são capazes de se associar intimamente com as plantas hospedeiras, fixar biologicamente o nitrogênio, induzir resistência a condições de estresse, controlar pragas (fitopatogênico, insetos e nematoides), realizar mudanças fisiológicas no vegetal e favorecer o crescimento vegetal por reguladores, além de produzir enzimas de interesses industriais e farmacológicos e serem excelentes marcadores evolutivos devido sua coo evolução com suas hospedeiras (AZEVEDO; ARAÚJO; MACHERONI JR, 2000; BENT; CHANWAY, 1998; HALLMAN et al., 1997, 1998; LODEWYCKX et al., 2002; MISAGHI; DONNDELINGER, 1990).

Estima-se que cerca 300.000 espécies de plantas no mundo abrigam uma ou mais espécies de bactérias endofíticas (STROBEL et al., 2004). Contudo, apesar da grande diversidade, acredita-se que apenas uma pequena porção dessas bactérias são conhecidas (TORSVIK; OVREAS; THINGSTAD, 2002). Sendo alguns gêneros procariontes bem estabelecidos nesse grupo, como é o caso do *Bacillus* (COHN, 1872) *Agrobacterium* (CONN, 1942),

*Brukolderia*(GERMIDA et al., 1998), *Pseudomonas* (MIGULA, 1894) e *Enterobacter* (HORMAECHE; EDWARDS, 1960), além do grupo dos rizóbios (bactérias simbióticas FBNs). Muitas dessas espécies são também classificadas como Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs).

As RPCPs podem afetar o crescimento vegetal de forma direta ou indireta (GLICK, 1995). Tais bactérias podem realizar o biocontrole de fitopatógenos por diversos mecanismos, e assim, indiretamente, estimular o crescimento de plantas (COMPANT et al., 2005). De formas mais direta o grupo de rizobactérias podem promover o crescimento de plantas através de fixação de nitrogênio, síntese de sideróforos (sequestradores de ferro), síntese de fitohormônio (ácido indol acético – AIA, auxinas, citoquininas e giberelinas), solubiliza fosforo inorgânico e produção de melanina(polimerização de compostos fenólicos e proteção) (FRIZZO, 2007; HYNES; BRUKSCH; PRIEFER, 1988).

Espécies bacterianas, como *Azospirillum brasiliense* e *Pseudomonas putida*, têm sido relacionadas com o desenvolvimento radicular, enquanto *Bacillus megaterium* e *Bacillus mucilaginosus* estão ligadas a uma melhor assimilação de elementos como carbono, nitrogênio e fosforo do vegetal (EGAMBERDIYEVA, 2007).

Para Franco e Döbereiner (1994), a maioria das espécies de leguminosas de importância econômica podem ser associadas com bactérias capazes de colonizar, nodular e fixar nitrogênio atmosférico em condições mínimas de nitrogênio, aumentando seu aporte no solo. Apesar da taxa de fixação variar com a espécie de leguminosa, a FBN é, em geral, limitada pelas condições abióticas do solo, como: a acidez, o tipo de solo, textura e composição, temperatura e umidade e presença de metais pesados.

Outra forma de interação benéfica planta-bactéria é a associação de leguminosas com bactérias do grupo dos rizóbios. Essas se

associam simbioticamente com os vegetais promovendo, principalmente nitrogênio ao mesmo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As leguminosas capazes de estabelecer simbiose eficiente com microrganismos fixadores de nitrogênio são espécies promissoras em programas de revitalização de solos degradados, promovendo o enriquecimento do solo pelo aumento de nutrientes minerais, tornando esta associação economicamente viável para o setor agrário, pois diminui a aplicação de fertilizantes nitrogenados industrializados no cultivo (MATSUDA; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

A seleção de isolados de rizóbios como componentes de inoculantes devem visar à eficiência e sua adaptabilidade às condições prevalentes no local da cultura, como os solos ácidos e de baixa fertilidade. Tais bactérias também devem ser capazes de competir frente à população nativa e apresentarem vários aspectos agronômicos e culturais, tais como potencial de nodulação, fixação de  $N_2$  e crescimento da planta hospedeira (LIMA; PEREIRA; MOREIRA, 2005; ZILLI et al., 2006).

Fertilizantes orgânicos tais como: esterco, compostos e resíduos agroindustriais têm sido empregados para o enriquecimento do solo para o aumento do nitrogênio, mas são insuficientes para substituir os fertilizantes nitrogenados totalmente na agricultura mundial. Assim, a adubação verde com leguminosas inoculadas, é uma alternativa viável e assume relevância em razão de levar grandes quantidades de nitrogênio, minimizando a dependência de insumos externos na unidade de produção (ESPINDOLA et al., 2005).

## **2.6 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

As bactérias diazotróficas abrangem ampla faixa de microrganismos procariotos, incluindo representantes de arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas ou negativas que apresentam grande diversidade morfológica,

fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Moreira e colaboradores (2010) e Tokeshi (2008) classificam os diazotróficos em três categorias: (1) os de vida livre, que fixam nitrogênio para seu próprio consumo (*Clostridium*, *Fischerella* e *Rhodospirillum*); (2) os associados a espécies vegetais, onde não ocorre formação de nódulos (*Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Azoarcus*); ou, ainda, (3) os que estabelecem simbiose com leguminosas, havendo uma relação mais complexa, que envolve uma coevolução mais restrita entre planta e o hospedeiro, com formação de nódulos radiculares. Esta última envolve as bactérias em um grande grupo denominado, genericamente, de rizóbios englobando os gêneros da família *Rhizobiaceae*: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*.

Outros autores classificam os rizóbios não apenas em 6 gêneros, mas em 7, contendo 40 espécies pertencentes ao grupo das *Alphaproteobacteria*: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, (WEI et al., 2002) e *Methylobacterium* (KATO et al., 2008; SY et al., 2001).

Mais recentemente, algumas espécies dos gêneros da grupo *Betaproteobacterias*, *Burkholderia* (BONTEMPS et al., 2010) e *Cupriavidus* (LIU et al., 2012), e outras espécies dos gêneros *Devosia* (VERMA et al., 2009) e *Shinella* (LIN et al., 2008) capazes de fixar nitrogênio simbioticamente foram adicionadas ao grupo (MOULIN et al., 2001). Todos estes gêneros podem ser considerados como diazotrofos simbióticos.

### **2.6.1 Diazotrofos Simbióticos**

A capacidade de fixar nitrogênio simbioticamente é encontrada em vários grupos de microrganismos que estabelecem uma relação estreita entre planta-bactéria. Em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas

conhecidas como nódulos (Figura 4), órgãos colonizados pelas formas bacteroides (endo-simbióticas) dos rizóbios, nas raízes de leguminosas (EVANS; BURRIS, 1992; MARIN, 1999).

As bactérias diazotróficas podem promover o crescimento vegetal tanto pela FBN como pela produção e fornecimento de substâncias que auxiliam o crescimento radicular, como o ácido indolacético (AIA) e fósforo, entre outros. Assim, as bactérias diazotróficas associativas a leguminosas são consideradas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV); e assumem papel importante na interação simbiótica com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes (MOREIRA, 2010).

**Figura 4**– Nodulação de raízes de leguminosas por rizóbios.



**Fonte:** Hungria e Silva (2011).

Durante a associação pode-se observar a formação de nódulos radiculares, visíveis a olho nu. A simbiose de rizóbios pode ocorrer de forma parasítica, quando há formação de nódulos inefetivos, brancos; ou mutualística, quando há formação de nódulos efetivos de coloração rosada (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Portanto os rizóbios são facilmente isolados dos nódulos de plantas hospedeiras, porém são dificilmente identificados e isolados no solo, pois, em geral, são bactérias diazotróficas simbióticas (ELKAN; BUNN, 1992).

A relação simbiótica se dá na estrutura de nódulos, com os rizóbios na sua forma pleomórfica (bacteróide). Essa organização nodular está envolvida na fixação do nitrogênio atmosférico (FBN) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Tal transformação bioquímica, FBN, gera uma forma combinada do nitrogênio (amônia). A amônia por sua vez é rapidamente convertida a amidas e/ou ureídos devido sua toxicidade para a planta (SANTOS; REIS, 2008). As amidas e ureídos são utilizados pela planta hospedeira para formação de metabolitos; e por sua vez o vegetal fornece à bactéria fotoassimilados, principalmente sacarose, que contribuindo para o crescimento microbiano e propicia a relação simbiótica (MARIN, 1999).

Segundo Marin (1999) tais bactérias são, geralmente, móveis, gram-negativas e aeróbicas; usualmente produzem grânulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato como fonte de armazenamento energético. Os rizóbios costumemente são divididos em três grupos de acordo com a velocidade de crescimento: os de crescimento rápido (gêneros *Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*), crescimento intermediário (gênero *Mesorhizobium*) e crescimento lento (gênero *Bradyrhizobium*). Em sua maioria, são bactérias mesofílicas e possuem grande variedade de condições metabólicas (MARIN 1999).

## 2.6.2 Nodulação

Para que se estabeleça a simbiose entre bactéria e planta hospedeira são necessárias diversas e sucessivas etapas (Figura 5). O processo inicia-se com a adaptação da bactéria à planta e culminam na fixação do nitrogênio atmosférico na sua forma combinada, amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrito ( $\text{NO}_3^-$ ). O processo de nodulação ocorre aproximadamente 2 horas após o contato da bactéria com as raízes, podendo variar de acordo com a planta hospedeira ou rizóbio envolvido (BHUVANESWARI; TURGEON; BAUER, 1980). Os nódulos primários se desenvolvem em regiões de alongamento e nas zonas de deformação de pequenos

pêlos radiculares, considerada a região preferencial para a infecção da bactéria fixadora (BHUVANESWARI; TURGEON; BAUER, 1980).

Anterior a infecção precede uma complexa troca de sinais moleculares entre a planta hospedeira e a bactéria, por meio de mensageiros moleculares que promovem mudanças celulares no vegetal e na bactéria (GAGE, 2004; GEURTS; BISSELING, 2002; PERRET et al., 2000).

O modelo proposto por Gage (2004), Patriarca e colaboradores (2004), Timmers, Auriac e Truchet (1999) descrevem uma atração quimioestática das bactérias em direção às raízes, colonizando a rizosfera. Em resposta à colonização, a planta secreta flavonoides. Tais compostos ativam enzimas responsáveis pela indução da transcrição de genes *nod* no procarionto. Os genes *nod* são codificadores de um conjunto de moléculas sinalizadoras (Nods) ou oligossacarídeos de lipoquitina (LCOs), que promovem modificações nas membranas vegetais, favorecendo a infecção.

As modificações ocorrem pelo reconhecimento dos fatores de nodulação (NFs) por receptores que parecem ser lectinas específicas, produzidas pelo futuro hospedeiro. Durante o contato (NF-lectina) ocorre a adesão celular, o enrolamento dos pêlos radiculares, a degradação da parede celular na região de curvatura do pêlo, e a indução da divisão celular vegetal. Com a evolução da infecção acontece a formação de um canal dentro do pêlo radicular e o rearranjo do citoesqueleto microtubular na região do periciclo (camada mais externa do cilindro vascular, com potencial mitótico), posteriormente ocorrem a ativação das células na parte interna do córtex, as quais se dividem formando um primórdio radicular (Figura 5). Logo após, nos pêlos radiculares ocorre a infecção, entrada da célula bacteriana em seu hospedeiro. A ativação celular se estende progressivamente para o meio e para a parte mais externa do córtex de acordo com dois gradientes de diferenciação celular, resultando na formação de um primórdio nodular.

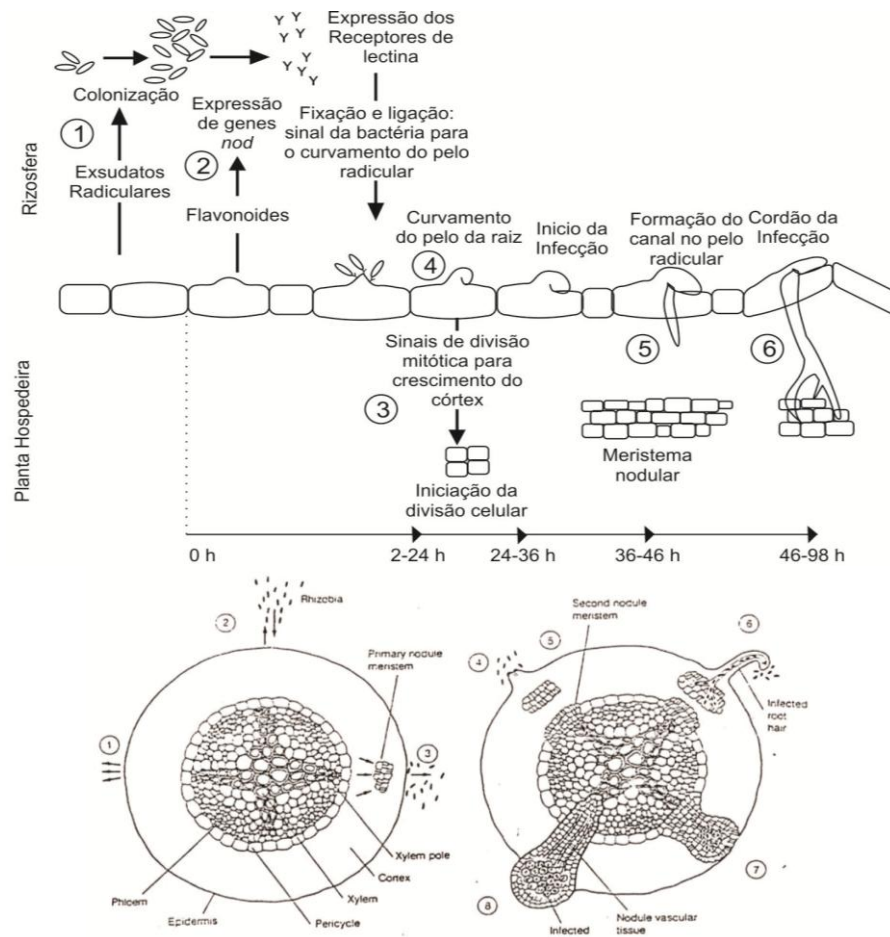
Dentro do grupo dos rizóbios é possível encontrar aproximadamente 60 tipo de fatores de nodulação, NFs (YANG et al.; 1999) e estes são considerados estirpe-específico; diferindo entre si pelo número de resíduos de N-acetilglicosaminas, na natureza dos grupos acil-graxos e nos substitutivos dos terminais redutores e não redutores (D' HAEZE; HOLSTERS, 2002), porem todos conferem as diferentes espécies de rizóbio a capacidade de nodular e estabelecer relação simbiótica com leguminosas. Portanto a função dos Nods consiste em direcionar as espécies de rizóbios para seus hospedeiros apropriados, facilitando a ligação do rizóbio com a parede celular dos pelo radicular (TEIXEIRA, 1997)

Existem vários genes envolvidos para a síntese dos fatores de nodulação (genes *nod*, *noe* e *nol*). Podendo ser classificados como genes “comuns” ou “específicos” ao hospedeiro. Os genes “comuns” são responsáveis pela síntese da estrutura básica dos NFs (3-5-N-acetilglicosamina e 1-4- $\beta$ -glicosamina) ou pela regulação da ativação dos genes *nod*. Enquanto os genes “específicos” regulam as modificações específicas nas extremidades redutoras e não redutoras do esqueleto básico dos NFs. Este último também é responsável por conferir características de especificidade entre bactéria e planta hospedeira, característica que confere nome ao grupo (MANYANI et al., 2001). Downie (1998) relata a identificação de mais de 50 genes envolvidos no processo de nodulação, estando a maioria deles localizados em plasmídeos simbióticos (pSym). Entretanto tais genes também podem ser encontrados nos genomas cromossômicos de alguns rizóbios (*A. caulinodans*, *B. japonicum*, *S. fredii* e *M. loti*), indicando uma essencialidade de tais genes para sobrevivência da bactéria.

Os “genes comuns” podem ser representados pelos genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD* (gene regulatório), *nodM* e *nodN*, dos quais possuem elevada homologia entre estirpes de rizóbios. Já os “genes específicos” são retratados como genes *nod* específicos do hospedeiro (*hsn*, host specific nodulation) e os

genes *nod* GNS (genotypic specific nodulation) (FISHER et al., 1985; HUNGRIA, 1994b).

**Figura 5** – Representação gráfica das etapas que constituem o processo de infecção vegetal por rizóbios e nodulação das raízes de leguminosas.



(1) Excreção de substâncias quimiotáticas pelas raízes atração das bactérias para a superfície radicular; (2) Secreção de flavonoides pelos hospedeiros, estimulação, nas bactérias, da produção dos fatores de nodulação, liberação de sinais mitógenos para a divisão celular e a expressão de receptores de lectina nas raízes; (3) Divisão celular no córtex radicular e produção do meristema primário; (4) Adesão das bactérias aos pêlos radiculares e iniciado processo de infecção pela curvatura do pêlo; (5) Divisão das células do periciclo (próximas aos polos do xilema e do córtex) e início da formação do cordão de infecção; (6) Formação do cordão de infecção e cresce em direção ao meristema primário do nódulo. Paralelamente, as células no periciclo continuam a dividir; (7) Fusão das massas de células em divisão e crescimento do cordão de infecção; (8) Alongamento e diferenciação do nódulo.

**Fonte:** Taiz e Zeiger (1991) e [www.plantphys.net](http://www.plantphys.net).

Em muitas espécies de rizóbios os genes “comuns” *nodA*, *nodB* e *nodC* estão agrupados em um único operon, *nodABC* (LONG, 1989). A transcrição desses genes é essencial aos estágios de pré-infecção (DUDLEY et al., 1987) e é mediada pelo regulador transcricional NodD (FISHER et al., 1988). A importância de tais genes se dá pela formação do esqueleto básico dos NFs. A síntese é realizada pelo NodC (N-acetilglicosaminiltransferase) que realiza o alongamento da cadeia oligomérica dos açúcares, NodB (deacetilase) que remove o grupo N-acetil em uma terminação não redutora do oligossacarídeo, e NodA (aciltransferase) que liga a cadeia acil no oligossacarídeo deacetilado (BROUGHTON et al., 2003).

Kamst e colaboradores (1997) em seu trabalho com *S. meliloti* descreve que apesar de ser considerado um gene “comum” e estar presente em todos os rizóbios investigados, o gene *nodC* possui um papel importante na especificidade e determinação do tipo de hospedeiro.

Ainda que os genes *nod* sejam usados em estudos filogenéticos é comum que os resultados obtidos nestes trabalhos sejam divergentes com estudos realizados com regiões ribossomais 16SrRNA. Pois os genes *nod* estão correlacionados em maior grau com o tipo de planta hospedeira envolvida no processo de nodulação (LAGUERRE et al., 2001). Estudos com tais regiões, são portanto, importantes para entender a relação de co-evolução entre plantas hospedeiras e bactérias FBN.

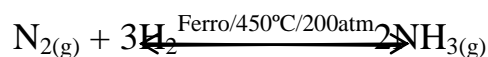
## **2.7 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO – FBN**

De acordo com Hungria (1994a) o nitrogênio é um elemento essencial, porém limitante, na agricultura tropical, devido sua utilização para formação de aminoácidos no metabolismo vegetal. O nitrogênio (N) do ambiente advém de três formas distintas: (1) do solo, em que o N é resultado da decomposição da

matéria orgânica; (2) de fertilizantes nitrogenados industrializados; e (3) pela fixação biológica através de bactérias fixadoras de nitrogênio (LESSA, 2007; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; REIS; OLIVARES, 2006).

Mesmo que o nitrogênio constitua cerca de 78% da atmosfera na sua forma gasosa, dinitrogênio (N<sub>2</sub>), as plantas são incapazes de assimilá-lo, portanto apenas compostos nitrogenados do solo, em formas utilizáveis, são absorvidos pela planta, sendo que, apenas 0,04% do nitrogênio disponível está nessa forma (DÖBEREINER, 1997; HOFFMANN, 2007; ROSSWALL, 1976).

A síntese química da amônia, também chamada de síntese de Haber-Bosch é utilizada para a produção de fertilizantes nitrogenados para a agricultura. Esse processo possui custos elevados devido à necessidade de condições especiais. A reação da transformação baseia-se na captura do nitrogênio atmosférico e na reação do gás natural com água, fornecendo moléculas de hidrogênio imperativas a reação. A síntese deve ocorrer a temperaturas entre 400 e 600°C e pressão de aproximadamente 200 atm, sendo catalisada com ferro. A amônia formada, porém é um gás, sendo necessário refrigerá-lo e mantê-lo sob alta pressão para conservá-lo no estado líquido. (BOTHE; BARBOSA; DÖBEREINER, 1983).

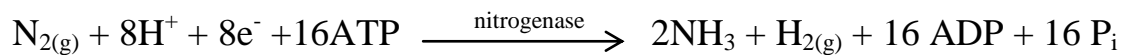


Apenas 25% do nitrogênio fixado na Terra decorrem de processos industriais; a FBN contribui com 65%, enquanto fenômenos naturais, como a ação de descargas elétricas, radiação ultravioleta e a ação vulcânica, correspondem a 10% (HUNGRIA; CAMPO, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Em contraste com os processos industriais, as bactérias chamadas diazotróficas ou FBNs são capazes de realizar o processo de fixação de nitrogênio em condições de temperaturas e pressões ambientes com auxílio do maquinário metabólico aperfeiçoado pela evolução simbiótica (SIQUEIRA; FRANCO,

1988; EPSTEIN; BLOOM, 2006). Fato que contribui para a diminuição de custos e otimização do processo.

Tais classes de bactérias FBN são capazes de transformar o nitrogênio atmosférico em sua forma inorgânica combinada (amônia), também chamada de nitrogênio fixado, utilizando processos bioquímicos mediados pelo complexo da enzima nitrogenase. Processo esse que disponibiliza o nitrogênio atmosférico para o vegetal (DÖBEREINER, 1997; HOFFMANN, 2007).

De acordo com Dean, Bolin e Zheng (1993) a conversão ocorre através da seguinte reação:



N<sub>2</sub>: nitrogênio atmosférico; H<sup>+</sup>: hidrogênio; e<sup>-</sup>: elétron; ATP: adenosina trifosfato; NH<sub>3</sub>: Amônia; H<sub>2</sub>: hidrogênio; ADP: adenosina difosfato; P<sub>i</sub>: fofato inorgânico.

A redução do substrato pela nitrogenase envolve três diferentes tipos de reações de transferência de elétrons: (i) redução da Fe-proteína por transportadores de elétrons, como flavodoxina ou ferredoxina; (ii) transferência de elétrons da Fe-proteína para a MoFe-proteína, na presença de ATP; (iii) transferência de elétrons para o substrato, utilizados para reduzir N<sub>2</sub> e H<sup>+</sup> a NH<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>(DEAN; BOLIN; ZHENG, 1993).

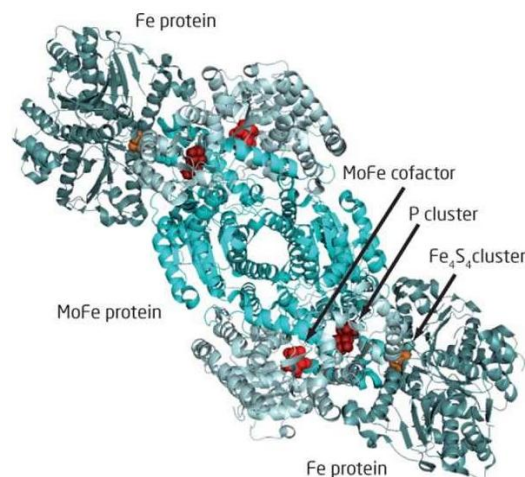
### 2.7.1 Nitrogenase

O complexo enzimático da nitrogenase é formado, basicamente, por duas metaloproteínas: um complexo maior ou molibdênio-ferro proteína (Mo/Fe-proteína ou dinitrogenase) e o componente menor ou ferro proteína (Fe-proteína ou dinitrogenase redutase), que catalisam, na presença de ATP e cofator MoFe, a redução de nitrogênio atmosférico a amônia (Figura 6).

A Fe-proteína é um dímero de subunidades idênticas (γ<sub>2</sub> – codificadas pelos gene nifH), onde cada dímero apresenta um domínio tipo α hélice/folha β

pregueada, covalentemente ligados por um núcleo [4Fe-4S] e unidos a 2 resíduos de cisteínas (Figura 6)(EADY, 1991; GEORGIADIS et al., 1992; MENSINK; HAAKER, 1992). A Fe-proteína é o componente que se liga a ATP e atua como doador de elétrons pelo processo de redução da mesma. Os elétrons da Fe-proteína são então transferidos para a Mo/Fe-proteína, com consumo de ATP (BURRIS, 1991; BURRIS, 1999; KIM; REES, 1994; TAÍZ; ZIEGER, 2004).

**Figura 6** – Modelo da estrutura do complexo nitrogenase (Mo/Fe-proteína ou dinitrogenase em azul e Fe-proteína ou dinitrogenase redutase em verde).



**Fonte:** <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n8/images/nrmicro954-f1.gif>

Já a Mo/Fe-proteína é um tetrâmero  $\alpha_2$  (codificado pelo gene *nifD*)  $\beta_2$  (codificado pelo gene *nifK*) que possui aproximadamente 2 átomos de molibdênio, 30 de ferro, 30 de enxofre, 1 núcleo com dois grupos fosfóricos (núcleo P) e 2 sítio para cofator, FeMo-co (Figura 6) (ROBERTS et al., 1978; SMITH, 1990; EADY, 1991). A Mo/Fe-proteína recebe os elétrons transferidos da Fe-proteína e os direciona, pela reação de redução, para o nitrogênio, captado em seu sítio ativo, até sua transformação a amônia. Posteriormente a amônia é transferida do bacteroide para o citosol da planta hospedeira, onde ocorre a reação de assimilação mediada pelas enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase. A assimilação acontece pela disponibilização da amônia nas suas formas

orgânicas de amidas, aminoácidos ou ureídos, dependendo do tipo de nódulo formado, e transporte dessas substâncias pelo xilema que as distribui para os demais órgãos do vegetal (BURRIS, 1999; HUNGRIA et al., 1994c; TAÍZ; ZIEGER, 2004).

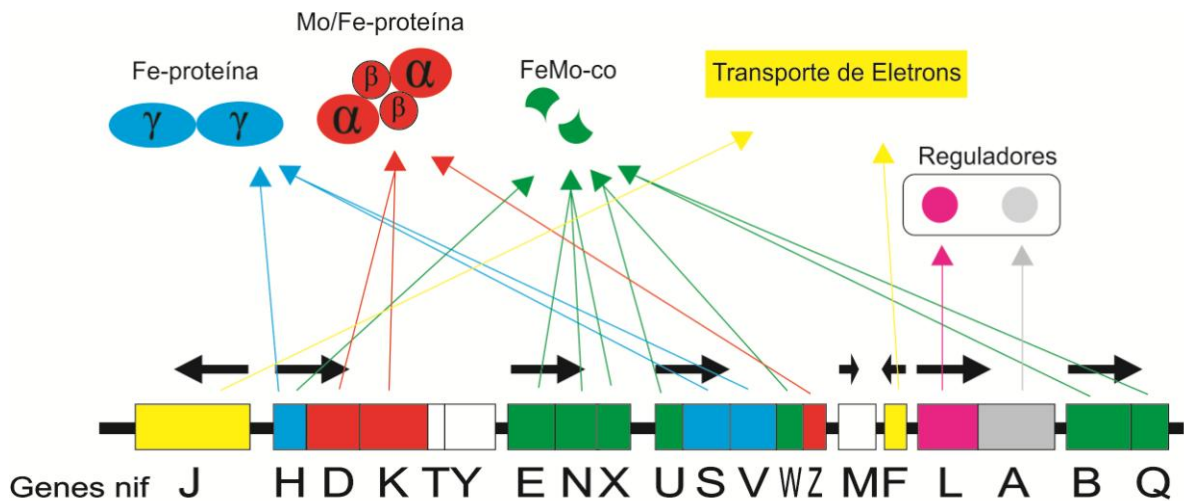
Existem, contudo, sistemas alternativos homólogos ao da Fe/MoFe-proteína, em que há a substituição da molécula de molibdênio por vanádio (Va-proteína) ou então a presença de uma única Fe-proteína (EADY, 1996). Ribbe, Gadkari e Meyer (1997) em seus estudos discutiram ainda a existência de um quarto tipo de nitrogenase, caracterizada na bactéria termofílica *Streptomyces thermoautotrophicus* sendo essa dependente de oxigênio e do radical superóxido, ambos nocivos para a maioria das nitrogenases, para a fixação do nitrogênio. Entretanto, o complexo enzimático da nitrogenase, apesar da ampla variedade de bactérias diazotróficas existentes, se apresenta relativamente conservado em termos de estrutura e função (BURRIS, 1999; KIM; REES, 1994).

Outra propriedade da nitrogenase é sua baixa especificidade por substrato, ou seja, além de reduzir o nitrogênio a amônia, a nitrogenase é capaz de reduzir outras moléculas com ligação tripla, semelhante ao N<sub>2</sub>, como por exemplo o acetileno, azida de nitrogênio, cianeto de hidrogênio e óxido nitroso (SILVER; POSTGATE, 1973; BALDANI et al., 2009)

Em 1988, Merrick; Arnold e colaboradores estudaram genes envolvidos com a fixação de nitrogênio da *Klebsiela pneumoniae*; onde relataram a presença de cerca de 20 genes envolvidos nesse processo. Tais genes estão agrupados em 8 operons adjacentes (*nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ*) e uma região com tamanho de 24-25 kb no cromossoma da *K. pneumoniae*(Figura 7). Pelo envolvimento dessas regiões com o processo de FBN, tais genes foram chamados de *nif*. Desde então, todos os genes que apresentaram homologia com os genes de fixação de nitrogênio de

*K. pneumoniae* foram chamados de genes *nif*. Os genes que não apresentaram tal homologia, porém demonstrava a mesma função dos genes *nif* foram designados de genes *fix* (HUNGRIA, 1994b).

**Figura 7**– Disposição esquemática dos genes *nif* em *Klebsiella pneumoniae*, com 20 genes e 8 operons.



Setas pretas: direção da síntese dos operons. Amarelo: genes responsáveis pelo transporte de elétrons (*nifJF*). Azul: genes estruturais para subunidades gama da Ferro-proteína (*nifHSV*).

Vermelho, genes estruturais para subunidades alfa e beta da Molibdênio/Ferro-proteína (*nifDKZ*). Branco, genes com funções não muito bem definidas (*nifTYM*). Verde, genes responsáveis pela síntese do cofator molibdênio/ferro (*nifENXUSWBQ*). Magenta, genes regulador negativo (*nifL*). Cinza, gene regulador positivo (*nifA*).

**Fonte:** Disponível em: <<http://www.asahi-net.or.jp/~it6i-wtnb/BNF.html>> Acesso em 01/11/2015. Adaptado de Triplett (2000).

Apesar de existirem cerca de 20 genes *nif* apenas três deles apresentam função estrutural (*nif HDK*), codificando as metaloproteínas estruturais do complexo enzimático nitrogenase. E oito estão relacionados com a biossíntese da FeMo-co (*nifBEHNQUVW*) (Figura 7). Os demais genes estão envolvidos com outros processo durante a FBN, como a geração de energia (*nifJ* – envolvida com o transporte de elétrons e *nifF* – doador de elétrons para proteína NifH), processamento e maturação pós-traducional (*nifY* – inserção da FeMoco), regulação da expressão da nitrogenase (*nifL* – regulador negativo e

*nifA* – regulador positivo) e ainda alguns permanecem com a função desconhecida (*nifMT*) (MERRICK, 1988; TEIXEIRA, 1997; TEIXEIRA et al., 1999; TRIPLETT, 2000).

Segundo Becking (1992), em *Rhizobium* os genes que codificam a estrutura da nitrogenase estão agrupados em um único plasmídio simbiótico (*pSym*), porém de operons distintos (*nifH* e *nifDK*).

O gene *nifH* tem sido um dos genes envolvidos com a FBN mais estudados entre os rizóbios, pois consiste em uma evidência direta da relação entre espécies dessas bactérias e seus hospedeiros, além de ser conhecida como uma região conservada na maioria dos microrganismos FBN (HAUKKA; LIDSTRÖM, 1998; LAGUERRE et al., 2001). Entretanto tal característica não é exclusiva de diazotrófos simbióticos. Estudos descrevem a presença de genes *nifn* porção extracromossomal (*pEA3*) do genoma de diazotrófos de vida livre associados a rizosfera de diversos cereais, como na espécie *Enterobacter agglomerans* (SINGH; KLEEBERGER; KLINGMULLER, 1983; SINGH; KLINGMULLER, 1986; KREUTZER et al., 1991). Como evidenciado para os genes *nod* os genes *nif* também não possuem relação filogenética direta com o gene ribossomal 16S, contudo exibem uma larga similaridade com estudos de filogenia do gene *nodA* (HAUKKA et al., 1998).

## 2.8 ESTUDO DA DIVERSIDADE

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas (MYERS, 1996). A caracterização molecular é uma ferramenta útil para o conhecimento da diversidade desses microrganismos e pode ser empregada para esclarecer relações evolutivas e co-evolutivas (PAIVA et al., 2013; WOESE, 1991).

Devido à importância dos microrganismos do solo e sua associação com vegetais em relações simbióticas ou assimbióticas, muitos estudos filogenéticos têm sido realizados. Sendo possível assim, determinar os fatores que regulam as estruturas das comunidades microbianas ao longo do tempo e espaço (ANDRADE et al., 2007; GRAYSTON, et al., 2004; IBEKWE et al., 2002; KOWALCHUCK et al., 2002; MARTINS et al., 1997; SMALLA et al., 2001.).

Nos últimos anos, a diversidade microbiana vem sendo determinada principalmente pelo uso de técnicas moleculares como a PCR, sequenciamento de regiões específicas e até de genomas(CHAGAS JÚNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010).

A técnica de PCR descrita por Saiki e colaboradores (1985) permite amplificar regiões específicas do genoma, sendo possível observar, *in vitro*, as várias cópias desse fragmento. A sequência alvo a ser amplificada é determinada utilizando-se primers (sequências iniciadoras de oligonucleotídeos) complementares a região de interesse. O primer então sofre anelamento com a sequência alvo na fita molde, e está é amplificada pela etapa de extensão pela ação de uma DNA polimerase termoestável.

Muitas técnicas moleculares, hoje utilizadas, partem da técnica de PCR ou usam suas variações para estudos de diversidade. Sendo uma das ferramentas mais fáceis e uteis para esse fim.

O estudo dos padrões de genes que codificam para os ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNAs) de procariotos têm sido largamente empregado para estudos de sua diversidade (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999; WOESE, 1991).

Os RNAs ribossomais são considerados cronômetros moleculares, pois são moléculas universais com funções altamente específicas estabilizadas ao longo da evolução e não sofrem influência por mudanças no meio ambiente, mas

seus genes (rDNA) apresentam variabilidade em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula (LANE et al. 1985). Atualmente, o gene 16S rDNA é o mais utilizado para inferir a respeito das relações filogenéticas entre bactérias devido a maior facilidade de sequenciamento e comparação em bancos de dados (RDP, Gen-Bank, EMBL) (COUTINHO et al., 1999; WOESE, 1991).

Entretanto, alguns autores afirmam que em vários grupos de procariotos abaixo variabilidade nas regiões 16S rRNA pode não refletir a diversidade detectada por outras propriedades morfo-fisiológicas e genéticas (GERMANO et al., 2006; MENNA et al., 2006; VAN-BERKUM; FUHRMANN, 2000; VINUESA et al., 1998; WILLEMS et al., 2001).

Para detecção da diversidade, as regiões espaçadoras intergênicas 16S-23S rDNA (IRS) posicionada entre os genes 16S e 23S, consistem em fontes de estudo com maior valor discriminatório, devido sua maior variabilidade em tamanho e composição de bases ao serem comparadas às regiões gênicas ribossômicas (16S e 23S), podendo ser empregadas em análises de microdiversidade, onde o potencial discriminatório entre os fragmentos deve ser maior (GÜETLER; STANISICH, 1996; ROSADO; DUARTE; MENDONÇA-HAGLER, 1999).

Para González (2008), Güetler e Stanisich (1996) e Laguerre et al. (1996) a IRS tem sido usada com sucesso para caracterizar e identificar rizóbios a nível de gênero e espécie, obtendo informações taxonômicas, devido às variações no número de bases dessas regiões.

A técnica conhecida como método de análise de sequência multilocus (MLSA) também tem sido empregada em estudos de filogenia para identificação e reclassificação de espécies (ARDLEY et al., 2012; GEVERS et al., 2005; VINUESA et al., 2005a).

A técnica consiste em sequenciar regiões gênicas, *locus*, que atuem como marcadores filogenéticos, diferente das rRNAs. Desta forma o MLSA confere robustez a classificação e agrupamento filogenético de bactérias, já que diminui os efeitos de translocações horizontais e recombinações de um único gene e possui uma taxa de evolução mais rápida que a encontrada para os genes ribossomais (GEVERS et al., 2005). A metodologia de MLSA já foi aplicada em estudos taxonômicos de diferentes gêneros bacterianos, como *Bradyrhizobium*, *Bulkholderia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Mycobacterium* e *Ensifer*, *Methylobacterium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Shinella*, *Microvirga*, *Phyllobacterium*, *Cupriavidus* (antes conhecido por *Ralstonia*) e *Gluconacetobacter* (ARDLEY et al., 2012; GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2007; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009; THOMPSON et al., 2005; VINUESA et al., 2005a).

De acordo com Zeigler (2003) e Thompson e colaboradores (2005), os genes utilizados como marcadores filogenéticos alternativos, além de serem conservados para o grupo em estudo, precisam obedecer alguns critérios como: 1) estar distribuídos no genoma com uma distância mínima entre os genes de 100 kb; 2) estar presentes no genoma em uma única cópia; 3) apresentar uma extensão nucleotídica suficiente para permitir o sequenciamento; 4) conter informações suficientes para a análise; e 5) estar correlacionados com dados obtidos com o gene ribossomal 16S e com os percentuais de similaridade obtidos por hibridização DNA-DNA.

Os genes *housekeeping* vêm sendo amplamente usado em testes com MLSA, pois são suficientemente adequados para os critérios supracitados. Alguns genes como o *atpD*, que codifica subunidade beta da proteína ATP sintetase, possuem alta correlação com a região 16S rRNA, e portanto são excelentes marcadores para comparação com o mesmo. No entanto, a recombinação genética deste gene pode causar grande heterogeneidade genética

e, portanto, ele deve ser usado com cautela em estudos filogenéticos (GAUNT et al, 2001; MENNA; BARCELLOS; HUNGRI, 2009; STEPKOWSKI et al, 2007). Em seu estudo Menna,Barcellos e Hungri (2009) também acharam boa correlação entre os genes *glnII*, que codifica a proteína glutamina sintetase II, de *Bradyrhizobium* e suas regiões 16S rRNA, favorecendo uma construção filogenética mais sólida.

Segundo Rosado,Duarte e Mendonça-Hagler (1999) outra forma de identificação de espécies diazotróficas, é pela sequência codificadora da subunidade Fe-proteína de nitrogenases, *nifH*. Tal gene apresenta sequências extremamente conservadas, sendo considerado um dos genes funcionais existentes mais antigos. Sua utilização em processos de identificação microbiana permite realizar uma correlação entre a estrutura e a função da comunidade procariótica, devido seu caráter funcional.

A classificação baseada em genes conservados como o 16S rRNA pode diferir consideravelmente da classificação baseada nos genes funcionais *nod*, *nif* e *fix*, no entanto esses são bem semelhantes entre si. Fato que pode ser explicado pelo fenômeno das transferências horizontais de material genético entre genes plasmídiais de espécies de rizóbios, como o *Mesorhizobium loti* (HAUKKA et al. 1998; SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN; RONSON, 1998). Portanto, é importante distinguir entre o progresso evolutivo dos plasmídeos e o progresso evolutivo dos cromossomos (EARDLY et al., 1992).

Outra ferramenta de identificação comumente usada é a rep-PCR (PCR de elementos repetitivos), também conhecida como *fingerprinting* genômico. Tal método consiste na amplificação de sequências repetitivas altamente conservadas, presentes em múltiplas cópias no genoma da maioria das bactérias. Três famílias de sequências repetitivas foram identificadas: (1) sequências REP, utiliza primers que se anelam a regiões palindrômicas extragênicas repetitivas com tamanhos de 35-40 pb; (2) sequências ERIC, utiliza primers que se anelam

a sequências intergênicas consensuais altamente repetitivas de enterobactérias com tamanhos de 124-127 pb; e (3) Elemento BOX, usa primers que se anelam a sequências de DNA altamente repetitivas e conservadas, divididas com tamanho de 154 pb. As regiões BOX são consideradas mais robustas e produzem um padrão de fragmentos complexos, quanto a REP possuem menor complexidade, no entanto geram padrões de *fingerprinting* reprodutíveis e confiáveis para diferenciação de isolados. O conjunto ERIC é mais sensível a condições subótimas da PCR, presença de contaminantes nas amostras, porém também gera um padrão discriminatório elevado (RADEMAKER; BRUIJN, 1997).

## **2.9 ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÔMICA POR PFGE**

A eletroforese em gel de campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE) é uma técnica utilizada para separação do genoma total bacteriano intacto, podendo separar cromossomos inteiros ou grandes fragmentos de DNA (aproximadamente 600 kb), megaplasmídeos e plasmídeos. O método foi desenvolvido em 1984 por Schwartz e Cantor como alternativa a eletroforese em gel de agarose convencional, para separar grandes fragmentos de DNA (maiores que 50 kb). A técnica é baseada na troca da direção do campo elétrico empregado no sistema, sendo que, a migração das moléculas de DNA pela rede de agarose é constantemente reorientada. Portanto as moléculas de DNA são compelidas a se posicionarem de forma paralela ao campo de força sempre que ocorre uma mudança na direção, antes de migrarem para a direção do pólo positivo, fazendo com que os fragmentos menores e/ou lineares se reorientem com maior facilidade em relação aos maiores e/ou circulares, que demoram mais para se adaptarem à nova direção. O tempo entre as mudanças de orientação pelo campo elétrico e a migração das moléculas para o pólo positivo gera a separação dos

*replicon*se a formação de um perfil de bandas diferencial (MAGALHÃES et al., 2005; JACOBS, PAYNE; BENDICH, 1996).

Na PFGE os padrões de restrição de genomas bacterianos completos são analisados e comparados. O cromossomo bacteriano é digerido por uma endonuclease de restrição de corte raro, com o objetivo de abrir as moléculas circulares de DNA. Para proteger o DNA bacteriano de danos mecânicos, os microrganismos são imobilizados pela mistura da suspensão bacteriana em agarose fundida antes da lise celular. Os blocos contendo DNA purificado e digerido são inseridos em géis de agarose, e os fragmentos do DNA separados por eletroforese em gel de campo pulsado geram perfis de bandas que são comparados para determinar a relação entre eles (LUKINMAA et al., 2004; JACOBS, PAYNE; BENDICH, 1996; TENOVER et al., 1997; TENOVER et al., 1995).

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização genômica e molecular de 24 bactérias associadas à *Mucuna aterrima* no Cerrado Goiano.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a caracterização molecular pela técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), separando os *osreplicons* das 24 bactérias isoladas de nódulos de *Mucuna aterrima* do Cerrado goiano e de estirpes controles.

Realizar a caracterização molecular pela extração do DNA e análise poligênica pela técnica da PCR para os genes 16S rRNA, regiões espaçadoras intergênica (16-23S rRNA), regiões repetitivas pelo primer REP, genes envolvidos na fixação de nitrogênio (*nif*), nodulação (*nod*) e gene *housekeeping* (*glnII*, *atpD*), assim como o polimorfismo gerado pela técnica de ARDRA do gene 16S rRNA de 24 bactérias isoladas de nódulos de *Mucuna aterrima* do Cerrado goiano e de estirpes controles.

Utilizar os dados obtidos para estabelecer a similaridade e a diversidade das bactérias em estudo, utilizando o programa NTSYS.

Realizar a caracterização molecular pelo sequenciamento da região 16S rRNA, a fim de estimar o gênero de 24 bactérias isoladas de nódulos de *Mucuna aterrimado* Cerrado goiano.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da UnUCET da Universidade Estadual de Goiás (UEG) localizado em Anápolis, Goiás.

### 4.1 MATERIAL AMOSTRAL - BACTÉRIAS

Os vintesquatro isolados dos nódulos de raízes de mucuna preta (*Mucuna aterrima*) utilizados neste trabalho assim como as estirpes controle foram cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão em Santo Antônio de Goiás, GO; obtidos de campos experimentais de sistema orgânico de produção, e de três regiões goianas: Porangatú, Rio Verde e Santo Antônio de Goiás – “Fazendinha”(Tabela 1).

**Tabela 1** – Código dos isolados obtidos a partir de nódulos de mucuna preta (planta isca) com seus respectivos municípios, local de coleta e quantidade de isolados.

<b>Código*</b>	<b>Município</b>	<b>Local</b>	<b>Quantidade</b>
<b>48</b>	Rio Verde	Cultivo	8 Isolados
<b>58</b>	Porangatú	Cultivo	3 Isolados
<b>62</b>	Porangatú	Cultivo	6 Isolados
<b>67</b>	Rio Verde	Cultivo	5 Isolados
<b>72</b>	Santo Antônio de Goiás - "Fazendinha"	Cultivo	2 Isolados
<b>Total:</b>			24 Isolados

\* Código dos isolados de mucuna usados nas análises

Foram utilizadas como referências e controles para as análises 11 bactérias: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA

135); *Mesorhizobium mediterraneum* (estirpe BR522); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145 e SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5).

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA ARQUITETURA GENÔMICA

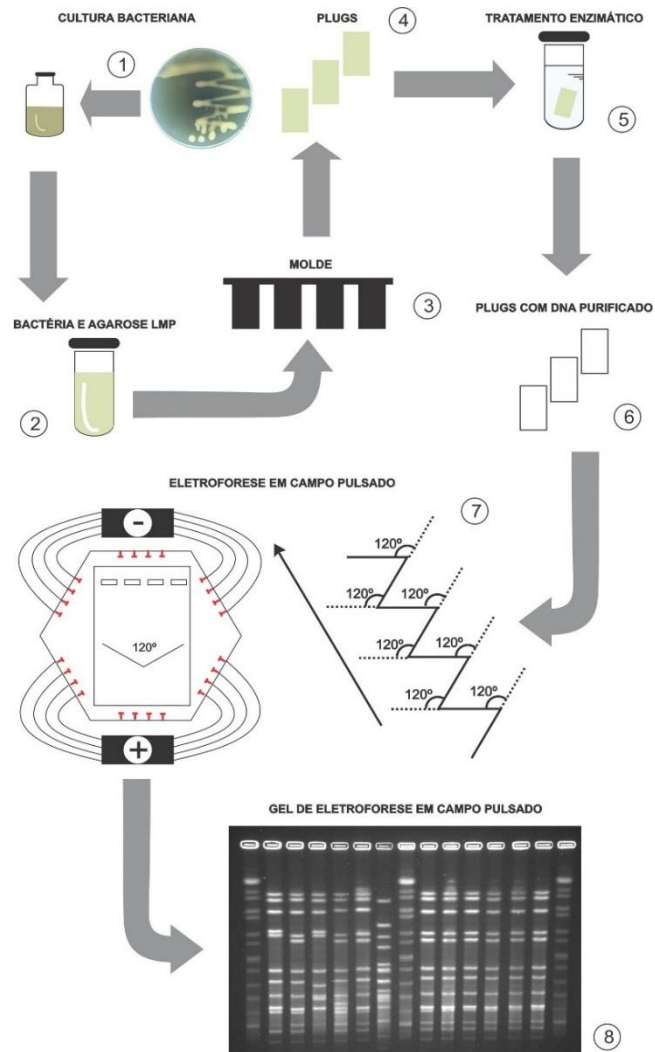
A caracterização da arquitetura genômica foi realizada pela técnica de gel de eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE). As etapas pertinentes a técnica de PFGE podendo ser visualizada no esquema da Figura 8.

Inicialmente as colônias de bactérias foram inoculadas em meio PY líquido (0,5% de peptona; 0,3% de extrato de levedura e 4,5 mM CaCl<sub>2</sub>) contendo 10 µg/mL de ácido nalidíxico, a 140 rpm, por 18 horas, em 28 °C para seu crescimento e desenvolvimento até que a suspensão bacteriana atingisse uma densidade óptica (D.O.) entre 0,4-0,8, lida em espectrofotômetro a 600nm (etapa 1 da Figura 8).

A extração do DNA genômico (*replicons*: cromossômico e plasmídiais) foi realizada segundo Mavingui e colaboradores (1997) utilizando o *pellet* de um mililitro da suspensão bacteriana, 50 µL de solução tampão SET (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 20 mM de EDTA e 200 mM de NaCl) e 50 µL de agarose *low-melting-point* (LMP) para imobilização das células em *plug* gel (etapa 2, 3 e 4 da Figura 8). Os *plugs* foram tratados com soluções tamponante EC-lise (10 mM de Tris-HCl, pH 7,6; 100 mM de EDTA, pH 8,0; 50 mM de NaCl; 0,2% de desoxicolato de sódio; 0,5% de N-laurilsarcosina de sódio; 0,5% de Triton X-100) contendo 0,5 mg/mL de lisozima, para rompimento da parede e exposição do conteúdo celular (etapa 5 da Figura 8). Em seguida a solução tampão EC-lise/lisozima foi substituída por outra solução tamponante, DB (0,5 mM de EDTA e 1% de laurilsarcosina), e foi adicionado 0,1 mg/mL de proteinase K, a

fim de realizar a degradação da porção proteica das células no *plug* e purificar seu material genético (etapa 5 da Figura 8).

**Figura 8** – Esquema ilustrativo das etapas do processo de preparação de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE).



**Fonte:** Próprio autor.

O gel de agarose foi preparado a 1,0% com TBE 0,5X (44,5 mM de tris base; 44,5 mM de ácido bórico; 25,5 mM de EDTA, pH 8,0). O protocolo para eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) foi organizado de acordo com o método publicado por Schwartz e Canto (1984), sob corrente elétrica de 150 V em 4 fases lineares por 24 horas (1ª fase: pulsos de 5s por 1 hora; 2ª fase: pulsos de 15s por 1 hora; 3ª fase: pulsos de 25s por 10 hora; 4ª fase: pulsos de

40s por 12 hora) (etapa 7 da Figura 8). Os géis foram corados segundo Sambrook e colaboradores (1989), em brometo de etídio ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), observados em transluminador UV e fotografados com câmara digital. Os perfis de bandas formados foram comparados ao marcador de peso molecular DNA Size Standards – Lambda Labber (OLIVEIRA et al., 2007) (etapa 8 da Figura 8).

Os dados obtidos foram analisados pelo software Vision Works LS<sup>®</sup> (Versão 6.3.3) e as medidas dos fragmentos foram obtidas pelos testes de médias de Tukey utilizando o software SISVAR<sup>®</sup> (FERREIRA, 2008).

### **4.3 ANÁLISE MOLECULAR PELA PCR**

Para a extração do DNA, foram utilizados 24 isolados e 11 bactérias controles. Estas foram cultivadas em meio líquido YM sem corante e com adição de cloranfenicol ( $2,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e ácido nalidíxico ( $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), por 24 horas sob agitação de 140 rpm a 30 °C.

Posteriormente, 3,0mL da suspensão de bactérias foi centrifugada (minispin plus Eppendorf<sup>®</sup>), por 4 minutos a 13.000 rpm. As células foram lavadas com solução salina (NaCl 0,9%), a fim de retirar exopolissacarídeos e o sobrenadante foi descartado.

O aglomerado de células foi ressuspenso em 600 $\mu$ L de solução de lise de DNA (50 $\mu$ M de Tris (hidroximetil) aminometano – tris pH 7,6; 20 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA; 400mM de cloreto de sódio – NaCl; 1% de dodecil sulfato de sódio – SDS) e incubado em banho termostaticado (TE 2005 Tecnal<sup>®</sup>) por 10 minutos a 80 °C. Posteriormente as amostras foram transferidas para o banho de gelo por 5 minutos.

Quatro microlitros de solução de RNase ( $24 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram adicionados ao meio reacional e levadas a incubação por 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . A reação foi submetida ao banho de gelo por 5 minutos para interromper a reação enzimática.

Em seguida  $200\mu\text{L}$  de cloreto de sódio  $0,5\text{M}$  foram transferidos para reação, e incubados por 5 minutos em banho de gelo para aglomeração e precipitação do DNA. A mistura foi então centrifugada a  $13.000 \text{ rpm}$  por 15 minutos e seu sobrenadante foi transferido para um novo tubo já contendo  $600\mu\text{L}$  de isopropanol (P.A.), a temperatura ambiente, e levado ao banho de gelo por 15 minutos. O meio reacional foi centrifugado a  $13.000 \text{ rpm}$  no período de 20 minutos e o sobrenadante descartado. O volume de  $600\mu\text{L}$  de solução de etanol 70% foi adicionado para lavagem do precipitado e a mistura foi levada a centrifugação por 3 minutos a  $13.000 \text{ rpm}$ , posteriormente o sobrenadante foi descartado; esta última etapa foi repetida mais uma vez.

O DNA extraído foi seco em temperatura ambiente por um período de aproximado de 24 horas, e em seguida,  $55 \mu\text{L}$  de tampão  $T_{10}E_1$  foi adicionado ao sistema para a dissolução do material genético e prevenção da ação de exonucleases (CHUEIRE, 2003). A suspensão foi armazenada a  $-20^\circ\text{C}$  em ultrafreezer (Q315U-32 Quimis®) para utilização em análises posteriores.

O produto da extração foi submetido à técnica da PCR. A amplificação foi realizada utilizando oligonucleotídeos para regiões específicas do genoma como a região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA e sequências denominadas de palindrômicas extragênicas repetidas (REP), e dos genes 16S rDNA, *glnII*, *atp*, *nodC* *enifH* (Tabela 3); com  $20 \mu\text{L}$  de uma mistura reacional (Tabela 2) seguindo protocolo de Reis Júnior e colaboradores (2004) com modificações (Tabela 4).

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,3% ou 1,7%), a 70 volts por 120 minutos, utilizando tampão TBE  $0,5\text{X}$  ( $44,5 \text{ mM}$  de tris base;  $44,5 \text{ mM}$  de ácido bórico;  $25,5 \text{ mM}$  de

EDTA,pH8,0). Os perfis de bandas formados foram comparados a marcadores de peso molecular da BioLabs<sup>®</sup>, 1kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.

Os fragmentos amplificados por PCR obtidos da região 16S rRNA foram avaliados pela técnica de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) que consiste na utilização de enzimas de restrição com padrões de corte diferentes para observar diferentes sequências do gene 16S rRNA (GRIFONI et al., 1995), por conseguinte os dados obtidos foram utilizados para as análises de similaridade. Assim, cada produto de PCR foi submetido ao corte com a enzima de restrição *HaeIII* (reconhece 5'...GG↓CC... 3'nucleotídeos). Neste procedimento, 5 µL do produto da PCR de 16S rRNA amplificado foi “digerido” por 2 U de endonuclease *HaeIII* em tampão enzimático 1 vez e água q.s.p. 20 µL. A mistura foi levada ao banho-maria a 37 °C por 1 horas. Após a “digestão”, o padrão de bandas foi visualizado por eletroforese em gel de agarose (2,0%), em tampão TBE 0,5X por 2 h a 70 V, juntamente com o marcador de peso molecular 1kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder da BioLabs<sup>®</sup>.

Os géis foram corados segundo Sambrook e colaboradores (1989), em brometo de etídio (1 mg.mL<sup>-1</sup>); observados em transluminador UV modelo Multi Doc-It *Imaging System*<sup>®</sup>(UVD) e fotografados com câmera digital, a fim de separar e classificar os fragmentos de DNA amplificados nas reações das PCRs e pela técnica de ARDRA (OLIVEIRA et al., 2007).

Os dados obtidos pelas ampliações foram analisados pelo software Vision Works LS<sup>®</sup> (Versão 6.3.3) e as medidas dos fragmentos foram obtidas pelos testes de médias de Tukey utilizando o software SISVAR<sup>®</sup> (FERREIRA, 2008).

**Tabela 2** – Concentração dos reagentes utilizados no sistema de reação para amplificação por PCR e respectivas regiões.

	<b>16S rRNA<sup>4</sup></b>	<b><i>glnII</i><sup>5</sup></b>	<b><i>atpD</i><sup>6</sup></b>	<b><i>nodC</i><sup>7</sup></b>	<b><i>nifHr</i><sup>8</sup></b>	<b><i>nifHl</i><sup>10</sup></b>	<b><i>mela</i><sup>9</sup></b>	<b>IRS 16-23S<sup>11</sup></b>	<b>REP<sup>12</sup></b>
<b>Tris-HCl (pH 8,8)</b>	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
<b>KCl</b>	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,5 mM	3,8 mM	1,9 mM	2,0 mM	2,0 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
<b>dNTP<sup>1</sup></b>	0,3 mM	0,4 mM	0,3 mM	0,4 mM	0,5 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,3 mM	0,2 mM
<b>Oligonucleotídeo <i>forward</i></b>	0,3 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,4 µM	0,2 µM	0,1 µM	0,2 µM	0,3 µM	0,2 µM
<b>Oligonucleotídeo <i>reverse</i></b>	0,25 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,4 µM	0,2 µM	0,1 µM	0,2 µM	0,25 µM	0,2 µM
<b>Taq polimerase</b>	1 U	1,5 U	1 U	1 U	1,5 U	1 U	1,5 U	1,5 U	1,5 U
<b>DMSO<sup>2</sup></b>	-	-	-	1%	-	-	-	-	4%
<b>DNA<sup>3</sup></b>	1:0	1:1	1:9	1:9	1:6	1:9	1:1	1:0	1:6
<b>Volume final</b>	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

<sup>1</sup> Mistura dos quatro nucleotídeos (ATP, GTP, CTP, TTP). <sup>2</sup>Dimetilsulfóxido. <sup>3</sup> Proporções de diluições de DNA em água ultra pura (DNA:Água). <sup>4</sup> 16S rRNA: região do gene ribossomal 16S rRNA; <sup>5</sup>*glnII*: região gene codificador para glutamina sintetase II; <sup>6</sup>*atpD*: região gene codificador para subunidade β da ATP sintetase; <sup>7</sup>*nodC*: região do gene envolvidos na nodulação; <sup>8</sup>*nifHr*: região do gene envolvidos na fixação de nitrogênio específica para o grupo dos rizóbios; <sup>9</sup>*nifHl*: região do gene envolvidos na fixação de nitrogênio menos conservada; <sup>10</sup>*mela*: região do gene codificador de melanina <sup>11</sup>IRS 16-23S: regiões espaçadoras intergênica (16-23S rRNA); <sup>12</sup> REP: regiões repetitivas.

**Tabela 3**– Primers utilizados com suas respectivas sequências para amplificação de sequências genicas: IRS 16S-23S rRNA, REP, 16S rRNA, *glnII*, e *nifH*.

Região	Primer <sup>1</sup>	Sequencias (5' – 3') <sup>2</sup>	Tm (°C) <sup>3</sup>	Peso (pb) <sup>4</sup>	Referência
16S rRNA	Y1f	TGG CTC AGA ACG AAC GCT GGC GGC	81,6	1500	Young; Downer; Eardly (1991)
	Y3r	CTG ACC CCA CTT CAG CAT TGT TCC AT	73,3		
<i>glnII</i>	<i>glnII</i> 12f	YAA GCT CGA GTA CAT YTG GCT	55,0	660	Vinuesa et al. (2005b)
	<i>glnII</i> 689r	TGC ATG CCS GAG CCG TTC CA	77,1		
<i>atpD</i>	<i>atpD</i> 255f	GCTSGGCCGCATCMTSAACGTC	67,4	550	Vinuesa et al. (2005)
	<i>atpD</i> 782r	GCCGACACTTCMGAACCNGCCTG	77,6		
<i>nodC</i>	<i>nodC</i> 540f	TGATYGAYATGGARTAYTGGCT	61,6	930 - 1300	Sarita et al. (2005)
	<i>nodC</i> 1160r	CGYGACARCCARTCGCTRRTTG	61,7		
<i>nifHr</i> <sup>5</sup>	<i>nifHf</i>	TAC GGN AAR GGS GGN ATC GGC AA	61,8	780 - 890	Laguerre et al. (2001)
	<i>nifHr</i>	AGC ATG TCY TCS AGY TCN TCC A	75,8		
<i>nifHr</i> <sup>6</sup>	<i>nifHf</i>	AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC	64,1	400	Rösh, Mergel, Bothe (2002)
	<i>nifHr</i>	TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC ATC AT	70,2		
IRS <sup>7</sup>	<i>pHRf</i>	TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT	61,3	8	Laguerre et al.(1996)
	P23r	CCG GGT TTC CCC ATT CGG	71,7		

REP	REPf	III ICG ICG ICA TCI GGC	32,2	8	Versalovic et al. (1994)
	REPr	ICG ICT TAT CIG GCC TAC	41,9		
<i>mela</i>	melAf	CCG AAC GTC CAT GGC GTG GCT GGT C	63,8	1850	Cabrera-Valladares et al. (2006)
	melAr	CCG GAG CCC GGG TGT TAG GCG GAC A	64,0		

<sup>1</sup>f: primer *forward*; r: primer *reverse*. <sup>2</sup>H: A, C ou T; I: inosina; K: G ou T; M: A ou C; N: A, C, G ou T; R: A ou G; S: C ou G; Y: C ou T. <sup>3</sup>Temperatura de *melting*. <sup>4</sup> Os isolados que obtiveram fragmentos com tamanhos descritos para cada região foram considerados positivos.

<sup>5</sup>Regiões *nifH* específica para o grupo dos rizóbios. <sup>6</sup> Regiões *nifH* menos conservadas. <sup>7</sup> Região espaçadora interagência 16-23S rRNA. <sup>8</sup> Possuem tamanhos variados.

**Tabela 4**– Condições dos ciclos (tempo e temperatura) utilizados para amplificação pela PCR para os diferentes oligonucleotídeos.

Região	Desnaturação Inicial (1 vez)	Ciclos Intermediários (30 vezes)			Extensão Terminal (1 vez)
		Desnaturação	Anelamento	Extensão	
16S rRNA	95 °C por 3 min	94 °C por 45 seg	62 °C por 45 seg	72 °C por 1 min e 30 seg	72 °C por 5 min
<i>glnII</i>	95 °C por 4 min	94 °C por 1 min	58 °C por 1min	72 °C por 2 min	72 °C por 7 min
<i>atpD</i>	95 °C por 2 min	95 °C por 45 seg	58 °C por 30 seg	72 °C por 1 min e 30 seg	72 °C por 7 min
<i>nodC*</i>	94 °C por 3 min	94 °C por 20 seg	65 °C por 30 seg	72 °C por 30 seg (1 vezes)	72 °C por 5 min
		96 °C por 20 seg	62 °C por 30 seg	72 °C por 35 seg (2 vezes)	

		96 °C por 20 seg	59 °C por 30 seg	72 °C por 40 seg (3 vezes)	
		96 °C por 20 seg	56 °C por 30 seg	72 °C por 45 seg (4 vezes)	
		96 °C por 20 seg	53 °C por 30 seg	72 °C por 50 seg (5 vezes)	
		96 °C por 20 seg	50 °C por 30 seg	72 °C por 1 min (25 vezes)	
<i>nifHr</i>	95 °C por 3 min	94 °C por 45 seg	57 °C por 1 min	72 °C por 3 min	72 °C por 5 min
		96 °C por 20 seg	65 °C por 30 seg	72 °C por 30 seg (1 vezes)	
		96 °C por 20 seg	62 °C por 30 seg	72 °C por 35 seg (2 vezes)	
<i>nifH<sup>i</sup>*</i>	-	96 °C por 20 seg	59 °C por 30 seg	72 °C por 40 seg (3 vezes)	72 °C por 10 min
		96 °C por 20 seg	56 °C por 30 seg	72 °C por 45 seg (4 vezes)	
		96 °C por 20 seg	53 °C por 30 seg	72 °C por 50 seg (5 vezes)	
		96 °C por 20 seg	50 °C por 30 seg	72 °C por 1 min (25 vezes)	
IRS	95 °C por 3 min	94 °C por 45 seg	62 °C por 45 seg	72 °C por 1 min e 30 seg	72 °C por 5 min
REP	95 °C por 3 min	94 °C por 1 min	40 °C por 1 min	65 °C por 8 min	65 °C por 15 min
<i>mela</i>	95 °C por 3 min	94 °C por 1 min	57 °C por 1 min	68 °C por 3 min	68 °C por 10 min

\* Variações nos ciclos intermediários. A quantidade de ciclo foi descrita subsequente a fase de extensão de cada ciclo intermediário.

#### 4.4 TRATAMENTO DOS DADOS

Os perfis de bandas das análises moleculares pela PCR e dos perfis de PFGE para cada isolado foram transformadas em dados binários e analisados utilizando-se o Programa NTSYS-pc<sup>®</sup> (versão 2.10), a partir da construção de uma matriz 0-1, onde a presença de determinada característica era declarada 1 e sua ausência 0. Os valores gerados para cada isolado foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo Coeficiente de Jaccard (J) em que  $J = a/(n-d)$ , sendo “a” o número de combinações com a presença das características menos as combinações de ausência das mesmas, “d” o número de combinações de ausência de características e “n” o números de combinações possíveis. Os índices de Jaccard foram obtidos pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) e os isolados foram agrupados e representados graficamente por um dendrograma de similaridade (SNEATH & SOKAL, 1973).

Como recomendado por Hungria e colaboradores (2008) fragmentos maiores que 12000 pb e inferiores a 300 pb dos produtos da PCR de rizóbios e outras bactérias promotoras de crescimento vegetal foram desconsiderados para análise. Pois apresentam alta variabilidade e pouca resolução no perfil, dificultando a determinação do peso molecular dos fragmentos. Tais bandas também podem representar falsos amplificados de PCR (DNA não amplificado, maiores que 12000pb, ou RNAs, inferiores a 300pb).

#### 4.5 SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S rRNA

Os produtos de PCR da região 16S rRNA foram submetidos a um processo de purificação com PEG (polietilenoglicol) antes do sequenciamento. Para tal, foi adicionado PEGem uma proporção 1:1 ao produto de PCR, que então foram

mantidos a 37°C por 30 minutos para solubilização do excesso de oligonucleotídeos iniciadores e nucleotídeos livres. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e 125 µL de etanol gelado 80% foram adicionados. A solução foi mantida em repouso por 1 minuto, para a precipitação do DNA. A mistura foi levada a centrifuga por 2 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a lavagem com etanol foi repetida mais uma vez. O etanol remanescente foi seco em estufa a 37 °C e uma alíquota de 15 µL de tampão T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM) foi usada para ressuspender o material genético.

As reações de sequenciamento foram realizadas em microtubos de 200 µL utilizando o Kit ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1. Foram realizadas reações para o oligonucleotídeo iniciador, *forward* Y1. As reações de sequenciamento apresentam-se na Tabela 5.

**Tabela 5**– Sistema de reação de Sequenciamento utilizada para amplificação da região 16S rRNA.

Reagentes	Volume (µL)
Oligonucleotídeo Y1 (10 µM)	0,7
Produto de PCR 16S	4,0
BigDye Terminator	0,56
Tampão 5 X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl <sub>2</sub> )	1,4
<b>Volume da Reação</b>	<b>8,2</b>

As condições utilizadas no termociclador foram: abertura inicial das fitas a 96 °C por 1 minuto; seguida de 25 ciclos em três etapas, (1) abertura das fitas a 96 °C por 15 segundos, (2) anelamento dos primers a 50 °C por 15 segundos e (3) extensão a 60 °C por 4 minutos.

As reações de sequenciamento passaram então por uma etapa de purificação. Onde 19,8  $\mu\text{L}$  de água ultra pura foram adicionadas a reação, junto com 2 $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 7,5 M e 60  $\mu\text{L}$  de izopropanol (P.A.). A mistura foi homogeneizada por inversão e levada ao banho de gelo onde permaneceu por 10 minutos. Posteriormente a reação foi centrifugada a 13.000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% foram adicionados. Novamente a mistura passou pelo processo de centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e a reação foi mantida em estufa a 37 °C, por 24 horas, para secagem.

As amostras foram então enviadas para Universidade Federal do Paraná, que em parceria realizou o sequenciamento dos isolados pela resuspensão em 4 $\mu\text{L}$  de formamida (grau biologia molecular) e leitura em sequenciador automático de DNA (ABI 3500 Genetic Analyser).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 ARQUITETURA GENÔMICA – PFGE

A análise da estrutura genômica pela técnica de gel de agarose em campo pulsado revelou a presença de um único *replicon* para a maioria dos isolados testados. Tal *replicon* obteve um peso molecular próximo a 1,2 Mb (Figura 9).

Apenas os isolados 48-28, 48-32, 58-2 e 58-9 não demonstraram perfil de separação (Figura 9). Sendo possível sugerir que tais materiais genéticos que ficaram retidos nos poços, desse isolados e dos demais, possuem *replicons* circulares de alto peso molecular e, por tanto, não pode migrar pela malha do gel de agarose.

Estudos com estirpes de rizóbios revelam padrões de *replicons* diversificados para cada espécie de rizóbios, assim como para outras espécies de bactérias endofíticas. A dinâmica de relações genéticas e fenotípicas entre os microrganismos do solo tornam esse grupo uma população mista e rica em diversidade genoma, dificultando estudo de identificação genética devido à translocações horizontais de seus conteúdos genéticos. (LI et al., 2008)

Cromossomos com 3,6 Mb e plasmídeos com tamanhos entre 1,7 (pSymA) e 1,3 (pSymB) Mb foram caracterizados em *Sinorhizobium meliloti* no trabalho de Galebert e colaboradores (2001) e de Mavingui e colaboradores (2002). Já o sequenciamento completo do genoma de *Mesorhizobium loti* apontou a existência de um cromossomo único com sete Mb e dois plasmídeos, pMLa (352 kb) e pMLb (208 kb) (KANEKO et al., 2000).

Análises com outros gêneros de rizóbios demonstraram perfis variados. A divergência entre os perfis comprova a diversidade genética do grupo dos rizóbios, e corroboram com a teoria de coevolução, onde cada espécie é

evolutivamente mais adaptada a uma planta hospedeira específica (HUNGRIA, 1994c).

O representante do gênero *Bradyrhizobium*, *B. japonicum*, exibe apenas um *replicon* cromossomal de nove Mb, sem presença de plasmídeos (KANEKO et al., 2002). Enquanto o genoma de *Rhizobium etli* mostra um cromossomo de 4,38 Mb e seis plasmídeos: p42a (194 kb), p42b (184 kb), p42c (250 kb), p42d (371 kb), p42e (505 kb), p42f (642 kb) (GOZÁLEZ et al., 2006). Perfil semelhante pode ser encontrado para o *R. leguminosarum* com um cromossomo de 5,05 Mb e seis plasmídeos: pRL7 (151 kb), pRL8 (147 kb), pRL9 (352 kb), pRL10 (488 kb), pRL11 (684 kb) e pRL12 (870 kb) (YOUNG; PENNYCOOK; WATSON, 2006).

Os plasmídeos simbióticos (*pSym*) do grupo dos rizóbios tem grande importância nos estudos da classe, pois contém a maioria dos genes responsáveis pela nodulação e fixação do nitrogênio, conferindo à bactéria a habilidade de infectar, colonizar ambientes anaeróbicos e metabolizar uma variedade de formas químicas de nitrogênio, além do nitrogênio gasoso (GALIBERT et al., 2001).

Plasmídeos simbióticos também podem ser fontes gênicas para transformação de bactérias, originalmente não simbióticas, para bactérias simbióticas, por transferência horizontal como foi evidenciado por Li e colaboradores (2008) dentro do gênero de *Bacillus* spp. pelo gene *nifH*.

Outros organismos endofíticos apresentam características distintas em seu *replicon* daquelas encontradas em espécies de rizóbios (CROSSMAN et al., 2008; HE et al., 2011; REN et al., 2010). Fato esse que confirma a grande variabilidade da arquitetura genômica de microrganismos do solo.

A arquitetura genômica do gênero *Bacillus* é bastante variada. A espécie *B. cereus* ATCC 10987 apresenta um cromossomo de 5,2 Mb e um plasmídeo

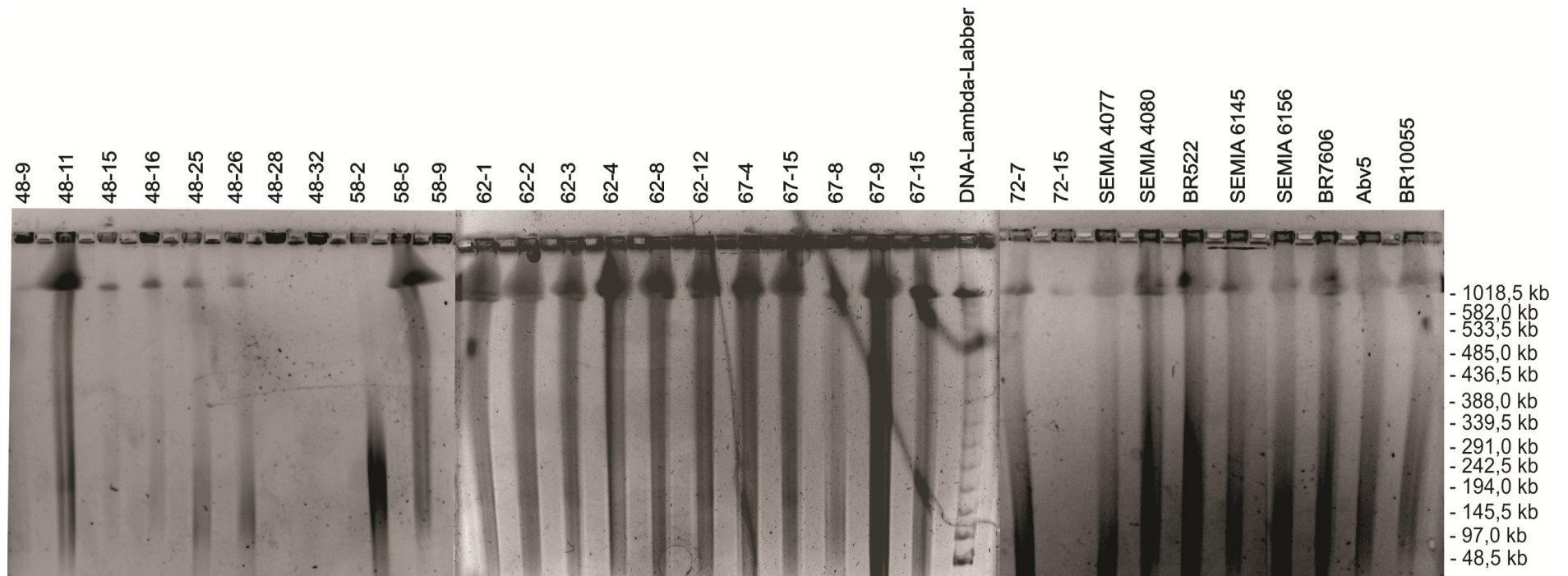
de 208 kb; já a estirpe ATCC 14579 expõe um cromossomo com tamanho de 5,4 Mb e um plasmídeo denominado de pBClin15 com peso molecular de 15 kb, demonstrando a variação a nível de *replicon* dentro de uma mesma espécie. A espécie *B. anthracis* Ames exibiu um *replicon* cromossomal de 5,2 Mb e dois plasmídias de 182 kb (pXO1) e 95 kb (pXO2) (RASKO et al., 2004). Já o *B. thuringiensis* CT-43 contém 11 replicons, sendo um cromossomo com 5,5 Mb e os 10 plasmídeos pCT6880 (6,9 kb), pCT8252 (8,3 kb), pCT8513 (8,5 kb), pCT9547 (9,5 kb), pCT14 (14,7 kb), pCT51 (51,5 kb), pCT72 (72,1kb), pCT83 (83,6kb), pCT127 (127,9 kb) e pCT281(281,2 kb) (HE et al., 2011).

De acordo com Ren e colaboradores (2010) a espécie de *Enterobacter cloacae* demonstra a presença de um cromossomo de 5,3 Mbe dois plasmídeos, pECL\_A e pECL\_B com tamanhos de 200 kb e 86 kb, respectivamente.

Pelo sequenciamento completo de estirpes de *Stenotrophomonas maltophilia* foram identificados 4,9 Mb em seu cromossomo sem presença de plasmídeos em seu material genético (CROSSMAN et al., 2008).

Contudo nenhum padrão no perfil de *replicons* foi obtido nessa etapa inicial de análise para os isolados de mucuna. A falta de plasmídeos entre os isolados de mucuna e bactérias controle levantam várias hipóteses. Entre as presunções pode-se citar a “domesticação de cepas”, onde algumas bactérias com genoma mais maleável perderam material genético pela ausência de pressão seletiva. Ou a diminuição da duplicação e expressão dos plasmídeos pela falta de estímulos, devido ao meio de cultura usado para multiplicar as colônias (PY) ser rico em nutrientes, não sendo necessário que bactéria ative vias metabólicas de duplicação dos plasmídeos simbiotes e, portanto, há uma maior dificuldade de caracteriza-los devido sua menor quantidade (SILVA; QUEIROZ; DOMINGUES, 2012).

**Figura 9** – Perfil eletroforético do DNA genômico, pela técnica de PFGE, de 24 isolados de mucuna e 10 estirpes controles em gel de agarose (1%) com marcador molecular DNA Size Standards – Lambda Labber.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Mesorhizobium mediterraneum* (estirpe BR522); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5). Marcador molecular: DNA Size Standards – Lambda Labber.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PELA PCR

### 5.2.1 Região Espaçadora Intergênica 16-23S (IRS 16-23S)-PCR

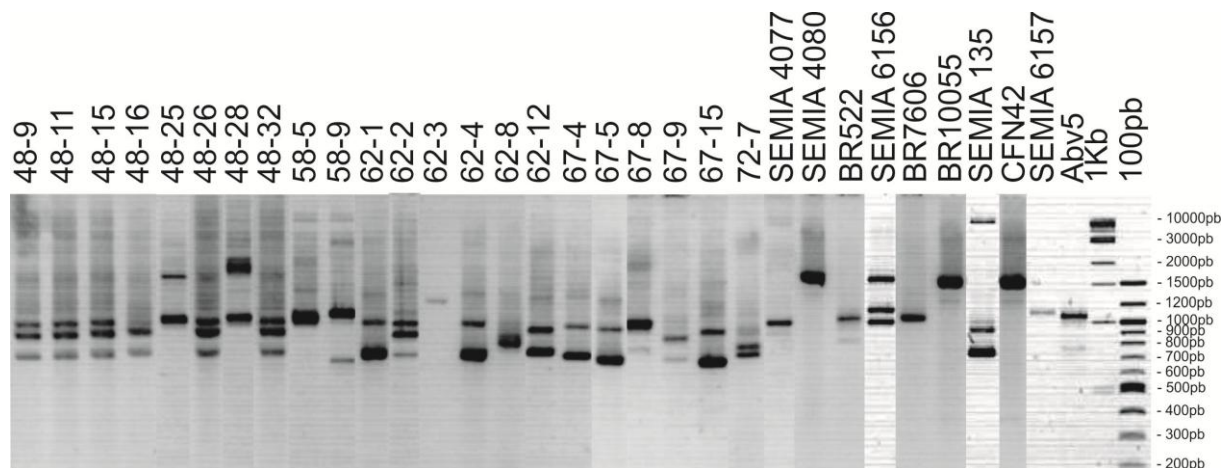
Das 35 bactérias pesquisadas, 32 (48-9, 48-11, 48-15, 48-16, 48-25, 48-26, 48-28, 48-32, 58-5, 58-9, 62-1, 62-2, 62-3, 62-4, 62-8, 62-12, 67-4, 67-5, 67-8, 67-9, 67-15, 72-7, SEMIA 4077, SEMIA 4080, BR522, SEMIA 6156, BR7606, BR10055, SEMIA 135, CFN42, IG, Abv5) apresentaram perfis eletroforéticos polimórficos da região intergênica entre os genes 16S e 23S rRNA. Entre os isolados de mucuna, 22 bactérias exibiram fragmentos com variação de 1 a 4. Enquanto as 10 cepas controle demonstraram perfis de bandeamento com 1 a 3 fragmentos (Figura 10). Os genes que codificam para os ribossomos têm sido extensivamente estudados em muitas espécies procarióticas, e o número de *operons* varia de uma (em micoplasmas) a doze cópias (em bacilos) por cromossomo (ROSADO et al., 1997). Em rizóbio, de uma a três cópias do operon tem sido detectadas: uma em *B. japonicum* e em *R. tropici*, três em *S. meliloti*, *R. galegae*, *R. leguminosarum* e *R. etli* (HAUKKA, 1997).

Os tamanhos variaram de 640 a 2855 pb para os isolados e de 750 a 8160 pb para as estirpes controles (Figura 10). Foi possível observar uma concentração de fragmentos da região IRS no intervalo entre 900 a 1500 pb em 24 bactérias (48-25, 48-26, 48-28, 48-32, 58-5, 58-9, 62-1, 62-2, 62-3, 62-4, 62-12, 67-4, 67-5, 67-8, 67-15, SEMIA 4077, BR522, SEMIA 6156, BR7606, BR10055, SEMIA 135, CFN42, IG, Abv5).

Padrão semelhante ao encontrado para os isolados de mucuna pode ser observado em trabalho desenvolvido com inoculantes comerciais do Brasil onde foram estudadas bactérias que possuem perfis com fragmentos de amplificação para esta região de tamanhos entre 700 e 1350 pb; (OLIVEIRA et al., 2012). Já no estudo realizado em isolados de *Lathyruse Oxytropis* foi encontrado

fragmentos de 1500 a 2500 pb para espécies de rizóbios do solo chinês (SUI et al., 2009). Fernandes, Fernandes e Hungria (2003) relatam que em isolados de rizóbios do guando é possível encontra 1 a 2 fragmentos para a IRS 16-23S rRNA com tamanhos entre 535 a 1630 pb. Mesmo número de fragmentos podem ser localizados em estirpes de *Bradyrhizobium* com tamanhos de 800 a 1800 pb (GERMANO et al., 2006). Tais estudos demonstram a grande diversidade de tamanhos presentes nestas regiões, sendo uma ótima ferramenta para análise filogenética dentro das espécies diazotróficas.

**Figura 10**–Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região intergênica (16S-23S rRNA) de 22 isolados de nódulos de mucuna e 10 estirpes controles em gel de agarose (1,7%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Mesorhizobium mediterraneum* (estirpe BR522); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5). Marcadores moleculares: 1kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.

A variação nos tamanhos das regiões IRS do rRNA dentro das espécies de bacterianas já vem sendo abordada por diversos trabalhos e consiste em um padrão confiável para caracterização filogenética (BARRY et al., 1991;

JENSEN; WEBSTER & STRAUS, 1993; FERNANDES; FERNANDES & HUNGRIA, 2003; NOUR et al., 1994; PAFFETTI et al., 1996).

Aparentemente um padrão de bandejamento manteve-se presente em seis (48-9, 48-11, 48-15, 48-26, 48-32 e 62-2) isolados, sendo formado por um perfil de 3 bandas que variaram entre 610 a 970 pb (Figura 10). Outros padrões de perfis repetidos podem ser encontrados nos isolados 62-1, 62-4, 67-4 e 67-5 que exibiram variações de 675 a 1285 pb para três faixas de bandas; nos isolados 67-9 e 67-15 que demonstraram duas bandas cada com tamanhos de 677 a 871 pb, aproximadamente. As bactérias controles BR10055 e CFN42 também mostraram perfis homólogos, essas possuem dois fragmentos cada, 1221 e 1510 pb (Figura 10).

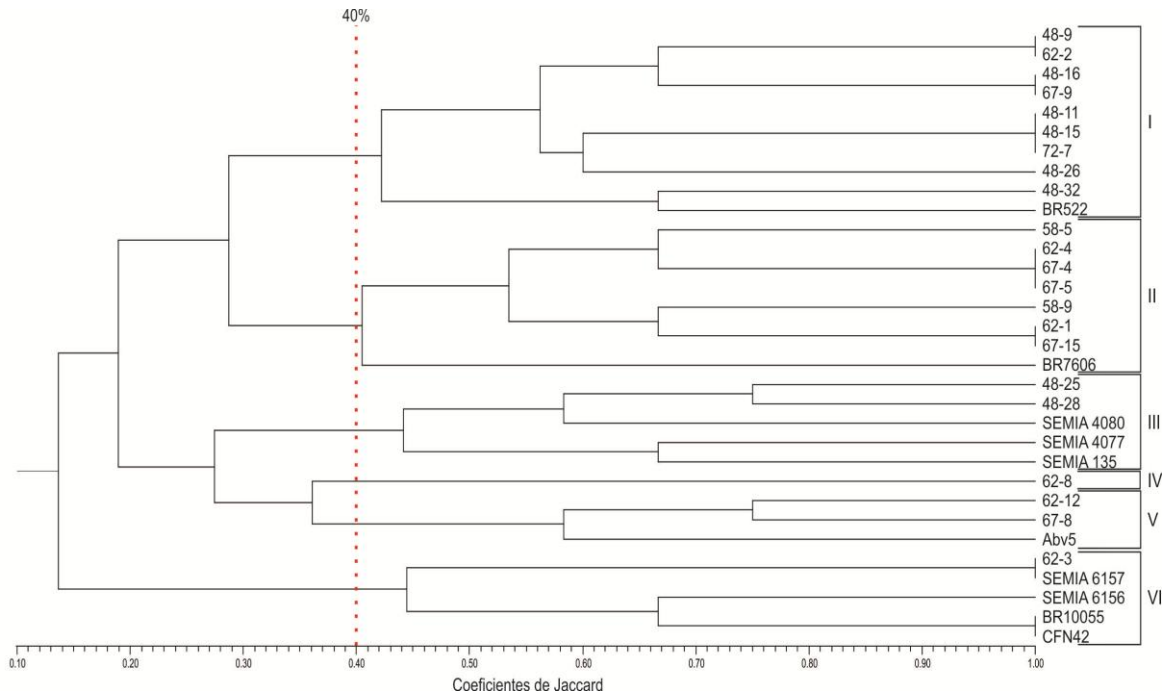
A análise de similaridade da região IRS 16-23S rRNA revelou a separação de 6 grupos (I a VI) com 40% de homologia entre seus membros (Figura 11).

É possível observar uma distribuição das bactérias controles entre os grupos, onde, com exceção do isolado 62-8 (grupo IV), todos os agrupamentos possuem uma ou mais cepas controles (Figura 11). Portanto, quase todos os isolados de mucuna do Cerrado foram capazes de se agrupar com as estirpes controle, sendo possível inferir uma proximidade taxonômica entre as bactérias avaliadas e o grupo de bactérias dos rizóbios e promotoras do crescimento vegetal.

O grupo I mostra o maior agrupamento com 10 componentes, possuindo paridade, aproximada, de 42% com a estirpe controle BR522. Esse grupo apresenta três perfis da região IRS 16-23S rRNA com 100% de similaridade entre si. O primeiro perfil é formado pelos isolado 48-9 e 62-2; o perfil número dois dado pelos isolados 48-16 e 67-9; já os isolados 48-11, 48-15 e 72-7 compõem o terceiro perfil. Esses últimos exibiram um índice de similaridade de 60% com a bactéria 48-26. Ainda no grupo I é possível observar uma

semelhança próxima a 77% do isolado de mucuna 48-32 com a cepa controle desse grupo (BR522) (Figura 11).

**Figura 11**–Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA obtidos em gel de agarose (1,7%) nas análise molecular de 22 bactérias isoladas de nódulos de mucuna e 10 bactérias controle.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Mesorhizobium mediterraneum* (estirpe BR522); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5).

O grupo II, também considerado o segundo maior grupo, sendo formado por 8 elementos. Sendo um desses a bactéria controle BR7606. O grupo II pode ser subdividido em três grupos menores. Os isolados 62-4, 67-4 e 67-5 com similaridade de 100% junto com o isolado 58-5 formam o primeiro subgrupo com semelhança de 77%; o segundo é composto pelos isolados 62-1 e 67-15 com índice de homologia equivalente a 100% e pelo isolado 58-9, que apresenta 77% de semelhança; o subgrupo número três é a bactéria controle BR7606 e

esse só se agrupam com os demais membros do grupo II com índice de similaridade de 40% (Figura 11).

O agrupamento III é constituído pelos isolados 48-25 e 48-28 com 75% de similaridade e pelas estirpes controle BR 520, SEMIA 4077 e SEMIA 135, agrupadas com 44% de semelhança com esses isolados de mucuna. Já o grupo V é formado pelos isolados 62-12 e 67-8, também, com 75% de similaridade. Os isolados do grupo V possuem um índice de homologia equivalente a 58% com a cepa controle Abv5 (Figura 11).

As bactérias 62-3, IG, SEMIA 6156, BR10055 e CFN42 compõem o grupo VI e exibem uma homologia de 44% entre si, sendo considerado o grupo com maior quantidade de cepas controle. Dentro desse grupo é possível constatar que os isolados 62-3 e IG apresentam perfis idênticos; fato evidenciado também para as cepas controles BR10055 e CFN42 (Figura 11).

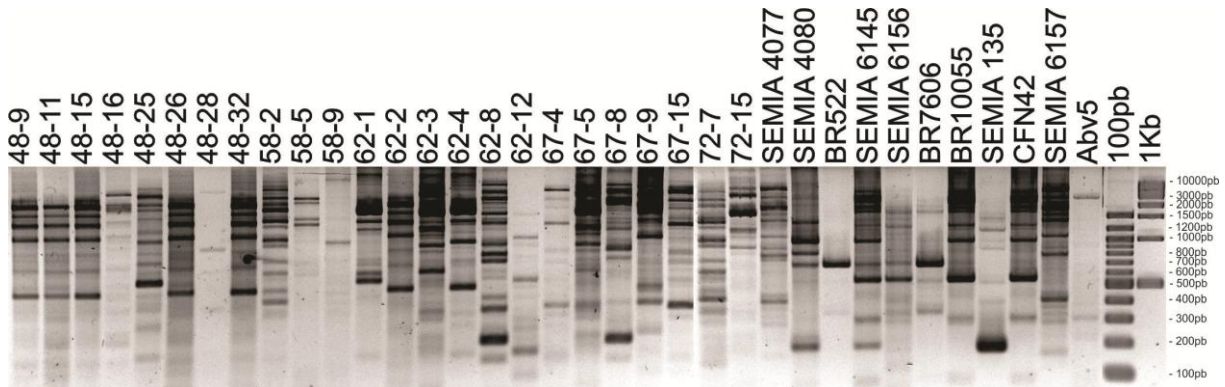
Pela avaliação do perfil eletroforético dos fragmentos amplificados da região espaçadora intergênica dos genes 16S e 23S de rRNA é possível afirmar que essa é uma região adequada para discriminar filogeneticamente a nível intraespécie as bactérias estudadas.

### **5.2.2 Regiões Palindrômicas Extragênicas Repetitivas(REP)-PCR**

A análise do produto da PCR da região REP demonstrou uma grande variabilidade no perfil de bandas. Os isolados e as bactérias controle apresentaram de 2 a 14 fragmentos separados em gel de agarose 1,7%. Entretanto, 15 isolados (63%) possuem de 4 a 10 fragmentos (Figura 12). Quantidades semelhantes de fragmentos foram abordadas no estudo de Ogutcu e colaboradores (2009), onde estirpes de *Rhizobium* apresentaram de 4 a 9 fragmentos. Em trabalho realizado com isolados de feijão-fava foi encontrado

perfis de até 16 fragmentos para rizóbios (ANTUNES, 2010), enquanto nos de feijoeiro-comum foram observados até 10 fragmentos (CARDOSO, 2014).

**Figura 12**–Perfil eletroforético da amplificação em PCR das regiões palindrômicas extragênicas repetitivas (REP) de 24 isolados de nódulos de mucuna e 11 estirpes controles em gel de agarose (1,7%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Mesorhizobium mediterraneum* (estirpe BR522); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145 e SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5). Marcadores moleculares: 1kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.

Em ambos os estudos, devido à quantidade de fragmentos gerados, a região REP foi considerada como marcador sensível e confiável para identificação e caracterização de subespécies de rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Tais resultados ratificam dados de trabalhos anteriores para determinação filogenética de subespécies pelo perfil de fragmentos gerados pela técnica REP-PCR (RADEMAKER; BRUIJN, 1997; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007).

O uso da técnica de REP-PCR é vantajoso porque, em uma única reação, obtém-se um número elevado de bandas, permitindo a detecção de polimorfismo suficientemente elevado para a análise genética das bactérias (CHUEIRE et al., 2000).

Quanto ao peso molecular das bandas, essas foram agrupadas em uma faixa de 100 a 7500 pb. Contudo, como recomendado por Hungria e colaboradores (2008) os fragmentos foram reagrupados no intervalo próximo a 300 e 7500 pb (Figura 12). Trabalhos com cepas de *Rhizobium galegae* com fragmentos de 500 a 6500 pb (RADEVA et al., 2001) e de *Rhizobium spp* com fragmentos de 300 a 4500 pb (OGUTCU et al., 2009) demonstram a grande diversidade dos pesos moleculares que as regiões palindrômicas extragênicas repetitivas possuem no grupo dos rizóbios.

A maior concentração de bandas obtidas nesse estudo está no intervalo de 600 a 700 e 1000 a 1200 pb, onde 19 e 21 bactérias, respectivamente, apresentaram bandas nessa região. Enquanto a menor afluência está na faixa de 1700 a 1800 pb para 5 isolados (48-16, 62-1, 62-3, 62-8 e 67-5) e 3 bactérias controles (SEMIA 6145, BR7606 e IG) (Figura 12).

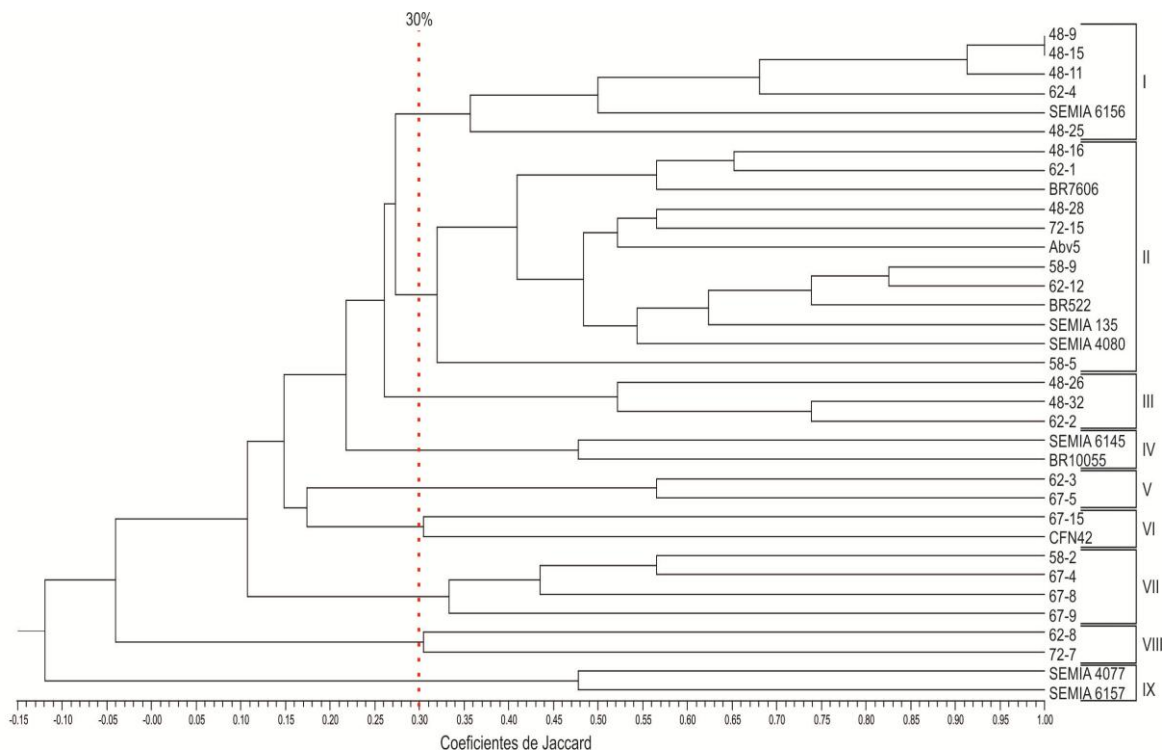
Seis perfis foram visualmente semelhantes entre si (48-9, 48-11, 48-15, 48-26, 48-32 e 62-2), com presença de 7 a 8 fragmentos de tamanhos entre 450 a 2400 pb. Pouca paridade visual foi encontrada entre os perfis dos isolados de mucuna e das bactérias controle (Figura 12).

A análise de similaridade das regiões palindrômicas extragênicas repetitivas apresentou uma elevada multiplicidade de agrupamentos, com escala de similaridade variando de -12 a 100%. Houve formação de nove grupos (I a IX) com similaridade aproximada de 30% (Figura 13). Deste modo a região REP pode ser considerada como um alto critério discriminatório entre os isolados avaliados. Mesmo resultado pode ser encontrado por Grange (2001) que constatou um grau elevado de polimorfismo entre isolados de rizóbio de feijão na região do Cerrado, com a presença de perfis distintos, formando uma grande quantidade de grupos com baixa similaridade.

Os grupos I, II, IV, VI e IX apresentaram pelo menos uma bactéria controle como uma de seus membros. Portanto, os isolados que estiverem

agrupados próximos a tais grupos possuem grande probabilidade de apresentarem taxonomia próxima ao grupo dos rizóbios (Figura 13).

**Figura 13** –Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos das regiões palindrômicas extragênicas repetitivas (REP) obtidos em gel de agarose (1,7%) nas análise molecular de 24 bactérias isoladas de nódulos de mucuna e 11 bactérias controle.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Mesorhizobium mediterraneum* (estirpe BR522); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145 e SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5).

O grupo I corresponde aos isolados com maior similaridade entre si. Esse é formado pelos isolados 48-9 e 48-15, onde seus perfis da região REP foram considerados análogos, com 100% de similaridade, e pelo isolado 48-11 agrupado com paridade de 91%; já o isolado 62-4 teve similaridade de 68% com os demais membros do grupo. A bactéria controle SEMIA 6156 também foi

enquadrada no grupo, com 50% de paridade, reforçando a hipótese de que os isolados desse grupo tenha alta similaridade com a classe dos rizóbios. Com 36% de similaridade o isolado 48-25 foi incorporado ao grupo (Figura 13).

O grupo II foi o mais representativo entre o número amostral, com 12 membros representados por sete dos 24 dos isolados e 5 das 12 das bactérias controle. Esse grupo pode ser dividido em três subgrupos com similaridade próxima a 48%. O primeiro subgrupo é formado pela bactéria controle BR7606 com semelhança de 56% entre os isolado 48-16 e 62-1. O segundo subgrupo é composto por oito membros; desses, alguns membros (48-28 e 72-15) possuem paridade de 52% com a controle Abv5, enquanto os demais (58-9 e 62-12) possuem diferentes homologies com os controle BR522 (74%), SEMIA 135 (62%) e SEMIA 4080 (54%). O subgrupo número três, composto de apenas um isolado, 58-5, mostrou maior grau de diferenciação dos demais membros do grupo II, com 31% (Figura 13).

A associação formada pelos grupos III, VII e VIII é composta somente por isolados de mucuna que possuem menor homologia com bactérias controle, respectivamente, em relação aos seus perfis da região REP (Figura 13).

O grupo IV é formado apenas por estirpes controle (SEMIA 6145 e BR10055), com 37% de similaridade. Já o grupo VI, também composto por dois membros, exibe um isolado de mucuna, 67-15, agrupado com a controle CFN42, com homologia aproximada de 30%. Enquanto o grupo IX demonstra uma diversidade maior em seu perfil, e apresenta uma relação de baixa similaridade com as demais bactérias estudadas. No entanto uma semelhança de 48% entre as bactérias do grupo IX (SEMIA 4077 e IG) pode ser inferida (Figura 13).

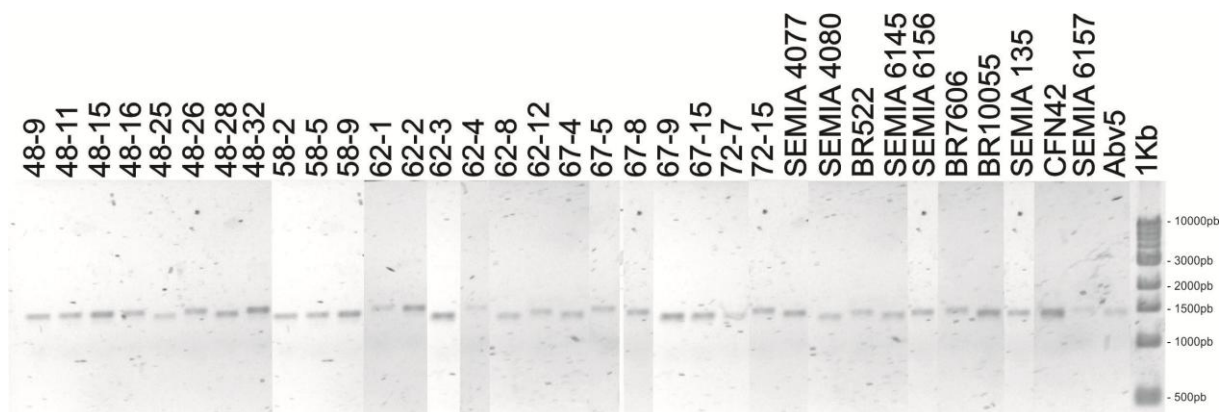
Os resultados desse estudo demonstram que a análise de REP-PCR foi eficiente para discriminar os isolados de nódulos de mucuna, embora nem sempre sejam adequadas nas avaliações filogenéticas, devido ao elevado grau de

bandeamento em gel de agarose (CHUEIRE et al., 2000; FERNANDES et al., 2003; CARDOSO, 2014).

### 5.2.3 Regiões Conservadas – Genes 16S rRNA e *Housekeeping* (*atpD* e *glnIII*)

A região que codifica o gene 16S rRNA, consiste em uma região conservada entre as bactérias, mas, ao mesmo tempo, possui variabilidade e quantidade de informações suficientes para revelar as relações filogenéticas entre as espécies (Woese, 1987; Weisburg et al., 1991; Willems; Collins, 1993).

**Figura 14** – Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região 16S rRNA de 24 isolados de nódulos de mucuna e 11 estirpes controles em gel de agarose (1,0%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder.



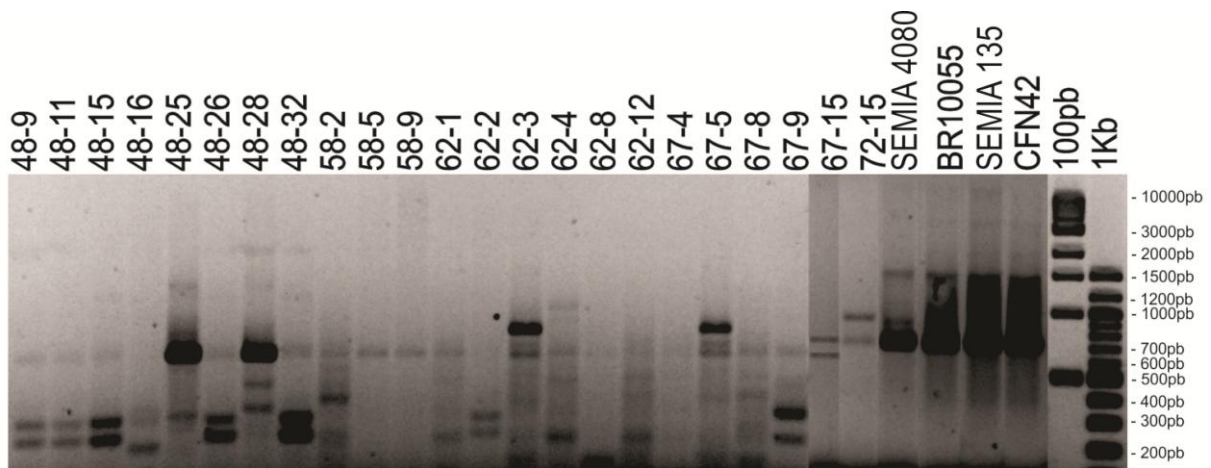
Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Mesorhizobium mediterraneum* (estirpe BR522); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145 e SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5). Marcador molecular: 1kb-DNA-Ladder.

As amplificações do gene 16S rRNA dos isolados analisados apresentaram um único fragmento com variação entre 1400 a 1500 pb em seu peso molecular (Figura 14). Fato esse que corrobora com os resultados encontrados em trabalhos com grupos de rizóbios (CHUEIRE et al., 2003), *Pseudomonas*,

*Enterobacter* (MAGNANI, 2005) e *Bacillus* (WISOTZJSEY et al., 1992), demonstrando a universalidade e conservação do gene entre os procariotos (TOLEDO, 2008).

Já a análise das ampliações do gene codificador da glutamina sintetase II, *glnII*, apresentou um padrão variado em seu perfil de bandas (Figura 15). Dos isolados testados apenas o isolado 72-7 não foi capaz de ser amplificado pelo oligonucleotídeo testado, apresentando, portanto pode apresentar uma maior variação em sua sequência em relação aos demais. Foram observadas ampliações para quatro bactérias de referência (SEMIA 4080, BR10055, SEMIA 135 e CFN42) (Figura 15). Essas demonstraram prevalência em dois fragmentos com tamanhos distintos, 750 a 1480 pb.

**Figura 15**– Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região *glnII* de 23 isolados de nódulos de mucuna e 4 estirpes controles em gel de agarose (1,3%) com marcador molecular 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpe SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135).

Marcadores moleculares: 1kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.

Foi possível observar uma variação de 1 a 5 fragmentos, sendo que 11 isolados apresentaram três fragmentos com tamanhos variando entre 200 a 1500 pb (Figura 15). O fragmento esperado de 650 a 700 pb foi identificado para 19

isolados. Tamanhos esses semelhantes aos encontrados em estirpes de *Bradyrhizobium* por Menna, Barcellos e Hungria (2009) com 602 pb para região *glnII*. Contudo um fragmento com peso molecular médio de 1395 pb pode ser observado para quatro isolados (38-25, 48-28, 48-32 e 62-4) e as quatro bactérias controle, sendo possível que essas bactérias apresentem duas cópias do gene *glnII* que se encontro em uma distancia inferior a 100 pb, e portanto, foram amplificadas em uma única sequencia. Outros fragmentos representativos com tamanhos médios entre 360 e 225 pb são observados em 12 isolados (48-9, 48-11, 48-15, 48-16, 48-25, 48-26, 48-28, 48-32, 62-1, 62-2, 62-4, 67-9) (Figura 15).

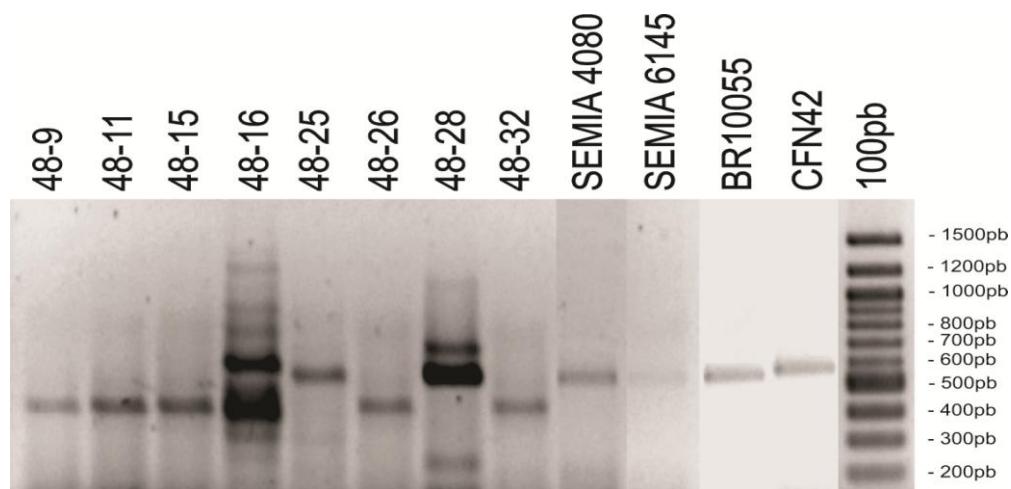
Apesar de não muito discutidos na literatura os perfis de polimorfismo gerados pelo gene *glnII* neste trabalho, podem ser apresentados em 3 padrões. O primeiro grupo, formado por três fragmentos, abrange os isolados 48-9, 48-11, 48-15, 48-26, 62-1 e 67-9; já os isolados 48-28 e 48-32 são enquadrados no segundo grupo com cinco fragmentos; o terceiro padrão está presente no isolado 62-3 e três bactérias controle (BR10055, SEMIA 135 e CFN42) com presença de duas bandas; os demais isolados apresentaram padrões mais variados e com pouca semelhança entre si (Figura 15).

Em bactérias fixadoras de nitrogênio a glutamina sintetase II (GSII) é, preferencialmente, expressa em condições de nitrogênio limitado e constitui uma importante porta de entrada do nitrogênio para sua fixação, pois converte amônio e glutamato em glutamina, aminoácido não essencial fonte de nitrogênio orgânico (FISHER, 1992). Em 1995, Merrick e Edwards discutiram a presença da GSII em cinco gêneros de espécies fixadoras (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Frankia*) e eucariotos. Desde então pouco estudos são realizados com diferentes grupos procarióticos para o gene *glnII*, pois outro tipo de glutamina sintetase é mais bem distribuído nas outras espécies (*glnA*).

A região *atpD* foi amplificada em oito isolados (48-9, 48-11, 48-15, 48-16, 48-25, 48-26, 48-28 e 48-32) e quatro estirpes controle (SEMIA 4080, SEMIA 6145, BR10055 e CFN42) (Figura 16). Os fragmentos da região *atpD* variaram com tamanhos entre 400 a 580 pb. Fragmentos de 574 a 700 pb foram encontrados em estirpes de *Bradyrhizobium* por Menna, Barcellos e Hungria (2009) e com tamanho de 500 pb para *Rhizobium* por Hou e colaboradores (2009).

Padrões de polimorfismo foram evidenciadas em dois isolados, 48-16 e 48-28, com presença de 9 (300 a 1400 pb) e 6 (150 a 1120 pb) bandas, respectivamente (Figura 16).

**Figura 16** – Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região *atpD* de 8 isolados de nódulos de mucuna e 4 estirpes controles em gel de agarose (1,3%) com marcador molecular 100pb-DNA-Ladder.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145). Marcador molecular: 100pb-DNA-Ladder.

De acordo com os critérios adotados por Zeigler (2003) e Thompson e colaboradores (2005) para análise de sequências multilocus, as sequências adotadas neste trabalho, *glnII* e *atpD*, não são adequadas para esse teste, pois não foram consideradas universais para o grupo de isolados estudados e

apresentaram polimorfismo em suas cópias, sendo possível encontrar regiões gênicas de tamanhos distintos. Contudo os genes *housekeeping* aqui abordados poderão ser empregados em estudos de homologia com genes de espécies padrões, a fim de definir relações evolutivas entre as cópias dos genes obtidas dos isolados de mucunas e de espécies fixadoras bem caracterizadas, contribuindo para estudos evolutivos de genes conservados em bactérias endofíticas.

#### **5.2.4 Regiões Rizobiais – Gene *nifH* (*nifHr* e *nifHi*) e *nodC***

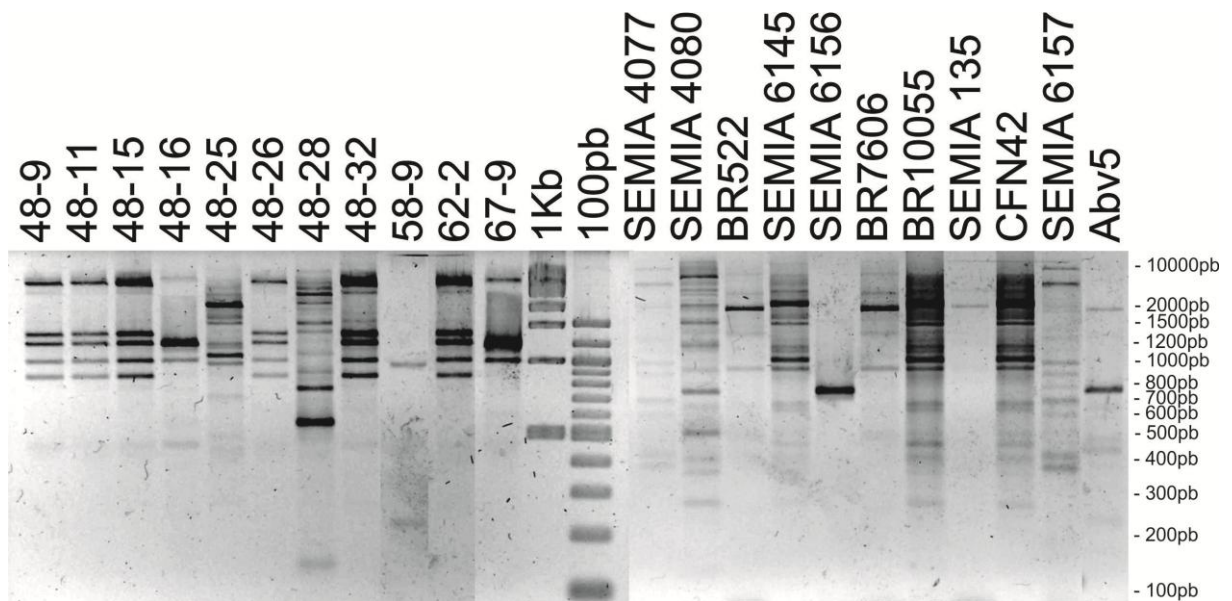
A extração de DNA e amplificação de genes marcadores, como o *nifH*, é uma ferramenta que tem sido amplamente utilizada para a detecção da biodiversidade de bactérias diazotróficas. Esse fato somado ao evento da contribuição do gene *nifH* na capacidade de FBN (LAGUERRE et al., 2001) colabora com a busca deste gene em bactérias do solo, pois fornecem informações sobre quais tipos de organismo podem estar envolvidos na FBN, confirmando a presença dos genes em microrganismo já esperados ou identificando novos organismos que podem ser pequenos colaboradores da FBN.

A análise pela PCR da sequência *nifHr* comprovou que dentro dos 24 isolados estudados 11 (48-9, 48-11, 48-15, 48-16, 48-25, 48-26, 48-28, 48-32, 58-9, 62-2 e 67-9), 46%, apresentaram regiões amplificadas pelo oligonucleotídeo usado por Laguerre e colaboradores (2001) (Figura 17). Desses, apenas 6 (48-9, 48-11, 48-15, 48-26, 48-28 e 62-2) exibiram fragmentos próximos a 890 pb como os observados por Grange (2005) em estudos realizados com estirpes brasileiras de *R. etli*.

Entre as bactérias controle somente três (BR522, BR7606, SEMIA 135) não apresentaram fragmentos próximos a 780 e 890 pb. Portanto, seis dos 24 isolados e oito das 11 bactérias controle demonstraram fragmentos compatíveis com a região *nifH* estabelecida por Laguerre e colaboradores (2001). Contudo um número maior, 11 de 24 isolados e 11 de 11 bactérias controle (Figura 17),

apresentaram um perfil de bandeamento pelos oligonucleotídeos, específicos para o grupo dos rizóbios, usados na análise, demonstrando alguma paridade com as regiões padrões e usuais da região codificadora da nitrogenase.

**Figura 17** –Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região *nifH* para rizóbios de 11 isolados de nódulos de mucuna e 11 estirpes controles em gel de agarose (1,7%) com marcadores moleculares 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Mesorhizobium mediterraneum* (estirpe BR522); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145 e SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5). Marcadores moleculares: 1kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.

Segundo Vieira (2007), os genes relacionados à fixação de nitrogênio em algumas espécies de rizóbio, tal como os do gênero *Rhizobium* se localizam no plasmídeo, podendo haver perda desse plasmídeo por algumas estirpes. Tal perda pode ser resultado da exposição a altas temperaturas, instabilidade plasmidial das cepas ou até mesmo pelo rompimento mecânico gerado no momento da extração de DNA. A perda dos genes pela bactéria acarreta na falta de sua habilidade para fixar nitrogênio. Deste modo, algumas cepas pode

apresentar falsos resultados negativos não sendo possível amplificar a região *nifH*.

Além dos rizóbios, outros grupos de bactérias diazotróficas apresentam genes para expressão de nitrogenase, como é o exemplo de algumas espécies dos gêneros *Actinobacteria*, *Bacillus*, *Clostridium* (RÖSCH; MERGEL; BOTHE, 2002), *Burkholderia* (BALDANI et al., 1997, REIS JUNIOR et al., 2004), *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Azohydromonas*, *Azomonas*, *Azonexus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Dechloromonas*, *Delftia*, *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Klebsiella*, *Methylosinus*, *Pelomonas*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Xanthobacter* (ROESCH et al., 2007), *Gluconacetobacter* e *Enterobacter* (VIDEIRA, 2012).

O perfil de separação variou de 1 a 7 fragmentos para os isolados do Cerrado, com predominância de cinco fragmentos para cinco bactérias (48-9, 48-11, 48-15, 48-26, 48-28, 48-32, e 62-2), e de 1 a 14 fragmentos para as bactérias controle (Figura 17). O polimorfismo gerado pelos oligonucleotídeos construídos por Laguerre e colaboradores (2001), sendo esses com maior especificidade dentro do grupo dos rizóbios, não é muito estudado, mas pode ser observado também no trabalho de SANTOS (2010), onde é possível discernir pelo menos cinco bandas para a região *nifH*.

Os tamanhos dos fragmentos entre os isolados de mucuna foram 550 pb (48-28) a 5760 pb (48-16), enquanto para as controles foram de 290 pb (BR522) a 6800 pb (SEMIA 4077). O maior agrupamento de bandas para os isolados foi na faixa de 900 a 1000 pb com 10 representantes (exceto para 48-28), seguido da faixa de 1150 a 1300 pb com 9 representantes (exceto para 48-28 e 58-9). Já no grupo das bactérias controle a faixa de 700 a 1000 pb foi representada por 10 bactérias. No total amostral, somente quatro perfis (48-28, BR203, SEMIA 135 e Abv5) não apresentam bandas de 900 a 1000 pb (Figura 17).

Pela análise visual foi possível constatar a presença de cinco perfis distintos, observados em mais de uma bactéria (Figura 17). O primeiro perfil exibe a presença de cinco bandas, com tamanhos de 840 a 4830 pb, para cinco isolados (48-9, 48-11, 48-15, 48-26 e 62-2). O segundo perfil apresentou três bandas, com tamanhos de 980 a 5760 pb, para dois isolados (48-16 e 67-9). O perfil número três foi encontrado nas bactérias controle BR522 e BR7606, onde foi possível observar 4 bandas variando de 940 a 2740 pb. O quarto perfil mostrou um bandejamento de 12 fragmentos de peso moleculares entre 430 a 2950 pb para as bactérias controle BR10055 e CFN42. Já o perfil cinco constatou uma variação de 400 pb a 6800 pb com presença de 8 bandas para as bactérias SEMIA 4077 e IG (Figura 17).

Um segundo par de oligonucleotídeos foi testado para a região *nifH*. O par de oligonucleotídeos foi criado por Rösch, Mergel e Bothe (2002) sendo que a sequência apresenta substituição de nucleotídeos para proporcionar máximo Anelamento (oligonucleotídeo degenerado), ou seja, com capacidade de anelar-se com regiões *nifH* menos conservadas com menor homologia, sendo possível rastrear tais genes em espécies endofíticas fora do grupo dos rizóbios.

Em seu trabalho Rösch, Mergel e Bothe (2002) amplificaram regiões de 400 pb em diversas espécies do filo Proteobacteria e Firmicutes, dentre elas algumas eram representantes dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhodospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Frankia*, *Rhodococcus*, *Clostridium* e *Paenibacillus*. Uma região de mesmo tamanho também foi rastreada pelos oligonucleotídeos inespecíficos do gene *nifH* da estirpe do gênero *Bacillus* (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014).

Apesar do caráter degenerado do segundo par de oligonucleotídeos somente cepas controle (BR10055, CFN24 e Abv5) apresentaram fragmentos de 400 pb para essa amplificação (Figura 17). Tal fato demonstra uma maior

afinidade da região *nifH* encontrada nos isolados com a respectiva região encontrada no grupo dos rizóbios, devido a maior afinidade do oligonucleotídeo específico em relação ao do degenerado.

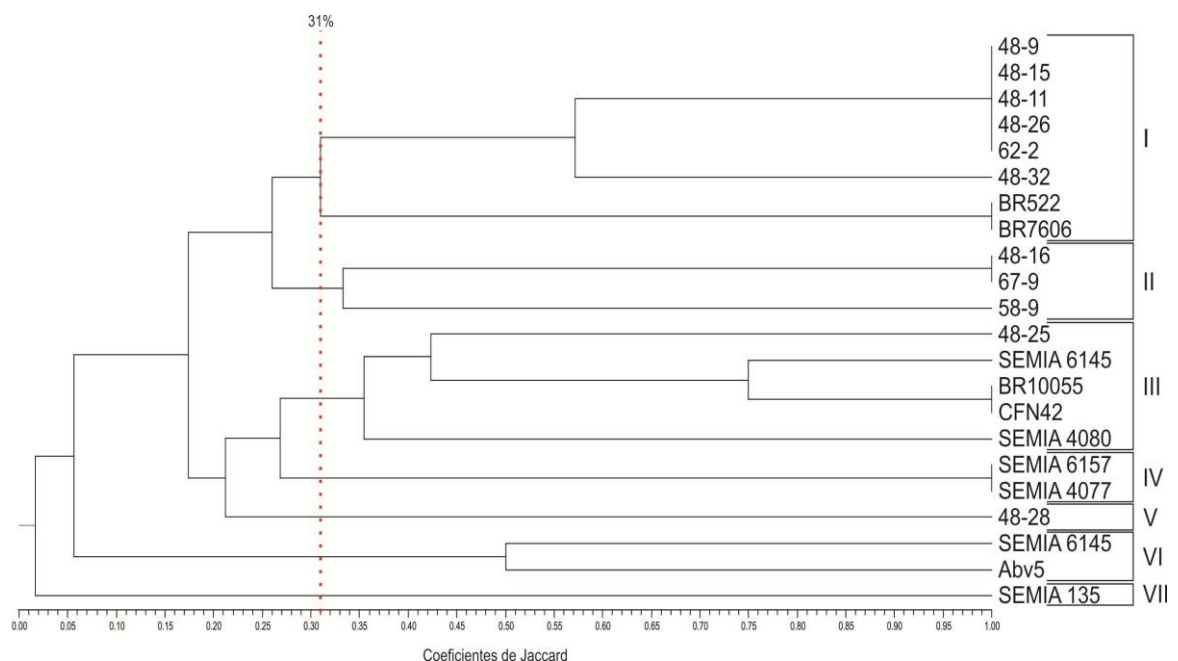
Pela construção do dendrograma de similaridade do perfil polimórfico da região *nifHr* é possível inferir a formação de 7 grupo com similaridade próxima a 31% (Figura 18). Onde o grupo I foi apresentado como o de maior semelhança entre seus membros e com maior número amostral. Esse possui oito membros, onde cinco deles (48-9, 48-11, 48-15, 48-26 e 62-2) apresentam homologia de 100% em seus perfis. Enquanto o isolado 48-32 demonstra 57% de paridade com tais perfis. Esses isolados de mucuna do Cerrado demonstram uma semelhança com as bactérias controle BR522 e BR7606 (*Rhizobium*) de 31% (Figura 18).

As bactérias controle foram distribuídas nos grupo I, III, IV, VI e VII. Sendo que os grupos IV, VI e VII foram formados somente por cepas controles (Figura 18). Onde as bactérias *Rhizobium* SEMIA 4077 e IG, grupo IV, exibiram uma homologia de 100% entre seus perfis REP. Já entre os membros do grupo VI, SEMIA 6156 e Abv5, a similaridade foi de 50%. O grupo VII representado pelo controle SEMIA 135 foi considerado com perfil mais díspar dos demais, sendo possível observar um agrupamento de 2% de paridade com os mesmo (Figura 18).

Dentre os isolados de mucuna testados, o isolado 48-25 foi o que mostrou maior similaridade com as estirpes controle SEMIA 6145, BR10055 e CFN42 (*Rhizobium*) próxima a 42%, e com a SEMIA 4080 próximo a 35%; inferindo um agrupamento com 4 das 11 bactérias controle testadas. Logo tal isolado (48-25) com o perfil de bandeamento mais próximo a essas cepas controle foram consideradas mais próximo evolutivamente, quanto ao gene *nifH*, assim como os demais isolados do grupo I. Portanto, esses isolados podem ser considerados taxonomicamente mais próximo ao grupo de bactérias rizóbio; seguidos dos

grupos II (26% de similaridade) e do isolado 48-28 (grupo V) com semelhança de 21%. A maioria dos membros analisados foram agrupados com 17% de homologia (exceção: SEMIA 6156, SEMIA 135 e Abv5), demonstrando alguma relação filogenética entre elas (Figura 18).

**Figura 18**–Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos da região *nifH* de rizóbios obtidos em gel de agarose (1,7%) nas análises moleculares de 11 bactérias isoladas de nódulos de mucuna e 11 bactérias controle.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Mesorhizobium mediterraneum* (estirpe BR522); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145 e SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5).

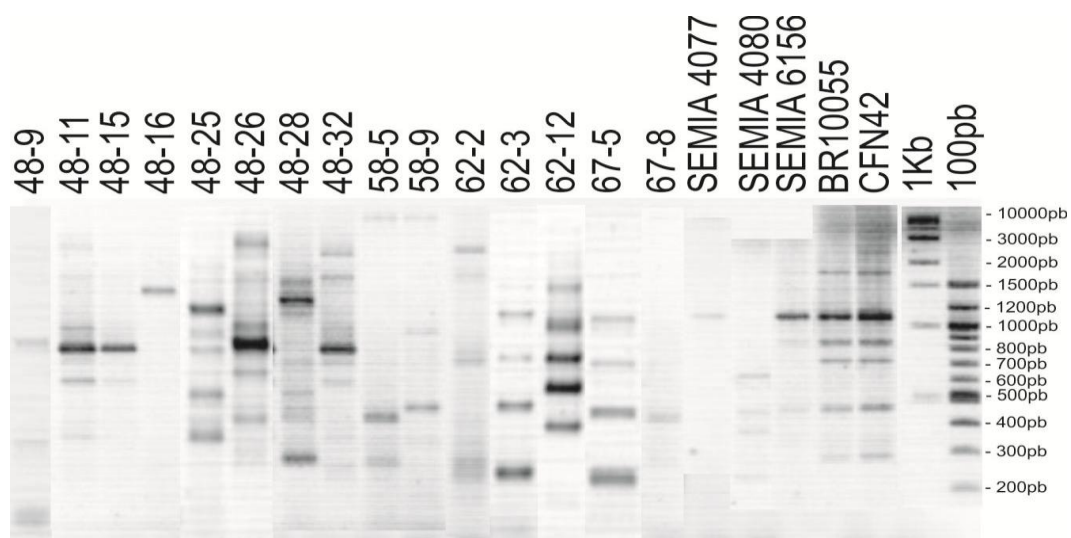
A reação de amplificação por PCR da região *nodC* não foi capaz de amplificar nenhuma região dos isolados testados. Portanto os isolados avaliados não são capazes de infectar e formar nódulos em hospedeiros vegetais. No entanto, tal evento não significa que essas bactérias não possam estar presentes no interior dos nódulos. Bactérias endofíticas não simbióticas já foram isoladas

de nódulos de feijoeiro (OLIVEIRA-FRANCESQUINI, 2014). Dentre os isolados de *Phaseolus vulgaris* L., feijoeiro, foram encontradas espécies de *Bacillus* sp., *Brevundimonas* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. e *Xanthomonas* sp.; o que para Hallamann e colaboradores (1997) são consideradas como bactérias oportunistas capaz de infectar nódulos formados por simbiontes rizobianos.

### 5.2.5 Região para Melanina – *Genemela*

Os fragmentos encontrados pela amplificação do gene *melA* exibiram um perfil de polimorfismo variado. Os tamanhos variaram entre 280 a 3000 pb. O número de cópias foi de 1 a 7 fragmentos. Sendo os fragmentos com tamanho entre 400 a 700 pb foram os de maior prevalência em 22 isolados e oito bactérias controle (Figura 19).

**Figura 19** – Perfil eletroforético da amplificação em PCR da região *melA* de 15 isolados de nódulos de mucuna e 5 estirpes controles em gel de agarose (1,7%) com marcadores moleculares 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156). Marcadores moleculares: 1kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.

Contudo o oligonucleotídeo aqui estudado tornou-se um bom marcador molecular, devido a sua capacidade de gerar polimorfismo entre os isolados. As múltiplas cópias servem como parâmetro discriminatório para construção de dendrogramas de similaridade, a fim de definir correlação filogenética.

O fragmento que representa a região codificadora de tirosinase, de tamanho próximo a 1853pb, foi observado nos isolados 48-32 e 62-2 (1662 pb e 1783 pb, respectivamente), podendo haver ter relação dessa região com o gene de melanina (enzima tirosinase) de rizóbios encontrado por Cabrera-Valladares e colaboradores (2006). As estirpes controle BR10055 e CFN42 também demonstraram amplificados para sequencias gênicas de melanina com 1800 pb (Figura 19).

Regiões que codificam genes relacionados à síntese de melanina já foram identificadas em diversas espécies de bactérias: *Pseudomonas maltophilia*, *Rhizobium meliloti*, *R. etli*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *Shewanella colwelliana*, *Marinomonas mediterranea* MMB-1 e *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstak* além de várias espécies do gênero *Vibrio* (CABRERA-VALLADARES et al., 2006; COYNE; AL-HARTHI, 1992; WANG et al., 2000).

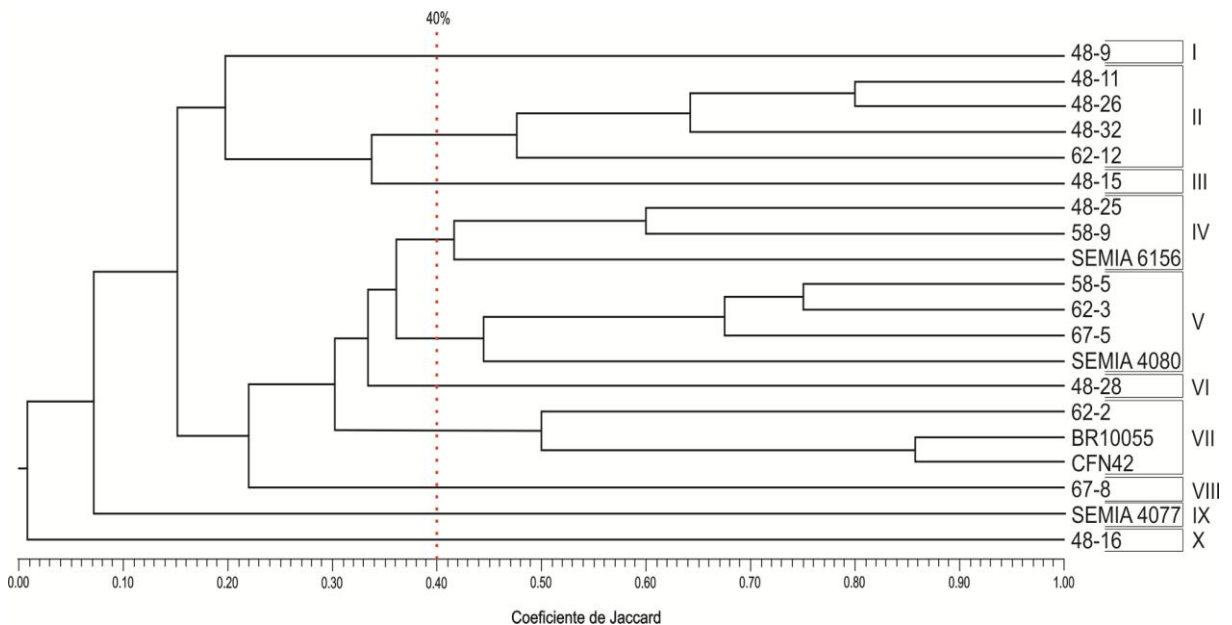
Mercado-Blanco e colaboradores (1993) descreve que os genes necessários para a produção de melanina (*mel*) estão geralmente presentes em plasmídeos, tanto simbióticos quanto não simbióticos. No entanto, apesar da localização genética de alguns genes de *mel* em plasmídeos simbióticos, a produção de melanina não é necessária para fixação de nitrogênio (LAMB; HOMBRECHER; JOHNSTON, 1988). Contudo a presença dos genes *mel* em plasmídeos favorecem a translocação horizontal dos mesmos e conseqüentemente o aumentando as chances de rastrear tais genes em outras espécies endofíticas.

Com análise de similaridade gerada pelo polimorfismo dos fragmentos da região *melA* foi possível determinar uma semelhança de 40% entre os 10 grupos de isolados formados. A baixa similaridade confere a região um alto valor discriminatório para análises filogenéticas (Figura 20).

Os grupos mais numerosos foram o grupo II e V, com quatro membros cada. Os isolados 48-11 e 48-26 além das bactérias controle BR10055 e CFN42 apresentaram perfis muito semelhantes e, portanto, foram agrupados com similaridade de 80% ou superior (Figura 20).

As bactérias controle obtiveram maior similaridade com os isolados 48-25 e 58-9, pela estirpe SEMIA 6156 com semelhança de 42% em seus perfis; com a estirpe controle SEMIA 4080 e os isolados 58-5, 62-3 e 67-5 que apresentaram 44% de analogia; e com semelhança de 50% para os perfis de 62-2, BR10055 e CFN42. Inferindo alguma relação filogenética entre essas bactérias (Figura 20).

**Figura 20** – Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos da região *melA* obtidos em gel de agarose (1,7%) nas análises moleculares de 15 bactérias isoladas de nódulos de mucuna e 5 bactérias controle.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp.

O isolado 48-16 e a estirpe controle SEMIA 4077 mostraram baixa correlação do gene *mela* com as demais bactérias, proporcionando um maior distanciamento evolutivo entre os genes (Figura 20).

Pouco se sabe sobre a função da melanina em rizóbios e outras bactérias endofíticas. Autores sugerem que talvez a melanina esteja envolvida com a polimerização de moléculas fenólicas que surjam por ocasião da senescência de nódulos, destoxificando-os (HYNES; PRIEFER, 1988; FRIZZO, 2007). Estudos recentes indicam que a produção de melanina evoluiu paralelamente em grupos diferentes de organismos para a proteção a estresses ambientais (PLONKA; GRABACKA, 2006).

Observando os oligonucleotídeos conservados analisados (*nifHr*, *glnII*, *atpD* e *mela*) é possível verificar um alto número de cópias com tamanhos diferentes, que podem significar variações gênicas na região original dos genes, como consequências de processos evolutivos de inserção ou deleção de bases nitrogenadas; ou até mesmo processos de translocação horizontal parcial, ou total, de operons, onde têm sido relatada em muitos gêneros de bactérias, incluindo os rizóbios (AZEVEDO, 1998; SHAMSELDIN et al., 2008).

Tais processos também podem ter ocorrido nas regiões intergênicas devido a uma série de alterações no genoma bacteriano ao decorrer da evolução e a menor pressão de seleção desta região em relação aos genes conservados (AZEVEDO, 1998). Para Jensen, Webster e Straus (1993) a variabilidade da região IRS 16-23S rRNA também pode ser parcialmente explicada pela inserção de vários genes tRNA (sequências conservadas com papel funcional) em regiões IRS, aumentando o comprimento dos fragmentos e a variação no tamanho destas sequências.

Outra hipótese está ligada a ampliações incompletas do gene, onde os oligonucleotídeos foram capazes de anelar-se com regiões no interior do gene, já que esses oligonucleotídeos possuem grande especificidade para o grupo dos rizóbios e tais genes conservados (*nifH*, *glnII*, *atpD* e *mela*) podem diferir em outras espécies. Uma abordagem para elucidar esta questão é o sequenciamento das regiões amplificadas e análise da homologia com sequências já conhecidas de regiões dos genes *nifH*, *glnII*, *atpD* e *mela*.

### **5.2.6 ARDRA – Gene 16S rRNA**

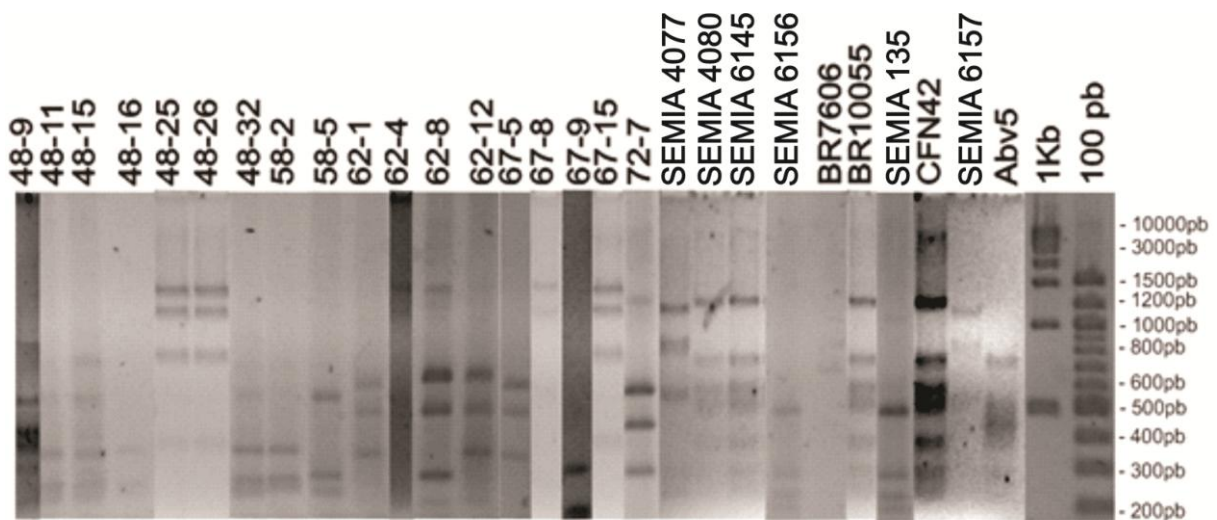
O polimorfismo gerado pela “digestão” da região 16S rRNA exibiu um padrão diverso para os isolados, com presença de duas a 6 bandas e tamanhos entre 100 e 1300 pb. Sendo a maior concentração na faixa de 100 a 300 pb com 16 isolados e 8 estirpes controle apresentando pelo menos um fragmento nessa região de separação (Figura 21). Padrão semelhante foi encontrado para bactérias endofíticas associadas ao milho (ROESCH et al., 2007) e representam um formato de comparação confiável para divisão de filos entre bactérias (REIS-JUNIOR et al., 2002).

Os perfis de similaridade da “digestão” do gene 16S rRNA gerou um agrupamento de oito grupos (I a VIII) com homologia de 40% em seus perfis (Figura 22). O grupo mais numeroso obteve oito isolados (58-2, 62-1, 62-4, 62-8, 62-12, 67-5, 67-8 e 67-15), sendo representado pelo grupo VIII. Os perfis dos isolados 62-4 e 67-5 foram considerados idênticos, assim como os perfis obtidos das bactérias controle SEMIA 6145 e BR10055, já a estirpe SEMIA 4080 foi considerada 80% similar às estirpes SEMIA 6145 e BR10055. Os demais agrupamentos apresentaram similaridade inferior a 70% (Figura 22).

A bactéria controle SEMIA 6157, grupo VIII, foi considerada de pouca homologia com as demais bactérias, possuindo semelhança de apenas 7% de seu perfil em comparação com as demais (Figura 22).

O grupo II possui o maior aglomerado de estirpes controle, sendo representadas pelas cepas SEMIA 4080, SEMIA 6145, BR10055 e CFN42 e pelos isolados 48-11 e 48-15 que possuem 51% de paridade com essas estirpes controle e os isolados 48-16 e 48-32 com semelhança de 42% com as controles (Figura 22).

**Figura 21** – Perfil eletroforético de ARDRA de produtos PCR amplificados da região 16S rRNA de 18 isolados de nódulos de mucuna e 10 estirpes controles em gel de agarose (2,0%) com marcadores moleculares 1 kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.



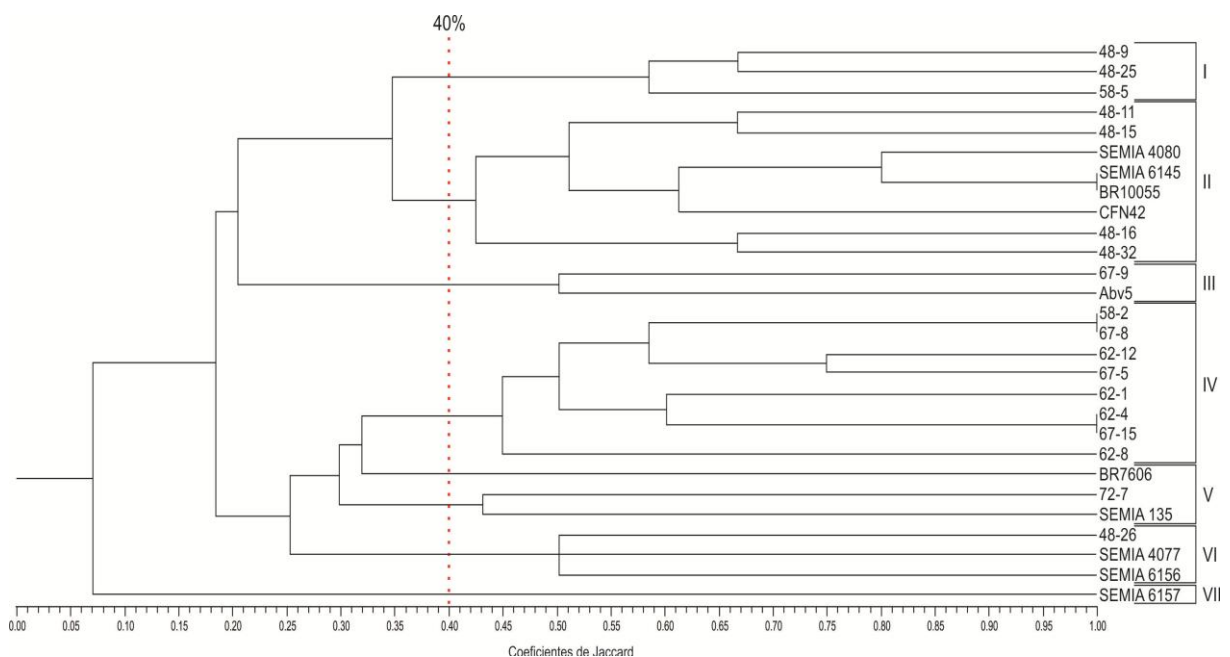
Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145 e SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5). Marcadores moleculares: 1kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder.

As bactérias 67-9 e Abv5, grupo III, agruparam-se com 50% de homologia. Valor esse também encontrado para o isolado 48-26 e as bactérias controle SEMIA 4077 e SEMIA 6156, grupo VII (Figura 22).

Pelos índices de similaridade obtidos dos perfis da “digestão” com a endonuclease *HaeIII* a análise pode ser considerado com um nível discriminatório semelhante ao padrão obtido pela IRS 16-23S rRNA. Contudo os três teste discriminatórios (IRS 16-23S rRNA-PCR, REP-PCR e ARDRA)

não apresentaram resultados de agrupamentos muito semelhantes entre si; pois apenas os isolados 48-9, 48-11 e 48-15 tiveram agrupamentos próximos pelas três técnicas. Fato que comprova a alta diversidade genética encontrada nos microrganismos do solo goiano associados à mucuna.

**Figura 22** – Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para as avaliações dos fragmentos da “digestão” da região 16S rRNA pela endonuclease *HaeIII* obtidos em gel de agarose (2,0%) nas análise molecular de 18 bactérias isoladas de nódulos de mucuna e 8 bactérias controle.



Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080);  
*Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145 e SEMIA 6157);  
*Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5).

### 5.3 SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S rDNA

A partir do sequenciamento parcial dos amplificadores da região 16S rRNA dos isolados foi possível inferir a presença de três gêneros de bactérias dentro de nódulos de mucuna. Tais gêneros já foram abordados como espécies endofíticas:

*Enterobacter*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas* e são considerados como bactérias promotoras do crescimento vegetal (Tabela 6).

**Tabela 6**– Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de isolados de nódulos de mucuna e identificação por homologia com sequências gênicas 16S rRNA de bactérias contidas no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

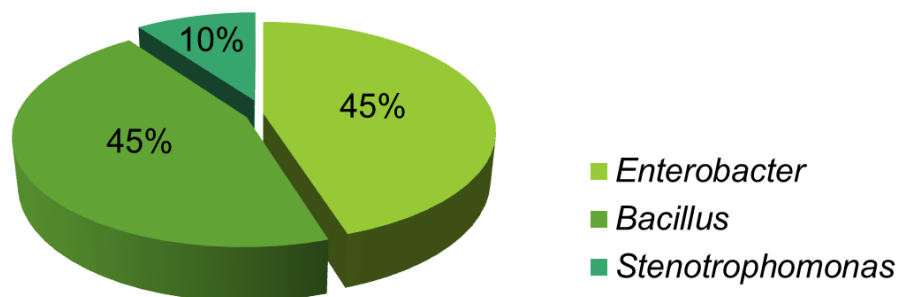
Isolado	Peso (pb)	Espécie	E-value	ID	Número de Acesso
48-11	641	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.0	98%	NR_118568.1
48-15	577	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.0	98%	NR_118568.1
48-26	700	<i>Enterobacter sp.</i>	0.0	99%	NR_118568.1
48-32	692	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.0	99%	NR_118568.1
58-5	691	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.0	99%	NR_041577.1
62-1	507	<i>Bacillus thuringiensis</i>	4e - 152	91%	NR_102506.1
62-2	696	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.0	98%	NR_118568.1
62-4	689	<i>Bacillus anthracis</i>	0.0	99%	NR_074453.1
62-8	741	<i>Bacillus megaterium</i>	0.0	99%	NR_116873.1
62-12	727	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.0	99%	NR_117946.1
72-7	611	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.0	99%	NR_117946.1

O sequenciamento parcial foi realizado com o oligonucleotídeo Y1, obtendo de sequencias com tamanhos médios de 661 pares de base para 11 isolados. A análise pelo “blast” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) gerou homologias iguais ou superiores a 91%, conferindo boa classificação a nível de gênero para os isolados. O gênero *Enterobacter* foi inferido para 45% dos isolados; o mesmo número isolado foi identificado no gênero *Bacillus*; já o gênero *Stenotrophomonas* foi observado para 10% dos isolados (Tabela 6 e Figura 23).

A menor homologia foi encontrada para o fragmento de 507 pb do isolado 62-1 que apresentou homologia com a espécie *Bacillus thuringiensis* de 91%. Os

demais isolados apresentaram paridade de 98 a 99% com suas respectivas sequências de referência. Uma nova etapa de sequenciamento com ambos os oligonucleotídeos testados deve ser realizada para confirmação das espécies e elucidação da taxonomia (Tabela 6).

**Figura 23** – Gráfica da representatividade dos gêneros obtidos pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de 11 isolados de nódulos de mucuna identificados por homologia com sequências gênicas 16S rRNA de bactérias contidas no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



A ocorrência de bactérias endofíticas não simbióticas em nódulos de leguminosas já foi relatada em diversos trabalhos com espécies de *Glycine max*(soja), *Arachis hypogaea* (amendoim), *Macroptilium atropurpureum*(siratro), *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Hedysarum* spp., *Trifolium pratense* (trevo vermelho) e *Melilotus dentatus*. Os gêneros frequentemente encontrados nesses nódulos foram: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Paenibacillus* (IBÁÑEZ et al., 2009; KAN et al., 2007; LIMA et al., 2009; MHAMDI et al., 2005; MURESU et al., 2008; SILVA, 2012; STRUZ et al., 1997; WANG et al., 2006).

Para Hallamann e colaboradores (1997) essas espécies não simbióticas da rizosfera infectam os tecidos vegetais juntamente com os rizóbios, espécie simbiótica, sendo capazes de permanecer e viver nos nódulos rizóbiais por pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, não havendo prejuízo visível nos tecidos de seu hospedeiro vegetal. Consistindo assim em espécies oportunistas, capazes de colonizar nódulos induzidos por rizóbios.

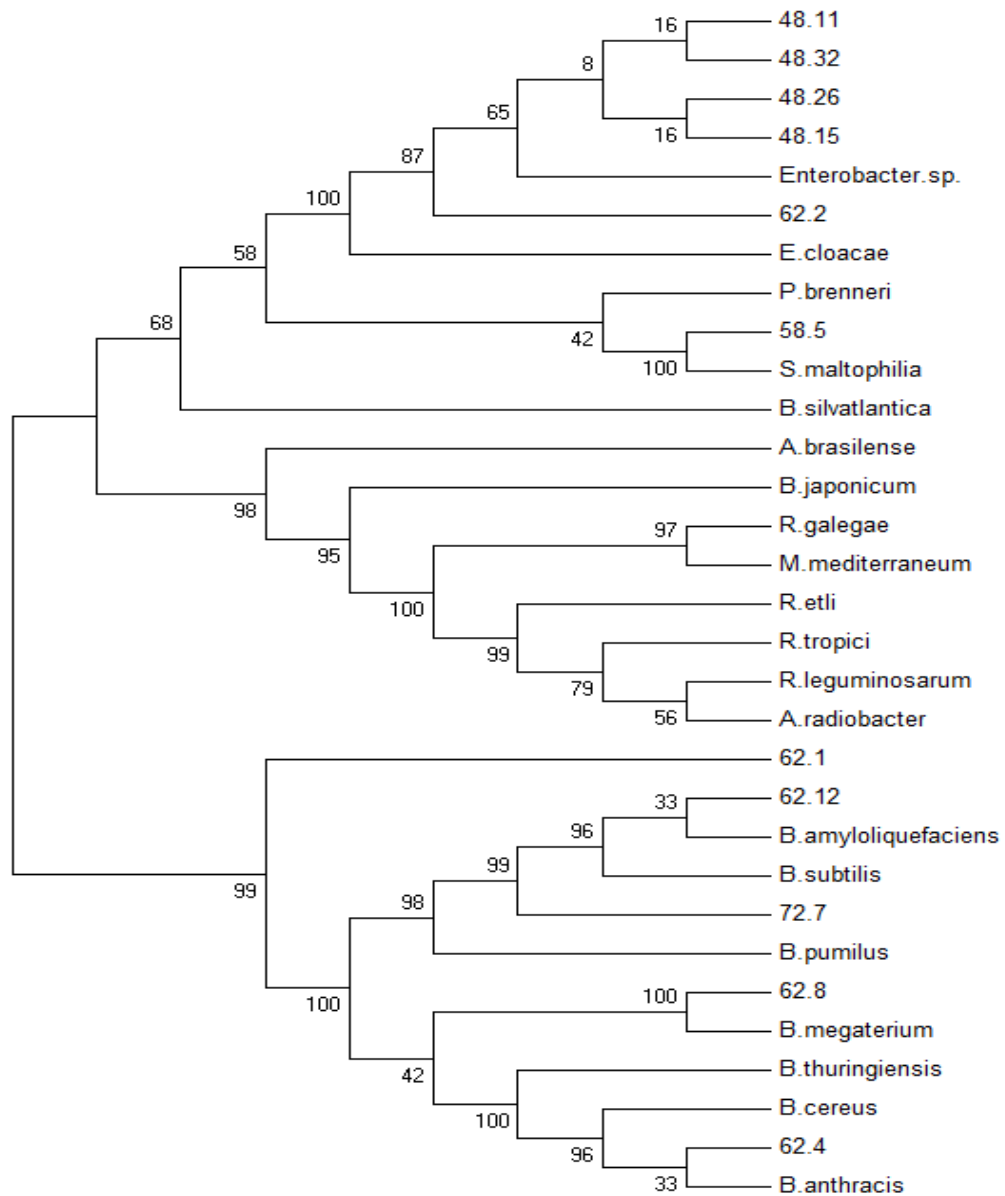
A evolução de bactérias, originalmente não simbióticas, para bactérias simbióticas, através de aquisição de genes simbióticos dos rizóbios de nodulação e fixação de nitrogênio por transferência horizontal no interior dos nódulos já foi evidenciada por Li e colaboradores (2008) dentro do gênero de *Bacillus* spp. e *Bradyrhizobium japonicum*, onde 99% do gene *nifH* já foram considerados similares em ambas as espécies. A análise pelo programa MEGA7 demonstra a relação filogenética entre as sequências obtidas da região 16S rRNA de isolado de mucuna, comparadas a sequências de bactérias obtidas no banco de dados do NCBI com alta similaridade obtidas pelo BLAST.

A relação evolutiva obtida revelou um padrão de ramificação já esperada (IBÁÑEZ et al., 2009; KAN et al., 2007; LIMA et al., 2009; MHAMDI et al., 2005; MURESU et al., 2008; QUIRINO et al., 2009; SILVA, 2012; STRUZ et al., 1997; WANG et al., 2006) havendo a formação de dois grupos principais. Um grupo representa o filo das Proteobacteria, enquanto o segundo simula o filo Firmicutes.

O ramo das Proteobacterias foi separado em três subgrupos, compondo as classes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do filo. A classe  $\alpha$  foi organizada pelos membros controle: *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium etli*, *R. galegae*, *R. leguminosarum*, *R. tropici*, *Mesorhizobium mediterraneum*. Já a classe  $\beta$  foi representada pela bactéria *Burkholderia silvatlantica*. Nenhum isolado de mucuna foi alinhado as classes  $\alpha$  e  $\beta$ . A classe  $\gamma$  foi composta por espécies de *Enterobacter* sp., *Enterobacter cloacae*, com alta semelhança para os isolados 48-11, 48-15, 48-26 e 48-32; de *Stenotrophomonas maltophilia*, com paridade de 100% com o isolado 58-5; e *Pseudomonas brenneri* (Figura 24). O ramo do filo Firmicutes agrupou diversas espécies do gênero *Bacillus* com os isolados 62-1, 62-4, 62-8, 62-12 e 72-7. Sendo o isolado 62-1 o mais distante taxonomicamente dos demais, por conseguinte um novo processo de sequenciamento deve ser realizado para este

isolado, a fim melhor identifica-lo. Em contrapartida o isolado 62-8 apresentou um alinhamento de 100% com a espécie de *Bacillus megaterium*(Figura 24).

**Figura 24** – Relação evolutiva do gene 16S rRNA em isolados de mucuna. A história evolutiva do gene 16S rRNA para 11 isolados de mucuna e 20 bactérias de referencia obtidas no banco de dados do NCBI foi inferida usando o método UPGMA (FELSENSTEIN, 1985; SNEATH; SOKAL, 1973) e a relação filogenética consenso de *bootstrap* com 1000 repetições; ramos com *cutoff* de 50%. A percentagem de árvores idênticas foi expressão na lateral dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Probabilidade Composição Máxima (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004), sendo essas unidades do número de substituições de bases por local. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 444 posições no conjunto de dados final. As análises foram realizadas em MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2015).



Poucos estudos podem ser encontrados na literatura para bactérias endofíticas de mucuna do Cerrado. O presente estudo elucidar questões de relações ecológicas e entendimento das interações planta/bactérias neste ecossistema. A fim de selecionar bactérias promotoras de crescimento vegetal utilizadas como inoculantes em sistemas de entressafras da agricultura do Cerrado goiano.

De forma comparativa o agrupamento mais próximo do obtido pelo sequenciamento foi alcançado pelo perfil polimórfico da restrição do gene 16S rRNA. O que torna essa técnica uma ferramenta útil para determinação ao nível

de filos e classes. Já as análises com regiões IRS 16-23S rRNA e REP demonstraram padrões polimórfico mais variado, podendo ser empregado para determinação de subespécies.

O polimorfismo gerado nas regiões *nifHr*, *atpD* e *glnII* não era esperado, contudo o evento também foi esclarecido com o sequenciamento da região 16S rRNA que elucidou a taxonomia dos isolados estudados em 3 gêneros, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas*. Portanto a especificidade dos oligonucleotídeos para rizóbios podem amplificar mais de uma região dos gêneros identificados, gerando o padrão de fragmentos observados para essas regiões.

## 6 CONCLUSÃO

A análise da estrutura genômica pela técnica PFGE revelou a presença de um único *replicombem* definido para a maioria dos isolados com peso molecular próximo a 1,2 Mb e a presença de material genético circular e/ou de alto peso molecular retido nos poços.

Entre as análises de PCR utilizando os vários oligonucleotídeos, foi possível observar uma grande variação de polimorfismo de fragmentos e agrupamentos de similaridade.

As regiões IRS 16-23S rRNA e REP, demonstram ser regiões com amplo polimorfismo, sendo considerada, portanto, boas regiões para identificação de subespécies.

Seis isolados demonstraram ampliações para região *nifH* específica para rizóbios. Os perfis gerados para essa região demonstram correlação com os encontrados por rizóbios, revelando algum nível de ancestralidade para este gene com o grupo dos rizóbios.

Nenhuma região foi amplificada das amostras de mucuna para a sequência de oligonucleotídeos do gene *nodC*. Certificando que as bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas* não são capazes de nodular vegetais pelas vias do gene *nod*, já que os isolados foram identificados como pertencentes a estes.

A análise dos genes para melanina *melA*, *housekeeping*, *glnII* e *atpD*, exibiram padrões de polimorfismo que podem ser usados como marcadores moleculares para determinação filogenética.

O polimorfismo gerado pela “digestão” da região 16S rRNA exibiu um padrão diverso para os isolados. O resultado representou um formato de comparação confiável para divisão de filos entre bactérias analisadas.

Os resultados obtidos para 11 isolados de mucuna quanto ao sequenciamento da região 16S rRNA, constatou a presença de três gêneros predominantes (*Enterobacter*, *Bacillus* e *Stenotrophomonas*) delineando estas como pertencentes a microbiota associadas a plantas de mucuna cultivadas no Cerrado goiano.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S.; SELVAPANDIYAN, A.; BHATNAGAR, R. K. Phylogenetic analysis of Gram-positive bacteria based on *grpE*, encoded by the *dnaK* operon. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, n. 5, p. 1761-1766, 2000.

ANDRADE, D. S.; ATAÍDE, L. T.; SOUZA, J. R. P.; GOES, K. C. G. P.; MORITZ, P. Caracterização morfológica, fisiológica e infectividade em planta de estirpes de *Frankia* isoladas de nódulos de Casuarina. **Semana: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 597-608, 2007.

ANTUNES, J. E. L. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava (*Phaseolus lunatos* L.)**. 108f. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Piauí: Teresina, 2010.

ARDLEY, J. K.; PARKER, M. A.; DE MEYER, S. E.; TRENGOVE, R. D.; O'HARA, G. W.; REEVE, W. G.; YATES, R. J.; DILWORTH, M. J.; WILLEMS, A.; HOWIESON, J. G. *Microvirgalupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial

root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2579-2588, 2012.

ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, U. B.; PUHLER, A. Nucleotide sequence of a 24,206 base pair fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology*, v. 203, p. 715-738, 1988.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, Anamaya Publishers, p. 189-207, 2007.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; MACHERONI Jr, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA – Meio Ambiente, p. 57-59, 2000.

BALDANI, J. L.; Caruso, L.; Baldani, V. L. D.; Goi, S. R.; Döbereiner, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology Biochemistry**, v. 9, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F. L.; HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S. REIS, M. V.; NOGUEIRA, E. M.; ARAÚJO, J. L. S.; BORGES, L. E.; SOARES, L. H. B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V. L. D.; CARVALHO, G. T. L.; ALVES, B. J. R.; JAMES, E. K.; JANTALIA, C. P.; FERREIRA, P. C. G.; VIDAL, M. S.; BODDEY, R. M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família *Poaceae* (antiga *gramineae*). **Tópicos em Ciências do Solo**, v. 6, p. 203-271, 2009.

BARRADAS, C. A. A. **Uso da adubação verde**. Manual Técnico 25. Niterói: Programa Rio Rural, 2010.

BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON, M.; DUNICAN, L. K.; e GANNON, F. The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. **PCR Methods Applic**, v. 1, p. 51–56, 1991.

BECKING, J. The *Rhizobium* symbiosis of the nonlegume Parasponia. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. (Ed.). Biological nitrogen fixation. New York: Chapman and Hall, p. 497-559, 1992.

BENT, E.; CHANWAY, C. P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 980-988, 1998.

BHUVANESWARI, T. V.; TURGEON, B. G.; BAUER, W. D. Early Events in the Infection of Soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*. **Plant Physiology**, v. 66, p. 1027-1031, 1980.

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

BORLAUG, N. E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: BAILEY, R. (Ed.). **Global warming and other eco-myths**. Competitive Enterprise Institute, Roseville: EUA, p. 29-60, 2002.

BOTHE, H.; BARBOSA, G.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation and nitrate respiration by *Azospirillum brasilense*. **Z Naturforsch**, v. 38c, p. 571-577, 1983.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.ministeriodomeioambiente.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 02/11/2015.

BROUGHTON, W. J.; HANIN, M.; RELIC, B.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMSEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUERE, 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**. Washinton: EUA, v. 188, n. 10, p. 3654-3663, 2006.

BURRIS, R. H. Nitrogenases. **Journal of Biological Chemistry**, n. 266, p. 9339-9342, 1991.

BURRIS, R. H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotecnology**, Nova Yorkv. 22, n. 3, p.381-393, 1999.

CAAMAL-MALDONADO, J. A.; JIMENEZ-OSORNIO, J. J.; TORRESBARRAGAN, A.; ANAYA A. L. The use of allelopathic legume cover and mulch species for weed control in cropping systems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 93, p. 27-36, 2001.

CABRERA-VALLADARES, N.; MARTÍNEZ, A.; PIÑERO, S.; LAGUNAS-MUÑOZ, V. H.; TINOCO, R.; ANDA, R.; VÁZQUEZ-DUHALT, R.; BOLÍVAR, F.; GOSSET, G. Expression of the *mela* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 772–779, 2006.

CARDOSO, A. A. **Caracterização Polifásica de Isolados Bacterianos Obtidos de Nódulos de Feijoeiro-Comum**. 64f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia. Goiânia: Goiás, 2014.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, p. 2-9, 1988.

CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; PAPPAS JR, G.; KUROKAWA, A. S.; NETO, E. L.; KRÜGER, R. H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Arch Microbiol**, v. 190, p. 129–139, 2008.

CAVALCANTI, R.; JOLY, C. The conservation of the Cerrados. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The Cerrado of Brazil. Ecology and natural history of a neotropical savanna**. Columbia University Press, New York: EUA, p. 351-367, 2002.

CHAGAS JÚNIOR, A. F; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.

CHANG, Y. L.; WANG, J. Y.; WANG, E. T.; LIU, H. C.; SUI, X. H.; CHE, 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, p. 2496–2502, 2011.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; FERREIRA, M. C.; GRANGE, L.; CAMPO, R. J.; MOSTASSO, F. L.; ANDRADE, D. S.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. CHUEIRE, L.M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com *primers* aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, v. 4, p. 80-95, 2000.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **R. Bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 27, p. 833-840, 2003.

COHN, F. Identity of *Bacillus Subtilis*, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 51, n. 2, p. 191-215, 1932.

COMPANT, F.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4949, 2005.

CONN, H. J. Validity of the Genus *Alcaligenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 353-360, 1942.

CROSSMAN, L. C.; GOULD, V. C.; DOW, J. M.; VERNIKOS, G. S.; OKAZAKI, A.; SEBAIHIA, M.; SAUNDERS, D.; ARROWSMITH, C.; CARVER, T.; PETERS, N.; ADLEM, E.; KERHORNOU, A.; LORD, A.; MURPHY, L.; SEEGER, K.; SQUARES, R.; RUTTER, S.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; HARRIS, D.; CHURCHER, C.; BENTLEY, S. D.; PARKHILL, J.; THOMSON, N. R.; AVISON, M. B. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. **Genome Biology**, v. 9, n. 4, p. 74.2- 74.13 2008.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: Methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 491-503, 1999.

COYNE, V. E.; al-Harthi, L. Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 58, n. 9, 2861–2855, 1992.

DEAN, R. D.; BOLIN, J. T. ZHENG, L. Nitrogenase metallocluster: structure, organization and synthesis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, n. 21, 1993.

DE-POLLI, H.; FRANCO, A. A. Inoculação de leguminosas. **Circular Técnica 1**, Embrapa, Seropédica: Rio de Janeiro, p. 31, 1985.

D' HAEZE, W.; HOLSTERS, M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, v. 12, n. 6, 2002.

DIAS, A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. L.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPÇÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 189-195, 2009.

DIAS, A. C. F.; VILELA, D. M.; SILVESTRE, M. P. C.; SCHWAN, R. F. Alkaline protease from bacillus sp. isolated from coffee bean grow on cheese whey. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 2027-2034, 2008.

DOWNIE, J. A. Function of rhizobial nodulation genes. In: ESPANHAK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. (Ed.) **The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associated bacteria**. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: Holanda, p. 387, 1998.

DÖBEREINER, J. Importância da Fixação Biológica de Nitrogênio para a Agricultura Sustentável. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Seropédica, ano 1, n. 01, 1997.

DUDLEY, M. E.; JACOBS, T. W.; LONG, S. R. Microscopic studies of cell divisions induced in alfafa roots by *Rhizobium meliloti*. **Plant**, Berlim: Alemanha, v. 171, p. 289-301, 1987.

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

EADY, R. R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemistry Reviews**, n. 96, p. 3013-3030, 1996.

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

EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, v. 36, n.2, p. 184-189, 2007.

EITEN, G. 1977. **Delimitação do conceito de Cerrado**. Arquivos do Jardim Botânico, Rio de Janeiro, v. 21, P. 125-134, 1977.

ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; DE-POLLI, H.; ALMEIDA, D. L.; ABOUD, A. C. S. Adubação verde com leguminosas. **Informação Tecnológica**. Embrapa. Brasília, p. 52, 2005.

ESPINDOLA, J. A. A.; ALMEIDA, D. L.; GUERRA, J. G. M. Estratégias para utilização de leguminosas para adubação verde em unidades de produção agroecológica. **Documentos 174**. Embrapa. Seropéica: Rio de Janeiro, p. 7, 2004.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Londrina: Editora Planta, p. 402, 2006.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J eds. **Biological Nitrogen Fixation**, New York: Editora Chapman and Hall, p. 1-24, 1992.

FARIA, C. M. B. Comportamento de leguminosas para adubação verde no Submédio São Francisco. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 63, Embrapa, Petrolina: Pernambuco, 2004.

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

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 908-920, 2003.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

FISHER, S. H. Glutamine synthesis in *Streptomyces*--a review. **Gene**, v. 115 n.1-2, p. 13-17, 1992.

FISHER, R. F.; EGELHOFF, T. T.; MULLIGAN, J. T.; LONG, S. R. Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free-extracts containing NodD to DNA-sequences upstream of inducible nodulation genes. **Genes & Development**. New York: USA, v. 2, n. 3, p. 282-293, 1988.

FISHER, R. F.; TU, J. K.; LONG, S. R. Conserved nodulation genes in *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington: EUA, v. 49, p. 1432-1435, 1985.

FORMENTINI, E. A.; LÓSS, F. R.; BAYERL, M. P.; LOVATI, R. D.; BAPTISTI, E. Cartilha sobre Adubação Verde e Compostagem. Embrapa. Vitória, 2008. Disponível em: <[http://agroecologia.incaper.es.gov.br/site/images/publicacoes/cartilha\\_leguminosas.pdf](http://agroecologia.incaper.es.gov.br/site/images/publicacoes/cartilha_leguminosas.pdf)>. Acesso em: 13/11/2011.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 68-74, 1994.

FRIZZO, M. L. S. Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr. 87f. Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo – Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre: Rio Grande do Sul, 2007.

GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogenfixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p. 280-300, 2004.

GALIBERT, F.; FINAN, T. M.; LONG, S. R.; PUHLER, A.; ABOLA, P.; AMPE, F.; BARLOY-HUBLER, F.; BARNETT, M. J.; BECKER, A.; BOISTARD, P.; BOTHE, G.; BOUTRY, M.; BOWSER, L.; BUHRMESTER, J.; CADIEU, E.; CAPELA, D.; CHAIN, P.; COWIE, A.; DAVIS, R. W.; DREANO, S.; FEDERSPIEL, N. A.; FISHER, R. F.; GLOUX, S.; GODRIE, T.; GOFFEAU, A.; GOLDING, B.; GOUZY, J.; GURJAL, M.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; HONG, A.; HUIZAR, L.; HYMAN, R. W.; JONES, T.; KAHN, D.; KAHN, M. L.; KALMAN, S.; KEATING, D. H.; KISS, E.; KOMP, C.; LELAURE, V.; MASUY, D.; PALM, C.; PECK, M. C.; POHL, T. M.; PORTETELLE, D.; PURNELLE, B.; RAMSPERGER, U.; SURZYCKI, R.; THEBAULT, P.; VANDENBOL, M.; VORHOLTER, F. J.; WEIDNER, S.; WELLS, D. H.; WONG, K.; YEH, K. C.; BATUT, J. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**, v. 293, p. 668-672, 2001.

GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2<sup>a</sup> ed. Springer-Life Sciences, 2815p., 2005.

GAUNT, M. W.; TURNER, S. L.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LLOYD-MACGILP, S. A.; YOUNG, J. P. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 6, n. 51, p. 2037-2048, 2001.

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

GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; FREITAS, J. R.; SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.)

and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 43-50, 1998.

GEORGIADIS, M. M.; KOMIYA, H.; CHAKRABARTI, P.; WOO, D.; KORNUC, J. J.; REES, D. C. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Science**, v. 257, p. 1653-1659, 1992.

GEURTS, R.; BISSELING, T. Rhizobium Nod factor perception and signaling. **The Plant Cell**, p. S239-S249, 2002.

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

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.

GONZÁLEZ, T. O. **Caracterização, diversidade genética e nodulação em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) de isolados de rizóbios do Brasil e da Venezuela**. 2008. 72f. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Jaboticabal: São Paulo, 2008.

GONZÁLEZ, V.; SANTAMARÍA, R. I.; BUSTOS, P.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, I.; MEDRANO-SOTO, A.; MORENO-HAGELSIEB, G.; JANGA, S. C.; RAMÍREZ, M. A.; JIMÉNEZ-JACINTO, V.; COLLADO-VIDES, J.; DÁVILA, G. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 10, p. 3834-3839, 2006.

GRANGE, L. **Diversidade de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) isolado de solos da Região Nordeste e da Região Sul do Brasil**. 87 f. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina: Paraná, 2001.

GRANCE, L. A **Análise Polifásica na Reclassificação Filogenética de *Rhizobium etli* e o Estudo da Diversidade Genética de Isolados dos Cerrados Brasileiros**. 153f. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná. Setor

de Ciências Biológicas. Departamento de Genética, Curitiba: Paraná, 2005.

GRAYSTON, S. J.; CAMPBELL, C. D.; BARDGETT, R. D.; MAWDSLEY, J. L.; CLEGG, C. D.; RITZ, K.; GRIFFITHS, B. S.; RODWELL, J. S.; EDWARDS, A. C.; DAVIES, W. J. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grassland of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 63-84, 2004.

GREEN, J., BOHANNAN, J. M. Spatial scaling of microbial biodiversity. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 21, p. 502-507, 2006

GÜETLER, V.; STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, New York, v. 142, p. 3-16, 1996.

GUPTA, R. S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 367-402, 2000.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOPPER, J. W. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 925-937, 1998.

HAUKKA, K. **Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from tropical tree legumes**. 176f. Dissertação de Mestrado - Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki: Finlandia, 1997.

HAUKKA, K. LIDSTRÖM, K. Pulsed-field electrophoresis for genotypic comparison of *Rhizobium* bacteria that nodulate leguminous trees. **FEMS Microbiology Letters**, v. 119, p. 215-220, 1994.

HAUKKA, K.; LINDSTROM, M. K.; YOUNG, J. P. W. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolated

from leguminous trees growing in Africa and Latin America. **Appl Environ Microbiology**, v. 64, p. 419-426, 1998.

HE, J.; WANG, J.; YIN, W.; SHAO, X.; ZHENG, H.; LI, M.; ZHAO, Y.; SUN, M.; WANG, S.; YU, Z. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* Strain CT-43. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 13, p. 3407-3408, 2011.

HOFFMANN, L. V. **Biologia Molecular da Fixação Biológica do Nitrogênio**. Embrapa: Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, 2007. Disponível em: <[http://iac.impulsa.com.br/publicacoes/publicacoes\\_online/pdf/microbiota.pdf](http://iac.impulsa.com.br/publicacoes/publicacoes_online/pdf/microbiota.pdf)>. Acesso em: 12/11/2011

HORMAECHE, E., EDWARDS, P. R. A proposed genus *Enterobacter*. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, v. 10, p. 71-74, 1960.

HOU, B. C.; WANG, E. T.; LI-JR, L.; JIA, R. Z.; CHEN, W. F.; GAO, Y.; DONG, R. J.; CHEN, W. X. *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducisnicolai* (Sirj.) Vassilcz. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 3051-3057, 2009.

HOUNGNANDAN, P.; SANGINGA, N.; WOOMER, P.; VANLAUWE, B.; van CLEEMPUT, O. Response of *Mucuna pruriens* to symbiotic nitrogen fixation by rhizobia following inoculation in farmers fields in the derived savanna of Benin. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 558-565, 2000.

HUNGRIA, M. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos. In: HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R., (eds.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Embrapa. Brasília: Distrito Federal, p. 890, 1994a.

HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas de rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Campinas: São Paulo, v. 18, p. 339-364, 1994c.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. **Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas**. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 30p., Recife. Anais Recife: SBS, 2005.

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BANGEL E. V.; BARCELLOS, F.G.; GRANGE, L.; PINTO, F.G.S.; RIBEIRO, R.A.; BATISTA, J.S.S.; BINDE, D.R.; PLOTEGHER, F.; KASCHUK, G.; ALBERTON, A.; LOUREIRO, M.F.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.M.O. Identificação das metodologias mais adequadas para a análise da diversidade genética intra e interespecífica em rizóbios. In: MERCANTE, F. M.; FILHO, O. F. L.; BONATTO, S. P. S. **Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola**, Embrapa Agropecuária Oeste: Bonito, n. 14, p. 37-38, 2008.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. Manual de curadores de germoplasma – microorganismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Documentos 332**. Embrapa. Brasília: Distrito Federal, 2011.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S. & HUNGRIA, M. (Ed.) **Microrganismos de importância agrícola**. Embrapa. Brasília: Distrito Federal, p. 9-89, 1994b.

HYNES, M. F.; BRUKSCH, K.; PRIEFER, U. Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 326-332, 1988.

IBÁÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M. L.; FABRA, A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 49-55, 2009.

IBEKWE, A. M.; KENNEDY, A. C.; FROHNE, P. S.; PAPIERNIK, S. K.; YANG, C. H.; CROWLEY, D. E. Microbial diversity along a transect of agronomic zone. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 39, p. 183-191, 2002.

IBGE. **Mapa de Biomas do Brasil**: escala 1:5.000.000. 2004 Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 02/11/2015.

JACOBS, M. A.; PAYNE, S. R.; BENDICH A. J. Moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis show only linear mitochondrial DNA molecules from yeasts with linear-mapping and circular-mapping mitochondrial genomes. **Curr Genet**, v. 30, p. 3-11, 1996.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Appl. Environ. Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 945-52, 1993.

KAMST, E.; PILLING, J.; RAAMSDONK, L. M.; LUGTENBERG, B. J. J.; ESPANHAK, H. P. Rhizobium nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 2103-2108, 1997.

KAN, F. L.; CHEN, Z. Y.; WANG, E. T.; TIAN, C. F.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, v. 188, p. 103-115, 2007.

KANEKO, T. NAKAMURA, Y.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; KATO, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KIYOKAWA, C.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MOCHIZUKI, Y.; NAKAYAMA, S.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKEUCHI, C.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genome structure of the nitrogen –fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, v. 7, p. 331-338, 2000.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; MINAMISAWA, K.; UCHIUMI, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; IRIGUCHI, M.; KAWASHIMA, K.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; SHIMPO, S.; TSURUOKA, H.; WADA, T.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genomic sequence of nitrogen fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. **DNA Research**, v. 9, p. 189-197, 2002.

KATO, Y.; ASAHARA, M.; GOTO, K.; KASAI, H.; YOKOTA, A. *Methylobacterium persicinum* sp. nov., *Methylobacterium komagatae* sp. nov., *Methylobacterium brachiatum* sp. nov., *Methylobacterium tardum* sp. nov. and *Methylobacterium gregans* sp. nov., isolated from freshwater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1134-1141, 2008.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, n. 33, p. 389-397, 1994.

KOWALCHUCK, G. A.; BUMA, D. S.; BOER, W.; KLINKHAMER, P. G. L.; VEEN, J. A. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, New York, v. 81, p. 509-521, 2002.

KREUTZER, R.; STEIBL, H. D.; DAYANANDA, S.; DIPPE, R.; HALDA, L.; BUCK, M.; KLINGMÜLLER, W. Genetic characterization of nitrogen fixation in *Enterobacter* strains from the rhizosphere of cereals. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M. (Ed.) **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 25-36, 1991.

KUMAR, B.; KUMAR, M.S.; ANNAPURNA, K.; MAHESHWARI, D.K. Genetic diversity of plant growth-promoting rhizobia isolated from a medicinal legume, *Mucuna pruriens* Linn. **Current Science**, v. 91, p. 1524-1529, 2006.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution** (submitted), 2015.

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, p. 981-993, 2001.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M. R.; CHARNAY, M. P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S. I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR-DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions:

Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2029-2036, 1996.

LAMB, J. W.; HOMBRECHER, G.; JOHNSTON, A. W. B. Plasmid-determined nodulation and nitrogen fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. **Molecular e Genética MGG**, v.186, n. 3, p. 449-452, 1982.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSON, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, R. Rapid determination of 16s ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LESSA, R. N. T. **Ciclo do Nitrogênio**. Universidade Federal de Pelotas Instituto de Química e Geociências Departamento de Química Analítica e Inorgânica. Pelotas, 2007. Disponível em: <[http://www.ufpel.edu.br/iqg/livrovirtual/estanteamb\\_arquivos/nitrogenio.pdf](http://www.ufpel.edu.br/iqg/livrovirtual/estanteamb_arquivos/nitrogenio.pdf)>. Acesso em: 13/11/2011.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 238-246, 2008.

LIMA, A.A. **Caracterização e seleção de rizóbios de mucuna**. 2009. 92f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica: Rio de Janeiro, 2009.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, 2005.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, p. 27-145, 2009.

LIN, D. X.; WANG, E. T.; TANG, H.; HAN, T. X.; HE, Y. R.; GUAN, S. H.; CHEN, W. X. *Shinellakummerowiae* sp. nov., a novel symbiotic bacterium isolated from root nodule of the herbal legume

*Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1409-1413, 2008.

LIU, X. Y.; WEI, S.; WANG, F.; JAMES, E. K.; GUO, X. Y.; ZAGAR, 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, p. 417-426, 2012.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. V. D. Endophytic Bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606, 2002.

LONG, S. R. *Rhizobium*-Legume nodulation: life together in the underground. **Cell**, v. 56, p. 203-214, 1989.

LOPES, A. S. Soils under Cerrado: a success story in management. **Better Crops International**, v. 10, n. 2, p. 9-15, 1996.

LUKINMAA, S.; NAKARI, U. M.; EKLUND, M.; SIITONEN, A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, **Copenhagen**, v. 112, n. 12, p. 908-929, 2004.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAGNANI, G. S. Diversidade de bactérias endofíticas em canade-açúcar. 92f. Dissertação de Mestre – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba: Paraná, 2005.

MANYANI, H.; SOUSA, C.; SORIA-DIAZ, M. E.; GIL-SERRANO, A.; MEGIAS, M. Regulation of nod factor sulphation gens in *Rhizobium tropici* CIAT899. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 574-578, 2001.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 343-355, 2002.

MAVINGUI, P.; FLORES, M.; GUO, X.; DÁVILA, G.; PERRET, X.; BROUGHTON, W. J.; PALACIOS, R. Dynamics of Genome Architecture in *Rhizobium* sp. Strains NGR234. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p.171-176, 2002.

MAVINGUI, P.; FLORES, M.; ROMERO, D.; MARTÍNEZ-ROMERO E.; PALACIOS, R. Generation of *Rhizobium* strains with improved symbiotic properties by random DNA amplification (RDA). **Nat. Biotechnol**, v. 15, p.564-569, 1997.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. **Documentos 91**, Embrapa, Seropédica, 1999.

MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, p. 489-503, 2007.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “Rizóbio”. **Comunicado Técnico 19**, Embrapa, Seropédica: Rio de Janeiro, p. 1-14, 1997.

MENDONÇA, R.; FELFILI, J.; WALTER, B.; SILVA JR., J. C.; REZENDE, A.; FILGUEIRAS, T.; NOGUEIRA, P. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S.; ALMEIDA, S.(Ed.). **Cerrado. Ambiente e flora**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –Embrapa - Cerrados, Planaltina: Distrito Federal, p. 288-556, 1998.

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. 12, n. 59, p. 2934-2950, 2009.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA

gene *a* of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-32, 2006.

MENSINK, R. E.; HAAKER, H. Temperature effects on the MgATP induced electron transfer between the nitrogenase protein from *Azotobacter vinelandii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 208, p. 295-299, 1992.

MERCADO-BLANCO, J.; GARCIA, F.; FERNANDEZ-LOPEZ, M.; OLIVARES, J. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene *mepA*. **Journal Bacteriology**, v. 175, p. 5403–5410, 1993.

MERRICK, M. L. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTHE, H.; BRUIJIN, F. J.; NEWTON, W. E. (Ed.) **Nitrogen fixation: hundred years after**. Stuttgart: Gustav Fischer, p. 293-302, 1988.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen Control in Bacteria. **Microbiological Reviews**, v.59, n. 4, p.604-622, 1995.

MHAMDI, R.; MRABET, M.; LAGUERRE, G.; TIWARI, R.; AOUANI, M. E. Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium* like strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 105-111, 2005.

MIGULA, W. Über ein neues System der Bakterien. *Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe*, v. 1, p. 235-238, 1894.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v. 80, p. 808-811, 1990.

MITIDIERI, J. **Manual de gramíneas e leguminosas para pastos tropicais**. 1. edição, São Paulo: Editora Nobel - Editora da Universidade de São Paulo, p. 198, 1983.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (Eds.). **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Lavras, v. 1, n. 2, 2010.

MOTTA, P. E. F.; CURI, N.; FRANZMEIER, D. P. Relation of soils and geomorphic surfaces in the Brazilian Cerrado. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (Ed.). **The Cerrados of Brasil ecology and natural history of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University, p. 13-32, 2002.

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

MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, 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 Microbiology Ecology**, v. 63, p. 383-400, 2008.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. In: Workshop on systematics and inventory of soil Nematodes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, n. 7, p. 2764-2769, 1996.

NOUR, S. M.; CLEYET-MAREL, J. C.; BECK, D.; EFFOSSE, A.; FERNANDEZ, M. P. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Canad. Journal Microbiology**, v. 40, p. 345-354, 1994.

OGUTCU, H.; ADIGUZEL, A.; GULLUCE, M.; KARADAYI, M.; SAHIN, F. Molecular characterization of *Rhizobium* strains isolated from wild chickpeas collected from high altitudes in Erzurum-Turkey. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 14, n. 2, p. 4294-4300, 2009.

OKITO, A.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Nitrogen fixation by groundnut and velvet bean residual benefit to a subsequent maize crop. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 1183-1190, 2004.

OLIVEIRA, A. M. R.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M.; SILVEIRA, J. R. P.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B. Caracterização da região espaçadora 16-23S

rDNA para diferenciação de estirpes de rizóbios utilizadas na produção de inoculantes comerciais no Brasil. **Ciência Rural**, v.42, n.8, p. 1423-1429, 2012.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia de polimerase**. Embrapa. São Carlos: São Paulo, 2007. Disponível em: < <http://www2.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacao gratuita/e-book/LivroProtMolecular.pdf/view> >. Acesso em: 20/12/2013.

PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; GNOCCHI, S.; FACELLI, S.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. **Appl. Environ. Microbiology**, v. 62, p. 2227-2285, 1996.

PAIVA, C. A. O.; OLIVEIRA, M. C.; MARRIEL, I. E.; SOUZA, F. A.; VALICENTE, F. H.; COTA, L. V. Manual de Gestão da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF). **Documento 153**, Embrapa, Sete Lagoas, 2013.

PERIN, A.; SANTOS, R. H. S.; URQUIAGA, S.; GUERRA, J. G. M.; CECON, P. R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 35-40, 2004

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

PINTO, F.G.S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F.M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1851-1864, 2007.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms — biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 429-443, 2006.

QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. J.; TAGLIAFERRO, A. C.; COLLEVATTI, R. G.; NETO, E. L.; DA SILVA, M. R.; BUSTAMANTE, M. M.; KRÜGER, R. H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, v. 164, n. 1, p. 59-70, 2009.

RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS, G.; GERSSHOFF, P. M. (Ed.). **DNA Markers: protocols, applications and overviews**. New York: John Wiley, p. 151-171, 1997.

RADEVA, G.; JURGENS, G.; NIEMI, M.; NICK, G.; SUOMINEN, L.; LINDSTRÖM, K. Description of two biovars in the *Rhizobium galegae* species: biovar orientalis and biovar officinalis. **Syst. Appl. Microbiology**, v. 24, p. 192-205, 2001.

RASKO, D. A.; RAVEL, J.; OKSTAD, O. A.; HELGASON, E.; CER, R. Z.; JIANG, L.; SHORES, K. A.; FOUTS, D. E.; TOURASSE, N. J.; ANGIUOLI, S. V.; KOLONAY, J.; NELSON, W. C.; KOLSTO, A. B.; FRASER, C. M.; READ, T. D. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. **Nucleic Acids Research**, v. 32, v. 3, p. 977-988, 2004.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; e REIS, V. M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. **Documentos 51**. Embrapa. Planaltina, Distrito Federal: Embrapa Cerrado, 2002.

REIS JÚNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; e REIS, V. M. Análises de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em Estudos de Diversidade Intra-Específica de *Azospirillum amazonense* Isolado de Diferentes Espécies de *Brachiaria*. **Documentos 117**. Embrapa. Planaltina, Distrito Federal: Embrapa Cerrado, 2004.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 103-113, 2004.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias. **Documentos 216**. Embrapa. Seropédica: Rio de Janeiro, 2006.

REN, Y.; REN, Y.; ZHOU, Z.; GUO, X.; LI, Y.; FENG, L.; WANG, L. Complete Genome Sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *Cloacae* Type Strain ATCC 13047. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 9, p. 2463-2464, 2010.

RIBBE, M.; GADKARI, D.; MEYER, O. N<sub>2</sub> fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxireductase that couple N<sub>2</sub> reduction to the oxidation of superoxide produced from O<sub>2</sub> by a molybdenum-CO dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, n. 272, p. 26627-26633, 1997.

RIBEIRO, J. F.; SANO, S.M.; DA SILVA, J. A. Chave preliminar de identificação dos tipos fisionômicos da vegetação do Cerrado. In: **Anais do XXXII Congresso Nacional de Botânica**. Sociedade Botânica do Brasil, Teresina: Piauí, p. 124-133, 1981.

RIVAS, R.; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. **Microbiology Insights**, v. 2, p. 51-69, 2009.

ROBERTS, G. P.; MacNEIL, T.; MacNEIL, G.; BRILL, W. J. Regulation and characterization of protein coded products by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumonia*. **Journal of Bacteriology**, v. 136, p. 267-279, 1978.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1367-1380, 2007.

ROSADO, A.; DUARTE, G.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 135-147, 1997.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. A moderna microbiologia do solo: aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUIHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FRUTINI-NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação**

**fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas.** Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS p. 429-448, 1999.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Associadas a Plantas de Milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1367-1380, 2007

RÖSCH, C.; MERGEL, A.; BOTHE, H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. **Appl Environ Microbiology**, v. 68, p. 3818–3829, 2002.

ROSSWALL, T. The internal nitrogen cycle between microorganisms, vegetation and soil. **Ecol. Bull.**, v. 22, p. 157-167, 1976.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2. edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SANTOS, H. R. M. **Diversidade de Bactérias em Nódulos de *Inga vera* Willd.**

(**Leguminosae- Mimosoideae**) do Sul da Bahia. 58f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Genética e Biologia Molecular. Ilhéus: Bahia, 2010.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. **A formação do nódulo em leguminosas.** 14p Seropédica: Rio de Janeiro. Embrapa Agrobiologia, 14p, ISSN 1517-8498; 251, 2008.

SARITA, S.; SHARMA, P. K.; PRIEFER, U. B.; PRELL, J. Direct amplification of rhizobial nodC sequences from soil total DNA and comparison to nodC diversity of root nodule isolates. **FEMS Microbiol Ecol** v. 54, p. 1–11, 2005.

SCHIMEL, J. P. Biogeochemical model: implicit vs. explicit microbiology. In: SCHULZE, E. D.; HEIMANN, M.; HARRISON, S.; HOLLAND, E.; LLOYD, J.; PRENTICE, I. C.; SCHIMEL, D. S.(Ed.). **Global Biogeochemical Cycles and the Physical Climate System**. London: Academic, p. 177-183, 2001.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, p. 67-75, 1984.

SFREDO, G. J.; OLIVEIRA, M. C. N. Soja – Molibdênio e Cobalto. 36p. Londrina: Paraná. Embrapa Soja, 36p, ISSN 2176-2937; 322, 2010.

SHAMSELDIN, A. Molecular biodiversity and identification of free living *Rhizobium* strains from diverse Egyptian soils as assessed by direct isolation without trap hosts. **American Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 4, n.5, p.541-549, 2008.

SILVA, A. T. Diversidade de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de siratro. 93 f. Dissertação – Universidade Federal de Lavras, Mestrado em ciências do solo, Lavras, 2012.

SILVA, F.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 3, p. 691-708, 2012.

SILVER, W. S.; POSTGATE, J. R. Evolution of asymbiotic nitrogen fixation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 40, p. 1-10, 1973.

SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W. Cloning of *pEA3*, a large plasmid of *Enterobacter agglomerans* containing nitrogenase structural genes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 90, p. 235-245, 1986.

SINGH, M.; KLEEBERGER, A.; KLINGMULLER, W. Location of nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. **Molecular and General Genetics**, v. 190, p. 373-378, 1983.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC/ABEAS/Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 236p.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4742-4751, 2001.

SMITH, B. E. Recent studies on the biochemistry and chemistry of nitrogenase. In: GERSSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation: achievements and objectives**. New York: Chapman and Hall, p. 3-13, 1990.

SNEATH, P. H. A; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy: The Principles and Practices of numerical classification**. San Francisco: W.A Freeman, 1973.

SPRENT, J. I.; DE FARIA, S. M. Mechanismos of infection of plants by nitrogenfixing organisms. **Plant and soil**, v. 110, p. 157-165, 1988.

STEPKOWSKI, T.; HUGHES, C. E.; LAW, I. J.; MARKIEWICZ, L.; GURDA, D.; CHLEBICKA, A.; MOULIN, L. Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: Evidence from nodulation gene trees. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 10, n. 73, p. 3254-3264, 2007.

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

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal Natural Products**, v. 67.p. 257- 268, 2004.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, p. 13-19, 1997.

SUI, X. H.; HAN, L. L.; WANG, E. T.; JIANG, F.; LIU, Y. H.; CHEN, W. X. Novel associations between rhizobial populations and legume species within the genera *Lathyrus* and *Oxytropis* grown in the temperate region of China. **Science in China Series C: Life Sciences**. v. 52, n. 2, p. 182-192, 2009.

SULLIVAN, P. Overview of cover crops and green manures. ATTRA-National Center for Appropriate Technology, p. 16, Fayetteville: Arkansas, 2003. Disponível em: <[http://www.clemson.edu/sustainableag/IP024\\_covercrop.pdf](http://www.clemson.edu/sustainableag/IP024_covercrop.pdf)>. Acesso em: 27/01/2014.

SULLIVAN, J. T.; PATRICK, H. N.; LOWTHER, W. L.; SCOTT, D. B.; RONSON, C. W. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 8985-8989, 1995.

SULLIVAN, J. T.; RONSON, C. W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a *phcA* gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 5145-5149, 1998.

SY, A.; GIRAUD, e.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* Bactérias nodular e fixar nitrogênio em simbiose com Legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 214-220, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 719p. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 101, p. 11030-11035, 2004.

TEIXEIRA, K. R. S. Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio. **Documento 32**, Embrapa, Seropédica: Rio de Janeiro, p. 27, 1997.

TEIXEIRA, K. R. S.; WULLING, M.; MORGAN, T.; GALLER, R.; ZELLERMANN, E. M.; BALDANI, J. I.; KENNEDY, C.; MELETZUS, D. Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 176, p. 301-309, 1999.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n.9, p.2233-2239, 1995.

TENOVER, F.C. et al. How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Washington, v.18, n.6, p.426-439, 1997.

TIMMERS, A.C.J.; AURIAC, M. C.; TRUCHET, G. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium*-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. **Development**, v. 126, p. 3617-3628, 1999.

TOKESHI, H. Modelo de agricultura sustentável suprimindo a necessidade de adubação nitrogenadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DIREITO AMBIENTAL. 13, 2008, São Paulo. **Anais Eletrônicos**. São Paulo: Instituto o Direito por um Planeta Verde, 2008. Disponível em:<[http://www.cpmo.org.br/artigos/Modelo\\_Agric\\_ustent\\_Tokeshi.pdf](http://www.cpmo.org.br/artigos/Modelo_Agric_ustent_Tokeshi.pdf)>. Acesso em: 12/11/2011.

TOLEDO, B. F. B. **Identificação de Estirpes de Rizóbios por Sequenciamento Parcial dos Genes 16S rDNA e nifH**. 127f. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal: São Paulo, 2008

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

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 10, n. 296, p.1064-1066, 2002.

TRIPLETT, E.W. **Prokaryotic nitrogen fixation – a model system for the analysis of a biological process**. Norfolk, UK: Horizon Scientific Press, 2000.

VAN BERKUM, P. & FUHRMANN, J.J. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally

transcribed spacer region sequence divergence. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.50, p.2165-2172,2000.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Cell Biology*, v. 5, p. 25-40, 1994.

VIDEIRA, S. S. Estudo da Comunidade de Bactérias Diazotróficas Associada a Plantas de Capim-Elefante. 105f. Tese de Doutorado – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-graduação em Agronomia, 2012.

VIEIRA, R. F. Diversidade e Taxonomia de Rizóbio. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Ed.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**, Campinas: Instituto Agrônomo, p. 165-192, 2007.

VINUESA, P.; LEÓN-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium genospecies* alpha and *Bradyrhizobium genospecies* beta. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.569–575,2005a.

VINUESA, P.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rRNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rRNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2096-2104, 1998.

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

WANG, G.; AAZAZ, A.; PENG, Z.; SHEN, P. Cloning and overexpression of atyrosinase gene mel from *Pseudomonas maltophilia*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 185, n. 1, p. 23-27, 2000.

WANG, L. L. WANG, E. T.; LIU, J.; LI, Y.; CHEN, W. X. Endophytic occupation of root nodules and roots of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Microbial Ecology**, v. 52, p. 436-443, 2006.

WEI, G. H.; WANG, E. T.; TAN, Z. T.; ZHU, M. E.; CHEN, W. X. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2231–2239, 2002.

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

WILLEMS A. The taxonomy of rhizobia: an overview. In: VELAZQUEZ, E.; BARRUECO, C. (Eds.). **First international meeting on microbial phosphate solubilization**. Berlin: Springer, 2007.

WILLEMS, A.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 305-313, 1993.

WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 623–632, 2001.

WILLEMS, A.; MUNIVE, A.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M. In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 203–210, 2003.

WISOTZJSEY, J. D.; JURTSCHUK-JUNIOR, P.; FOX, G. E.; DEINHARD, G.; PORALLA, K. Comparative Sequence Analyses on the 16s rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidothermus*, and *Bacillus cycloheptanicus* and Proposal for Creation of a New Genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 2, p. 263-269, 1992.

WUTKE, E. B. Adubação verde: manejo da fitomassa e espécies utilizadas no Estado de São Paulo. In: WUTKE, E. B.; BULISANI, E. A.; MASCARENHAS, H. A. A. **I Curso sobre adubação verde no Instituto Agrônomo**. Documentos 35, Instituto Agrônomo, Campinas, p. 17-29, 1993.

WOESE, C. The evolution of a science, p. 3-18, 1991. In: BALOWS, A., SCHLEIFER, K. H., TRUPER, H. G., DWORKIN, M. (ed.) **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications**. 2. edição. New York: Editora Springer-Verlag, 1992.

YANG, G. P.; DEBELLE, F.; SAVAGNAC, A.; FERRO, M.; SCHILTZ, O.; MAILLET, F.; PROMÉ, D.; TREILHOU, M.; VIALAS, C.; LINDSTROM, K.; DENARIE, J.; PROMÉ, J. C. Structure of the *Mesorhizobium huakuii* and *Rhizobium galegae* Nod factors: a cluster of phylogenetically related legumes are nodulated by rhizobia producing Nod factor with alpha, beta-unsaturated N-acyl substitutions. **Molecular Microbiology**, v. 34, p. 227-237, 1999.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of photosynthetic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 7, p. 2271-2277, 1991.

YOUNG, J. M.; PENNYCOOK, S. R.; WATSON, D. R. W. Proposal that *Agrobacterium radiobacter* has priority over *Agrobacterium tumefaciens*. Request for an Opinion. **Int. J. Syst. Evol. Microbiology**. v. 56, p. 491-493, 2006.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; IKEDA, A. C.; HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D.; KAVA-CORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **Szilagyi-Zecchin et al. AMB Express**. v. 4, n. 26, p. 1-9, 2014.

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

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes

de *Bradyrhizobium* isolados de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.

## ANEXO

**Tabela 7** –Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas de IRS 16S-23S rRNA pela reação de PCR de 22 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 10 estirpes controles.

<b>Isolados</b>	<b>Banda 1</b>	<b>Banda 2</b>	<b>Banda 3</b>	<b>Banda 4</b>	<b>Banda 5</b>	<b>Banda 6</b>	<b>Banda 7</b>
<b>48-9</b>	-	-	-	-	836	796	690
<b>48-11</b>	-	-	-	-	892	797	660
<b>48-15</b>	-	-	-	-	854	726	617
<b>48-16</b>	-	-	-	-	869	-	712
<b>48-25</b>	2711	1617	-	981	-	-	-
<b>48-26</b>	-	-	1341	956	866	737	646
<b>48-28</b>	2140	1809	1360	990	-	-	-
<b>48-32</b>	-	-	-	969	875	750	-
<b>58-5</b>	-	-	1360	1005	-	-	-
<b>58-9</b>	2852	-	-	1050	-	-	660
<b>62-1</b>	-	-	1281	934	-	-	697
<b>62-2</b>	-	-	-	955	857	-	707
<b>62-3</b>	-	-	1198	-	-	-	-
<b>62-4</b>	-	-	1289	935	-	-	701
<b>62-8</b>	-	-	-	-	-	782	-
<b>62-12</b>	-	1578	1281	914	-	727	-
<b>67-4</b>	-	-	1280	930	-	-	698
<b>67-5</b>	-	-	1234	917	-	-	678
<b>67-8</b>	-	1619	-	974	-	754	-
<b>67-9</b>	-	-	-	-	834	-	682
<b>67-15</b>	-	-	-	907	-	-	672

<b>72-7</b>	-	-	-	-	881	771	712
<b>SEMIA 4077</b>	8158	-	-	974	-	-	-
<b>SEMIA 4080</b>	4429	1635	-	-	-	-	-
<b>BR522</b>	-	-	-	1008	801	-	-
<b>SEMIA 6156</b>	-	1541	1129	987	-	-	-
<b>BR7606</b>	-	-	-	1019	-	-	-
<b>BR10055</b>	-	1510	1221	-	-	-	-
<b>SEMIA 135</b>	6793	-	-	930	-	741	-
<b>CFN42</b>	-	1510	1221	-	-	-	-
<b>SEMIA 6157</b>	-	-	1103	-	-	-	-
<b>Abv5</b>	-	-	-	1058	-	761	-

Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *R. galegae* (estirpe BR10055); *R. etli* (estirpe CFN42); *R. leguminosarum* (estirpe BR7606); *R. meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Mesorhizobium mediterraneum* (estirpe BR522); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5).-: Ausencia de fragmento/banda.

**Tabela 8** –Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas de REP pela reação de PCR de 24 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 11 estirpes controles.

Isolados	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Banda 8	Banda 9	Banda 10	Banda 11	Banda 12	Banda 13	Banda 14	Banda 15	Banda 16	Banda 17	Banda 18	Banda 19	Banda 20	Banda 21	Banda 22	Banda 23
48-9	-	-	-	2259	1836	-	-	1466	-	1244	-	986	-	-	-	614	-	-	430	-	-	-	-
48-11	-	-	-	-	1844	-	-	1465	-	1244	-	988	-	-	-	612	-	-	433	-	-	-	-
48-15	-	-	-	2400	1851	-	-	1465	-	1244	-	988	-	-	-	618	-	-	435	-	-	-	-
48-16	-	3517	-	-	1901	1789	-	-	1303	-	1011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48-25	5287	3131	-	-	1880	-	1660	1411	-	1255	1112	949	-	796	-	685	524	-	-	-	-	-	-
48-26	-	-	-	-	1935	-	1538	-	-	1277	1012	-	-	-	744	625	-	450	-	-	-	-	-
48-28	-	4286	-	-	-	-	-	1491	-	-	1138	-	854	-	-	-	-	-	-	-	355	-	-
48-32	-	-	-	2313	1901	-	1560	-	1312	-	1030	-	-	781	-	652,63	-	461	-	-	-	-	-
58-2	-	4925	2711	-	1933	-	1674	-	1363	1218	-	971	877	-	719	-	595	460	-	390	-	-	-
58-5	-	-	2711	2125	-	-	-	-	1393	1281	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10734	930	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62-1	-	-	-	-	-	1750	-	-	1380	-	1177	-	-	-	-	617	545	-	-	-	-	-	-
62-2	-	-	-	2191	-	-	1625	-	1335	-	1077	-	836	-	-	669	-	478	-	-	-	-	-
62-3	6237	3724	-	-	-	1730	-	-	1333	1209	1023	909	832	-	-	617	-	-	-	-	336	-	-
62-4	-	-	-	-	1807	-	-	1401	-	-	-	979	-	-	-	689	-	496	-	-	-	-	-
62-8	7186	3903	2603	2041	-	1792	1584	-	1310	-	-	915	800	-	747	631	573	-	418	-	354	-	-
62-12	-	-	-	-	-	-	1500	-	-	-	1011	916	-	-	-	-	546	-	-	-	-	-	-
67-4	-	4925	2711	-	1822	-	-	-	1303	-	-	-	844	-	705	-	-	-	-	377	-	-	-
67-5	6091	4365	-	2169	-	1756	-	-	-	1254	1082	924	832	-	712	637	-	-	-	370	-	-	-
67-8	7533	4698	2735	-	-	-	1660	1434	1310	-	1184	930	858	-	744	-	-	-	-	392	-	-	-
67-9	6694	3400	-	-	1968	-	-	-	1396	-	1039	-	-	-	-	-	-	488	-	391	-	-	-
67-15	-	4320	-	2429	-	-	1513	1426	-	1281	1000	-	821	-	709	625	559	-	-	-	365	-	-
72-7	-	4904	2993	2036	-	-	-	1451	1365	1228	-	994	898	-	705	606	546	451	401	-	-	-	267

<b>72-15</b>	6270	3757	-	-	-	-	1692	-	-	-	1194	975	875	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>SEMIA 4077</b>	6000	3000	-	-	1939	-	1521	-	1390	-	1105	-	862	783	724	-	-	-	416	378	337	305	273
<b>SEMIA 4080</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	1363	-	-	999	821	-	-	672	526	-	-	-	-	-	-
<b>BR522</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1189	-	-	-	-	-	519	-	-	-	-	319	-
<b>SEMIA 6145</b>	-	4904	2803	-	1947	1701	-	-	-	1299	-	997	-	-	-	670	546	-	-	-	-	-	287
<b>SEMIA 6156</b>	-	-	-	-	-	-	1671	1423	-	1243	-	-	-	-	-	684	548	-	-	-	-	-	-
<b>BR7606</b>	-	-	-	-	1929	1701	-	-	-	-	-	-	-	-	-	677	516	-	-	-	-	323	-
<b>BR10055</b>	-	4669	2635	-	-	-	1686	-	1300	1207	1000	-	-	-	-	684	551	-	-	-	-	-	299
<b>SEMIA 135</b>	-	-	-	-	-	-	-	1440	-	-	1172	970	862	-	-	-	508	-	-	377	-	-	-
<b>CFN42</b>	5048	-	2747	-	1992	-	1593	-	-	1280	1152	-	892	-	-	-	540	-	-	-	344	-	-
<b>IG</b>	-	4140	-	-	1878	1722	1583	1414	-	-	1061	-	875	790	-	-	-	-	-	393	351	310	280
<b>Abv5</b>	-	3000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	293

Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Mesorhizobium mediterraneum* (estirpe BR522); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145 e SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5).-: Ausencia de fragmento/banda.

**Tabela 9** – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas da região *nifHr* pela reação de PCR de 7 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 11 estirpes controles.

<b>Isolados</b>	<b>Banda 1</b>	<b>Banda 2</b>	<b>Banda 3</b>	<b>Banda 4</b>	<b>Banda 5</b>	<b>Banda 6</b>	<b>Banda 7</b>	<b>Banda 8</b>	<b>Banda 9</b>	<b>Banda 10</b>	<b>Banda 11</b>	<b>Banda 12</b>	<b>Banda 13</b>	<b>Banda 14</b>	<b>Banda 15</b>	<b>Banda 16</b>	<b>Banda 17</b>	<b>Banda 18</b>	<b>Banda 19</b>	<b>Banda 20</b>
<b>48-9</b>	-	459 5	-	-	-	-	-	-	133 6	120 7	-	97 2	84 3	-	-	-	-	-	-	-
<b>48-11</b>	-	459 5	-	-	-	-	-	-	135 5	120 7	-	97 2	84 8	-	-	-	-	-	-	-
<b>48-15</b>	-	437 0	-	-	-	-	-	-	136 5	121 6	-	99 4	84 3	-	-	-	-	-	-	-
<b>48-16</b>	575 9	-	-	-	-	-	-	-	-	120 7	-	98 9	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>48-25</b>	-	-	-	-	215 3	-	172 3	154 5	-	119 0	105 2	95 6	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>48-26</b>	-	483 2	-	-	-	-	-	-	136 5	122 5	-	98 3	85 8	-	-	-	-	-	-	-
<b>48-28</b>	-	-	307 6	-	236 1	-	-	154 5	138 5	-	103 7	-	86 8	-	-	55 7	-	-	-	-
<b>48-32</b>	-	448 1	315 4	-	-	-	157 6	-	136 5	121 6	-	99 4	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>58-9</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	94 5	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>62-2</b>	-	483 2	-	-	-	-	-	-	137 5	123 4	-	99 4	86 8	-	-	-	-	-	-	-
<b>67-9</b>	561 6	-	-	-	-	-	-	-	-	119 0	-	98 3	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SEMIA</b>	679	-	376	-	-	-	-	-	-	-	100	90	80	71	-	-	44	40	-	-



**Tabela 10** – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas da região *glnII* pela reação de PCR de 23 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 4 estirpes controles.

Isolados	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Banda 8	Banda 9	Banda 10	Banda 11
<b>48-9</b>	-	-	-	-	645	-	-	-	295	-	226
<b>48-11</b>	-	-	-	-	654	-	-	-	306	-	229
<b>48-15</b>	-	-	-	-	657	-	-	-	314	-	235
<b>48-16</b>	-	-	-	-	-	-	-	355	303	-	208
<b>48-25</b>	-	1434	-	-	684	-	-	-	326	-	-
<b>48-26</b>	-	-	-	-	657	-	-	-	324	-	246
<b>48-28</b>	2047	1373	-	-	691	-	446	357	-	-	-
<b>48-32</b>	2128	1338	-	-	681	-	-	-	331	255	-
<b>58-2</b>	-	-	-	-	669	-	413	-	-	-	244
<b>58-5</b>	-	-	-	-	675	-	-	-	-	-	-
<b>58-9</b>	-	-	-	-	672	-	-	-	-	-	-
<b>62-1</b>	-	-	-	-	697	-	-	-	344	267	-
<b>62-2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	326	281	-
<b>62-3</b>	-	-	906	-	691	-	-	-	-	-	-
<b>62-4</b>	-	1066	-	-	684	498	-	-	347	266	-
<b>62-8</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	171
<b>62-12</b>	-	-	-	-	657	498	448	-	-	-	237
<b>67-4</b>	-	-	-	-	645	-	-	-	-	-	-
<b>67-5</b>	-	-	909	760	672	-	424	-	-	-	-
<b>67-8</b>	-	-	-	-	678	542	435	-	-	-	-
<b>67-9</b>	-	-	-	-	691	-	-	-	344	-	234
<b>67-15</b>	-	-	-	781	650	-	-	-	-	-	-
<b>72-15</b>	-	-	961	768	-	-	-	-	-	-	-
<b>SEMIA 4080</b>	-	1510	923	738	-	-	-	-	-	-	-
<b>RM2001</b>	-	1497	-	759	-	-	-	-	-	-	-

<b>BR10055</b>	-	1463	-	753	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CFN42</b>	-	1444	-	744	-	-	-	-	-	-	-	-

Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135).-: Ausencia de fragmento/banda.

**Tabela 11** – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas da região *atpD* pela reação de PCR de 8 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 4 estirpes controles.

Isolados	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Banda 8	Banda 9	Banda 10	Banda 11	Banda 12
<b>48-9</b>	-	-	-	-	-	-	-	408	-	-	-	-
<b>48-11</b>	-	-	-	-	-	-	-	408	-	-	-	-
<b>48-15</b>	-	-	-	-	-	-	-	410	-	-	-	-
<b>48-16</b>	1399	1194	1038	883	745	-	580	467	382	304	-	-
<b>48-25</b>	-	-	-	-	-	-	523	-	-	-	-	-
<b>48-26</b>	-	-	-	-	-	-	-	414	-	-	-	-
<b>48-28</b>	-	1119	-	-	-	668	530	-	-	-	231	147
<b>48-32</b>	-	-	-	-	-	-	-	406	-	-	-	-
<b>BR522</b>	-	-	-	-	-	-	525	-	-	-	-	-
<b>SEMIA 6145</b>	-	-	-	-	-	-	515	-	-	-	-	-
<b>BR10055</b>	-	-	-	-	-	-	530	-	-	-	-	-
<b>CFN42</b>	-	-	-	-	-	-	574	-	-	-	-	-

Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145).-: Ausencia de fragmento/banda.

**Tabela 12** – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas da região *melA* pela reação de PCR de 15 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 5 estirpes controles.

Isolados	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5	Banda 6	Banda 7	Banda 8	Banda 9	Banda 10	Banda 11
<b>48-9</b>	-	-	-	-	-	846	-	-	-	-	295
<b>48-11</b>	-	-	-	-	999	808	-	611	-	364	-
<b>48-15</b>	-	-	-	-	-	809	-	607	-	-	-
<b>48-16</b>	-	-	1416	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>48-25</b>	-	-	-	1161	931	-	787	-	488	317	-
<b>48-26</b>	3000	-	-	-	987	813	-	607	-	375	-
<b>48-28</b>	-	1581	1320	1123	-	-	-	535	438	300	-
<b>48-32</b>	2547	1662	-	-	976	812	-	603	-	375	289
<b>58-5</b>	-	-	-	11705	-	-	-	-	438	-	289
<b>58-9</b>	-	-	-	11179	938	-	-	-	472	-	-
<b>62-2</b>	2391	1783	-	-	-	-	777	-	-	-	-
<b>62-3</b>	-	-	-	1127	-	-	733	-	433	-	-
<b>62-12</b>	-	1500	-	-	996	-	727	537	-	358	-
<b>67-5</b>	-	-	-	1089	-	-	-	691	420	-	-
<b>67-8</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	423	-	-
<b>SEMIA 4077</b>	-	-	-	1158	-	-	-	-	-	-	-
<b>SEMIA 4080</b>	-	-	-	-	-	-	-	629	446	376	-
<b>SEMIA 6156</b>	-	-	-	1122	-	867	-	-	453	-	-
<b>BR10055</b>	-	1812	-	1107	-	847	704	-	451	-	286
<b>CFN42</b>	2329	1800	-	1098	-	854	706	-	455	-	291

Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156). Marcadores moleculares: 1kb-DNA-Ladder e 100pb-DNA-Ladder. -: Ausencia de fragmento/banda.

**Tabela 13** – Peso molecular calculado, computacionalmente, dos fragmentos/bandas da restrição enzimática, pela *HaeIII*, do gene 16S rRNA pela reação de PCR de 18 isolados obtidos de nódulos de mucuna e 8 estirpes controles.

<b>Isolados</b>	<b>Banda1</b>	<b>Banda 2</b>	<b>Banda 3</b>	<b>Banda 4</b>	<b>Banda 5</b>	<b>Banda 6</b>	<b>Banda 7</b>	<b>Banda 8</b>	<b>Banda 9</b>	<b>Banda 10</b>
<b>48-9</b>									192	106
<b>48-11</b>			680	525		311		204		140
<b>48-15</b>			680	505			297	206		113
<b>48-16</b>								205		114
<b>48-25</b>					405				192	140
<b>48-26</b>					427			212	151	
<b>48-32</b>								215	133	109
<b>58-2</b>			716		493					
<b>58-5</b>				527					139	100
<b>62-1</b>			639		454		267			123
<b>62-4</b>			696		493	309				128
<b>62-8</b>	1315	1129	674		461					140
<b>62-12</b>			627		422			207		
<b>67-5</b>			645		462			243		125
<b>67-8</b>			735		494					
<b>67-9</b>							290			111
<b>67-15</b>			627		454	302				130
<b>72-7</b>			976	523		369	285			
<b>SEMIA 4077</b>					494	332		206		
<b>SEMIA 4080</b>				569			290	213	179	
<b>SEMIA 6145</b>				539			289	220	187	124
<b>SEMIA 6156</b>					482		274	238		
<b>BR7606</b>			673							
<b>BR10055</b>				542			285	223	190	129

<b>SEMIA 135</b>	1007	589	504	449	302		229		
<b>CFN42</b>		612					299	222	191 133
<b>IG</b>			510						
<b>Abv5</b>							299		

Estirpes controle: *Rhizobium tropici* (estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080); *Rhizobium galegae* (estirpe BR10055); *Rhizobium etli* (estirpe CFN42); *Rhizobium leguminosarum* (estirpe BR7606); *Rhizobium meliloti* (estirpe SEMIA 135); *Bradyrhizobium elkanii* (estirpe SEMIA 6156); *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6145 e SEMIA 6157); *Azospirillum brasilense* (estirpe Abv5).-: Ausencia de fragmento/banda.