

JOSIELE POLZIN DE OLIVEIRA-FRANCESQUINI

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, MOLECULAR E SIMBIÓTICA DE
RIZÓBIOS E BACTÉRIAS PRESENTES EM NÓDULOS DE FEIJOEIRO COMUM
(*Phaseolus vulgaris* L.) EM DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO**

**MORPHOPHYSIOLOGICAL, MOLECULAR AND SYMBIOTIC
CHARACTERIZATION OF RHIZOBIA AND BACTERIA PRESENT IN COMMON
BEAN NODULES (*Phaseolus vulgaris* L.) UNDER DIFFERENT CROPPING
SYSTEMS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lygia Vitória Galli Terasawa – Departamento de Genética – UFPR

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Mariângela Hungria – Empraba Soja

CURITIBA
2014

Ao meu marido, Junior, que me apoiou nos momentos difíceis.
À minha mãe, Marlis, que me incentivou constantemente.
Ao meu pai, Ires (*in memoriam*), que me ensinou todos os valores e acreditou na minha capacidade de superar os obstáculos e seguir em frente, que é o grande responsável pela minha formação pessoal e profissional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, à chefia do Departamento e aos seus professores, pela oportunidade e por participarem da minha formação.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Lygia Vitória Galli Terasawa, por todos os ensinamentos e, acima de tudo, pela amizade, compreensão e apoio no momento mais difícil da minha vida.

À minha co-orientadora Dr^a. Mariangela Hungria por todo o apoio técnico e científico.

Às Prof^a. Dr^a. Chirlei Glienke e Prof^a Dr^a Vanessa Kava Cordeiro, pelo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos membros da banca de defesa Dr. Renan Augusto Ribeiro, Dr^a. Josiane Aparecida Gomes Figueiredo, Dr^a. Vânia Aparecida Vicente, Dr^a. Chirlei Glienke e Dr^a. Juliana Zanetti Ribeiro.

Ao Prof. Juarez Gabardo, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Francisco Terasawa Junior, pelo espaço cedido para o cultivo das plantas de feijoeiro, que possibilitou o estabelecimento da coleção de bactérias.

À Capes e ao Cnpq pelo apoio financeiro.

Aos alunos e técnicos do LabGeM, pela colaboração de cada um durante a minha formação.

A todos os integrantes do Laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa Soja, em especial ao Renan e à Jakeline, pelo auxílio no sequenciamento, e ao Rinaldo e à Fernanda por tornarem possível o experimento na casa de vegetação.

Às amigas Angela e Vivian, pelas viagens e por toda a ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À amiga Lisandra, pela parceria em todos os momentos.

À amiga Juliana Marta, pelo constante apoio.

Ao meu marido, Junior, pela compreensão e incentivo nos momentos difíceis.

À minha mãe, Marlis, e ao meu irmão, Glaucio, pelo apoio e incentivo.

Um agradecimento especial ao meu pai, Ires (*in memoriam*), que não pode me acompanhar até o final dessa etapa, mas que sempre esteve e sempre vai estar me dando forças para continuar, de onde ele estiver.

“O que prevemos
raramente ocorre;
o que menos esperamos
geralmente acontece.”

Benjamin Disraeli

RESUMO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é capaz de estabelecer relações simbióticas com rizóbios, promovendo a fixação biológica do nitrogênio (FBN), além da associação com bactérias capazes de promover o crescimento vegetal. A caracterização genética e morfofisiológica desses microrganismos se constitui numa perspectiva capaz de contribuir para o incremento dos índices produtivos dessa cultura. A identificação de combinações eficientes entre bactérias e planta hospedeira permite a produção de inoculantes comerciais que visam a substituição eficaz dos fertilizantes químicos. O objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização morfofisiológica, molecular e simbiótica de bactérias presentes em nódulos radiculares de *P. vulgaris*. Para isso, foram avaliados 28 isolados de plantas cultivadas em campo e em casa de vegetação, derivadas de materiais provenientes dos centros de origem Andino e Mesoamericano. A classificação ao nível de gênero foi realizada por meio do sequenciamento parcial dos 16S rRNA, enquanto que a identificação ao nível de espécie foi obtida através do sequenciamento dos genes *housekeeping glnII*, *gyrB* e *recA*, para os isolados pertencentes ao gênero *Rhizobium*. Das bactérias analisadas, 10 foram classificadas como *Rhizobium* spp., e as demais foram distribuídas entre os gêneros *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. Não foi observada colonização preferencial de acordo com o centro de origem do feijoeiro. No entanto, o sistema de cultivo interferiu na capacidade de nodulação e colonização dos nódulos por diferentes bactérias. Entre os rizóbios, *R. miluonense* foi predominante em casa de vegetação, enquanto que bactérias dos grupos de *R. leguminosarum* e *R. radiobacter* prevaleceram em nódulos de plantas cultivadas em condições de campo. Considerando o grupo de *R. leguminosarum*, os isolados constituem uma nova espécie, que deve ser descrita. Por outro lado, as linhagens de referência utilizadas para *R. radiobacter* apresentaram resultados contrastantes na análise filogenética, indicando espécies diferentes. Para os isolados não classificados como *Rhizobium*, foram realizados os testes para produção de sideróforos e ácido indolacético (AIA), além da solubilização de fosfato inorgânico, a fim de avaliar a capacidade de promoção de crescimento vegetal. Dentre as 18 bactérias analisadas, 17 produziram sideróforos, apenas 6 solubilizaram fosfato e 10 produziram quantidade significativa de AIA. A eficiência simbiótica do grupo dos rizóbios foi avaliada em plantas de feijoeiro, enquanto que as demais bactérias foram coinoculadas com a linhagem padrão *R. freirei* PRF81^T, para verificar um possível sinergismo entre as mesmas. Em ambos os casos, o teor de nitrogênio nas plantas aumentou significativamente em alguns tratamentos, indicando o efeito altamente favorável decorrente desta associação. O isolado classificado como *R. miluonense* LGMB73 apresentou a melhor eficiência simbiótica, superior ao inoculante comercial, enquanto que a associação da linhagem padrão com LGMB5 (*Xanthomonas* sp.), LGMB67 (*Pseudomonas* sp2.), LGMB76 (*Pseudomonas* sp3.) e LGMB82 (*Pseudomonas* sp5.) mostrou-se favorável na FBN, pelos índices de nitrogênio superiores ao rizóbio presente no inoculante comercial. Além disso, LGMB67 e LGMB82 também apresentaram níveis de produção de AIA que contribuiu significativamente para o desenvolvimento vegetal.

Palavras-chave: feijoeiro comum. *Rhizobium*. Promoção de crescimento vegetal. Sistemas de cultivo. Classificação molecular.

ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is able to establish symbiotic relationships with rhizobia, promoting biological nitrogen fixation (BNF), in addition to association with bacteria that promote plant growth. Genetic and morphophysiological characterization of these microorganisms constitutes a perspective that can contribute to the yield increasing of this culture. Effective combinations detection of host plant and bacteria permits the production of powerful inoculants, able to replace chemical fertilizers. The aim of this work was perform the morphophysiological, molecular and symbiotic characterization of bacteria present in root nodules of *P. vulgaris*. In this view, we evaluated 28 isolates of plants grown in field and greenhouse conditions, derived from materials from Andean and Mesoamerican centers of origin. The classification at the genus level was performed by partial sequencing of 16S rRNA, while the identification to species level was obtained by sequencing of housekeeping genes *glnII*, *gyrB* and *recA*, for isolates belonging to the genus *Rhizobium*. From analyzed bacteria, 10 were classified as *Rhizobium* spp., and the remaining were distributed among *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas* genera. Preferential colonization according to the bean center of origin was not observed. However, the cropping system affected the nodulation and colonization ability from different bacteria. Among rhizobia, *R. miluonense* was predominant in the greenhouse, whereas bacteria from groups of *R. leguminosarum* and *R. radiobacter* prevailed in nodules of plants grown under field conditions. Considering the *R. leguminosarum* group, isolates represent a new species, to be described, while reference strains used for *R. radiobacter* showed contrasting results in the phylogenetic analysis, indicating different species. For the non-rhizobia isolates, tests for production of siderophores and indole acetic acid (IAA) were performed, in addition to inorganic phosphate solubilization, in order to assess the ability of promoting plant growth. Among the 18 bacteria analyzed, 17 produced siderophores, only 6 solubilized phosphate and 10 produced significant amount of IAA. The symbiotic effectiveness of rhizobia group was evaluated in bean plants, while other bacteria were co-inoculated with standard strain *R. freirei* PRF81^T, to verify a possible synergism between them. In both cases, the nitrogen content in plants increased significantly in some treatments, indicating highly favorable effect resulting from this association. The isolated classified as *R. miluonense* LGMB73 presented the best symbiotic efficiency, superior to commercial inoculant, while the combination of the standard strain with LGMB5 (*Xanthomonas* sp.), LGMB67 (*Pseudomonas* sp2.), LGMB76 (*Pseudomonas* sp3.) and LGMB82 (*Pseudomonas* sp5.) was favorable in the FBN, with higher rates of nitrogen, compared to the use of rhizobia isolated. Moreover, LGMB67 and LGMB82 also showed significant production of IAA, contributing to plant growth.

Key-words: common bean. *Rhizobium*. Plant growth promotion. Cropping systems. Molecular classification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

| | | |
|------------|---|----|
| Quadro 1 - | ISOLADOS ANALISADOS NESTE ESTUDO..... | 18 |
| Quadro 2 - | PRIMERS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>nifH</i> E PARA O SEQUENCIAMENTO DO 16S rRNA E MLSA..... | 20 |
| Quadro 3 - | CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE PCR UTILIZADAS NA ANÁLISE DE MLSA. | 21 |
| Quadro 4 - | LINHAGENS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA..... | 22 |
| Figura 1 - | ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DO 16S rRNA DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA INFERÊNCIA BAYESIANA E GTR (<i>GENERAL TIME-REVERSIBLE</i>) COMO MODELO EVOLUTIVO..... | 26 |
| Figura 2 - | ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>glnII</i> DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA INFERÊNCIA BAYESIANA E GTR (<i>GENERAL TIME-REVERSIBLE</i>) COMO MODELO EVOLUTIVO..... | 28 |
| Quadro 5 - | NÚMERO DE SEQUÊNCIAS E INFORMAÇÃO FILOGENÉTICA DOS LOCI ANALISADOS..... | 28 |
| Figura 3 - | ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>recA</i> DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA INFERÊNCIA BAYESIANA E GTR (<i>GENERAL TIME-REVERSIBLE</i>) COMO MODELO EVOLUTIVO..... | 29 |
| Figura 4 - | ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>gyrB</i> DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA INFERÊNCIA BAYESIANA E GTR (<i>GENERAL TIME-REVERSIBLE</i>) COMO MODELO EVOLUTIVO..... | 30 |
| Figura 5 - | ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS CONCATENADAS DOS GENES <i>HOUSEKEEPING glnII, gyrB</i> E <i>recA</i> DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA INFERÊNCIA BAYESIANA E GTR (<i>GENERAL TIME-REVERSIBLE</i>) COMO MODELO EVOLUTIVO..... | 31 |
| Figura 6 - | DESEMPENHO DE PLANTAS INOCULADAS COM <i>R. radiobacter</i> LGMB9 (a) e <i>Rhizobium</i> sp2. (b), COMPARADO COM O PADRÃO COMERCIAL <i>R. freirei</i> PRF81 ^T | 33 |
| Figura 7 - | DESEMPENHO DE PLANTAS INOCULADAS COM <i>R. miluonense</i> LGMB73, COMPARADO COM O PADRÃO COMERCIAL <i>R. freirei</i> PRF81 ^T | 36 |

CAPÍTULO 2

| | | |
|------------|---|----|
| Quadro 1 - | ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA UTILIZADOS NESTE ESTUDO..... | 52 |
| Quadro 2 - | PRIMERS UTILIZADOS PARA O SEQUENCIAMENTO DO 16S rRNA..... | 53 |
| Figura 1 - | ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DO 16S rRNA DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA E KIMURA-2-PARÂMETROS COMO MODELO EVOLUTIVO..... | 58 |

APÊNDICE

MATERIAL E MÉTODOS

| | | |
|------------|---|----|
| Quadro 1 - | <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA ANÁLISE DE MLSA..... | 91 |
| Quadro 2 - | CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADAS NA ANÁLISE DE MLSA..... | 91 |
| Quadro 3 - | <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA O SEQUENCIAMENTO TOTAL DO GENE 16S rRNA..... | 92 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | DESENVOLVIMENTO DOS ISOLADOS EM CONDIÇÕES ADVERSAS E RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA (TEOR DE NITROGÊNIO E N TOTAL DA PARTE AÉREA, NÚMERO DE NÓDULOS, MASSA SECA DA RAIZ, DOS NÓDULOS E DA PARTE AÉREA DAS PLANTAS INOCULADAS COM <i>Rhizobium</i> spp.)..... | 24 |
|------------|--|----|

CAPÍTULO 2

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, DESENVOLVIMENTO EM CONDIÇÕES ADVERSAS E TESTES BIOQUÍMICOS PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS..... | 55 |
| Tabela 2 - | TEOR DE NITROGÊNIO E N TOTAL DA PARTE AÉREA, NÚMERO DE NÓDULOS, MASSA SECA DA RAIZ, DOS NÓDULOS E DA PARTE AÉREA DAS PLANTAS COINOCULADAS COM OS ISOLADOS UTILIZADOS NESSE ESTUDO E <i>R. freirei</i> PRF81 ^T | 59 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2. CAPÍTULO 1 – Influência do sistema de cultivo na capacidade nodulatória do feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) por <i>Rhizobium</i> spp..... | 14 |
| Resumo | 14 |
| Introdução | 15 |
| Material e métodos | 18 |
| <i>Seleção dos isolados</i> | 18 |
| <i>Caracterização morfofisiológica</i> | 19 |
| <i>Caracterização genética</i> | 19 |
| <i>Eficiência simbiótica em plantas cultivadas em casa de vegetação</i> | 22 |
| Resultados | 23 |
| <i>Caracterização morfofisiológica, fixação do nitrogênio e eficiência simbiótica dos isolados</i> | 23 |
| <i>Análise filogenética</i> | 24 |
| Discussão | 31 |
| <i>Condições experimentais</i> | 31 |
| <i>Análise filogenética</i> | 33 |
| Referências | 37 |
| 3. CAPÍTULO 2 – Ocupação natural e classificação de diferentes gêneros em nódulos radiculares de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) avaliados em dois sistemas de cultivo..... | 47 |
| Resumo | 47 |
| Introdução | 48 |
| Material e métodos | 51 |
| <i>Seleção dos isolados</i> | 51 |
| <i>Caracterização morfofisiológica</i> | 51 |
| <i>Testes bioquímicos para avaliação da capacidade de promoção de crescimento em plantas</i> | 52 |
| <i>Caracterização genética</i> | 53 |
| <i>Eficiência simbiótica em plantas cultivadas em casa de vegetação</i> | 54 |
| Resultados | 55 |
| <i>Caracterização genética, morfofisiológica e promoção de crescimento</i> | 55 |
| <i>Análise filogenética</i> | 56 |
| <i>Eficiência simbiótica em plantas cultivadas em casa de vegetação</i> | 57 |
| Discussão | 59 |
| Referências | 64 |
| 4. DISCUSSÃO GERAL..... | 72 |
| 5. CONCLUSÕES GERAIS..... | 74 |
| Referências | 75 |
| APÊNDICE | 78 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 78 |
| Meios de cultura..... | 78 |
| Soluções e reagentes..... | 80 |
| Avaliação do crescimento dos isolados em condições adversas..... | 86 |
| Extração de DNA genômico dos isolados..... | 86 |

| | |
|--|-----------|
| Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA..... | 87 |
| Amplificação de genes simbióticos – <i>nifH</i> | 89 |
| Testes bioquímicos para avaliação da capacidade de promoção de crescimento em plantas..... | 89 |
| Análise de MLSA (<i>Multilocus Sequence Analysis</i>) e sequenciamento total do gene 16S rRNA..... | 91 |
| Referências | 92 |

1. INTRODUÇÃO

Grande importância é atribuída ao consumo de feijão na alimentação humana, visto que é uma importante fonte de proteína na dieta, sobretudo nos países em desenvolvimento de regiões tropicais e subtropicais. Considerando somente o gênero *Phaseolus*, o Brasil é o seu maior produtor mundial, e embora seja cultivado em vastas áreas, atinge baixos níveis de produtividade média. Isto resulta do fato de grande parte da produção estar ligada a pequenas e médias propriedades, que utilizam baixo nível tecnológico.

A associação do feijoeiro com bactérias do grupo dos rizóbios, capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-lo à cultura, é uma tecnologia capaz de substituir, pelo menos parcialmente, a adubação nitrogenada resultando em benefícios ao pequeno produtor. O nitrogênio (N) é um dos nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas, fornecido predominantemente para as culturas por meio da adubação com uréia, sulfato de amônia, esterco ou outras formulações do tipo NPK. No entanto, sendo 78% do ar atmosférico composto por N, este elemento pode ser captado e fornecido às plantas pela Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), realizada principalmente por bactérias do grupo dos rizóbios.

Além dos rizóbios, outras bactérias podem associar-se às plantas, exercendo diversos efeitos sobre o seu hospedeiro, dentre eles a promoção de crescimento. Estes organismos são classificados como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR – *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) e atuam de diferentes maneiras. Algumas destas formas de atuação são a produção de fitormônios, a produção de sideróforos e a solubilização de fosfatos presentes no solo.

A inoculação com bactérias do grupo dos rizóbios se constitui numa perspectiva capaz de contribuir para o incremento dos índices produtivos da cultura do feijoeiro. Para isso, faz-se necessário o conhecimento da diversidade genética destas bactérias de modo que a identificação de combinações simbióticas mais eficientes com a planta hospedeira permita a produção de inoculantes comerciais de qualidade, na substituição de fertilizantes nitrogenados. Desta forma, os custos de produção são reduzidos, tornando o feijão um alimento ainda mais acessível a populações de baixa renda. Além disso, a exploração do potencial de PGPR na

agricultura abre novas perspectivas para a redução no uso dos insumos químicos dentro do enfoque de uma agricultura orientada para o uso racional dos recursos naturais que visa à preservação do meio ambiente. Esta perspectiva faz com que agricultores que atuam em pequenas áreas possam fazer uso de um pacote tecnológico completo, mais econômico e com menor impacto ambiental, desfrutando de resultados efetivamente satisfatórios da produção da cultura.

Considerando a diversidade genética bacteriana e o efeito seletivo do sistema de cultivo, uma coleção composta de isolados de nódulos radiculares de feijoeiro comum foi avaliada. O objetivo deste trabalho foi verificar tanto a influência do sistema de cultivo quanto do centro de origem da planta hospederia sobre a diversidade genética dessas bactérias. Também foi analisada sua atuação na promoção de crescimento em plantas, para identificar a possível sinalização de uma combinação eficiente entre a planta hospedeira e os microssimbiontes, sejam eles fixadores de nitrogênio e/ou demais PGPR. A análise foi realizada em função dos sistemas de cultivo a campo e em casa de vegetação, e dos centros de origem do feijoeiro, Andino e Mesoamericano. As bactérias foram caracterizadas morfofisiológica e geneticamente, foi verificada a presença do gene *nifH*, importante no processo de fixação biológica do nitrogênio, assim como a eficiência simbiótica dos isolados em plantas de *P. vulgaris*, avaliados isoladamente ou em associação com uma linhagem de *Rhizobium* utilizada como inoculante comercial.

2. CAPÍTULO 1

Influência do sistema de cultivo na capacidade nodulatória do feijoeiro comum (Phaseolus vulgaris L.) por Rhizobium spp.

Resumo

A capacidade de nodulação preferencial por rizóbios em diferentes sistemas de cultivo foi avaliada a partir de isolados de nódulos radiculares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em campo e em casa de vegetação, derivados dos centros de origem Andino e Mesoamericano. Essa análise foi realizada com o objetivo de caracterizar bactérias do gênero *Rhizobium* associadas ao feijoeiro quanto a sua morfofisiologia, identificação molecular e eficiência simbiótica. A caracterização genética de dez isolados foi realizada a partir de sequências do gene 16S rRNA e dos genes *housekeeping glnII*, *gyrB* e *recA*. A eficiência simbiótica foi avaliada através da análise do número (nº/pl) e massa de nódulos (mg/pl), massa da raiz (g/pl) e da parte aérea (g/pl), teor de nitrogênio (mg/g), além da presença do gene *nifH*. Em contraste aos centros de origem, foi observada influência do ambiente no processo de infecção e colonização dos nódulos por diferentes espécies, sendo *R. miluonense* dominante em condições de casa de vegetação e bactérias do grupo de *R. leguminosarum* em campo. Os isolados classificados como *R. miluonense* apresentaram o melhor desempenho na eficiência simbiótica, o que não era esperado, pois esta espécie foi descrita como capaz de formar somente nódulos ineficientes em *P. vulgaris*. *R. miluonense* LGMB73 apresentou o maior teor de nitrogênio na parte aérea (77,7 mg/pl), com índice superior ao padrão comercial (56,9 mg/pl), mostrando-se o isolado mais promissor para a produção de inoculantes. Os isolados de campo LGMB10, LGMB40, LGMB41, LGMB58 e LGMB61 pertencentes ao grupo de *R. leguminosarum* formam um grupo isolado da linhagem tipo *R. leguminosarum* USDA230^T nas árvores filogenéticas dos genes *housekeeping* estudados. Por esta razão, este grupo deve ser descrito como uma nova espécie. A presença de *R. radiobacter* (LGMB9) também foi observada entre os isolados do experimento a campo, sendo que os mesmos apresentaram baixa

eficiência simbiótica, com apenas 5,7 mg de N por planta. No mesmo grupo, LGMB26 apresentou nodulação expressiva e similaridade com *Rhizobium* sp2. C58, sugerindo avaliação quanto a espécie a que pertencem.

Palavras chave: *Phaseolus vulgaris*, sistema de cultivo, MLSA, classificação molecular, *Rhizobium miluonense*

Introdução

O Brasil lidera a produção mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), com cerca de 3,5 milhões de toneladas por ano. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, esta leguminosa é um típico produto da alimentação brasileira, cultivada por pequenos e grandes produtores em todas as regiões e corresponde à principal fonte de proteína da dieta da população de baixa renda (MAPA, 2012a). No entanto, a produtividade na safra 2013/14 foi de apenas 1049 kg/ha (CONAB, 2014), em função das flutuações nas condições climáticas durante o desenvolvimento da cultura. Segundo projeções realizadas pelo MAPA (2012b), a importação deste alimento deverá sofrer um aumento gradativo nos próximos anos.

Uma das características do feijoeiro é a possibilidade de estabelecer relações simbióticas com rizóbios, estabelecendo o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Por apresentarem ampla distribuição geográfica e história de coevolução com a planta hospedeira (GRAHAM; VANCE, 2000; AGUILAR; RIVA, PELTZER, 2004), estudos sobre a diversidade e caracterização genética dos microssimbiontes do feijoeiro desempenham um importante papel no desenvolvimento de estratégias de aumento da contribuição da FBN na agricultura mundial. É importante ressaltar que, tanto a origem da planta hospedeira, quanto as condições de cultivo, interferem na organização da diversidade de rizóbios associados à cultura (ALBERTON; KASCHUK; HUNGRIA, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A espécie dominante de microssimbiontes do feijoeiro, tanto no centro de diversidade Mesoamericano, quanto no Andino é *Rhizobium etli* (SEGOVIA; YOUNG; MARTÍNEZ-ROMERO, 1993; SOUZA *et al.*, 1994; BERNAL; GRAHAM, 2001; MARTÍNEZ-ROMERO, 2003; AGUILAR; RIVA; PELTZER, 2004). No entanto, estudos

demonstraram que linhagens do grupo *R. tropici* são dominantes em várias avaliações a campo no Brasil, possivelmente devido a sua capacidade em estabelecer simbiose efetiva em condições de alta temperatura e baixo pH, predominantes no país (HUNGRIA; VARGAS, 2000; HUNGRIA *et al.*; 2000b; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007). Linhagens desse grupo apresentam, também, alta competitividade e estabilidade genética (PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007). É interessante observar, porém, que a predominância de *R. tropici* em nódulos de feijoeiro a campo no Brasil não é observada em algumas condições controladas, por exemplo, em casa de vegetação, utilizando como inóculo solo diluído, quando *R. etli* passa a ser o maior colonizador (GRANGE; HUNGRIA, 2004). Tais variações foram confirmadas em estudos realizados por Alberton; Kaschuk; Hungria (2006) e Oliveira *et al.* (2011), que evidenciaram uma clara diferença entre as concentrações de rizóbios encontrados em condições de campo e rizóbios encontrados em diluições de solo.

Alguns estudos têm revelado a existência de novas espécies capazes de nodular o feijoeiro, algumas delas anteriormente classificadas em outras espécies. Algumas linhagens de *R. etli*, por exemplo, foram reclassificadas como *R. phaseoli* (LÓPEZ-GUERRERO *et al.*, 2012b). Essas duas espécies, juntamente com *R. leguminosarum* e outras estreitamente relacionadas, formam um grupo com pequenas diferenças genéticas baseadas na análise do gene que transcreve a subunidade 16S do rRNA. Outro grupo é formado por *R. tropici*, *R. leucaenae*, *R. freirei* e demais espécies relacionadas, que são dominantes nos solos brasileiros (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991; RIBEIRO *et al.*, 2012; DALL'AGNOL *et al.*, 2013) constituindo o chamado "grupo *R. tropici*" (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2012a). Além disso, essas três espécies também são encontradas como simbiontes naturais de outros legumes, como *Leucaena leucocephala*, *Mimosa caesalpiniiifolia* e *Gliricidia sepium* (MERCANTE *et al.*, 1998; MENNA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2012; DALL'AGNOL *et al.*, 2013). Um terceiro grupo a ser considerado é formado por *R. radiobacter* e demais espécies relacionadas que, originalmente, foram descritas como pertencentes ao gênero *Agrobacterium* e reclassificadas como *Rhizobium* por Young *et al.* (2001). Linhagens estreitamente relacionadas a *Agrobacterium* já foram descritas como simbiontes de feijoeiro (MHAMDI *et al.*, 2005; LÓPEZ-GUERRERO *et al.* 2012a; ORMEÑO-ORRILLO *et al.* 2012b).

Em procariotos, a caracterização da sequência do gene ribossomal 16S rRNA é amplamente utilizada em estudos evolucionários, taxonômicos e ecológicos, por ser uma região altamente conservada (KWON *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; WILLEMS, 2006). Mas alguns estudos demonstraram que recombinação genética e transferência horizontal de genes podem ocorrer também com o 16S rRNA, além de ser insuficiente para a classificação taxonômica precisa de espécies estreitamente relacionadas devido a sua alta conservação, sugerindo a utilização de outros marcadores, em conjunto com o mesmo (van BERKUM *et al.*, 2003; GEVERS *et al.*, 2005). Com base nessas observações, outros genes têm sido propostos para a realização de análises filogenéticas. Para isso, são utilizados genes com taxa de evolução mais alta que o 16S rRNA, porém, conservados o suficiente para manter as informações genéticas para uma classificação taxonômica (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; STEPKOWSKI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005; MARTENS *et al.*, 2007). Alguns exemplos são os genes *recA*, *dnaK*, *gltA*, *glnII*, *rpoA*, *pheS*, *rpoB* e *atpA* (DRANCOURT *et al.*, 2004; NASER *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2009). Dentre os requisitos para a seleção dessas sequências, devem ser considerados a ampla distribuição dentro de um táxon, assim como estarem presentes em cópia única no genoma (STACKEBRANDT *et al.*, 2002; ZEIGLER, 2003; GEVERS *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2005). Portanto, para a realização de análises filogenéticas, múltiplas sequências codificantes têm sido utilizadas (MLSA, *Multilocus Sequencing Analysis*) para alguns gêneros, dentre eles *Burkholderia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Mycobacterium*, *Ensifer* e para os diversos gêneros de rizóbios, dentre eles os grupos de *R. etli/R. leguminosarum* e *R. tropici/R. leucaenae/R. freirei* (GEVERS *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2005; THOMPSON; SWINGS, 2006; MARTENS *et al.*, 2007; MARTENS *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009, 2012; DEGEFU; WOLDE-MESKEL; FROSTEGARD, 2011; KAWAGUCHI, 2011; LU *et al.*, 2011; LARANJO; YOUNG; OLIVEIRA, 2012; LÓPEZ-GUERRERO *et al.*, 2012b; DALL'AGNOL *et al.*, 2013) reduzindo, assim, a possibilidade de ambiguidades causadas por recombinação genética e seleção específica.

Para avaliar a diversidade genética de microssimbiontes do feijoeiro em função de diferentes sistemas de cultivo e do centro de origem da planta, o presente trabalho caracterizou morfofisiológica e geneticamente bactérias isoladas de nódulos radiculares de feijoeiro, derivados de materiais provenientes dos centros de origem Andino e Mesoamericano, submetidos a cultivo em campo e em casa de vegetação.

Também foram avaliadas a presença do gene *nifH*, importante no processo de fixação biológica do nitrogênio, assim como a eficiência simbiótica dos isolados em plantas de *P. vulgaris*.

Material e métodos

Seleção dos isolados

Foram avaliados dez isolados de uma coleção de bactérias estabelecida por Oliveira *et al.* (2011), a partir de nódulos radiculares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). A seleção foi realizada de modo a representar as condições experimentais de campo e casa de vegetação, além dos centros de origem andino e mesoamericano da planta hospedeira (QUADRO 1).

Os isolados são mantidos em meio de cultura YM líquido (VINCENT, 1970), contendo glicerol (50%) e armazenados a -20°C. As culturas em uso são mantidas em tubos contendo meio YMA (VINCENT, 1970), acrescido de azul de bromotimol como indicador de pH e armazenadas a 4°C.

| Isolado | Centro de Origem | Sistema de Cultivo | Código de acesso no GenBank | | | |
|------------------------------------|------------------|--------------------|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|
| | | | 16S rRNA | <i>gyrB</i> | <i>recA</i> | <i>glnII</i> |
| <i>Rhizobium radiobacter</i> LGMB9 | Mesoamericano | Campo | KF962988 | KF963008 | KF963018 | KF962998 |
| <i>Rhizobium</i> sp1. LGMB10 | Mesoamericano | Campo | KF962989 | KF963009 | KF963019 | KF962999 |
| <i>Rhizobium</i> sp2. LGMB26 | Andino | Campo | KF962990 | KF963010 | KF963020 | KF963000 |
| <i>Rhizobium</i> sp1. LGMB40 | Andino | Campo | KF962991 | KF963011 | KF963021 | KF963001 |
| <i>Rhizobium</i> sp1. LGMB41 | Andino | Campo | KF962992 | KF963012 | KF963022 | KF963002 |
| <i>Rhizobium</i> sp1. LGMB58 | Mesoamericano | Campo | KF962993 | KF963013 | KF963023 | KF963003 |
| <i>Rhizobium</i> sp1. LGMB61 | Mesoamericano | Campo | KF962994 | KF963014 | KF963024 | KF963004 |
| <i>R. miluonense</i> LGMB73 | Andino | Casa de vegetação | KF962995 | KF963015 | KF963025 | KF963005 |
| <i>R. miluonense</i> LGMB88 | Mesoamericano | Casa de vegetação | KF962996 | KF963016 | KF963026 | KF963006 |
| <i>R. miluonense</i> LGMB95 | Mesoamericano | Casa de vegetação | KF962997 | KF963017 | KF963027 | KF963007 |

QUADRO 1 – ISOLADOS ANALISADOS NESTE ESTUDO

Caracterização morfofisiológica

A morfologia da colônia (tamanho, cor, mucosidade, transparência, bordas e elevação) e a alteração de pH do meio foram determinadas após 3 a 5 dias de crescimento a 28°C em meio YMA (VINCENT, 1970) contendo azul de bromotimol. Além disso, o crescimento dos isolados foi avaliado nos meios LB (BERTANI, 1951) e PY-Ca (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), assim como em TY (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994) a 40°C, e TY modificado para pH 4,0 (HUNGRIA *et al.*, 2000a). Todas as avaliações foram realizadas em triplicata.

Caracterização genética

Amplificação do gene nifH

O DNA dos isolados foi extraído como descrito por Kaschuk *et al.* (2006), e amplificado por PCR com os *primers* nifHF e nifHI, originando um fragmento de 780 pares de bases (QUADRO 2). A reação foi realizada para verificar a presença do gene que codifica uma das subunidades (*nifH*) da nitrogenase, enzima envolvida no processo de fixação biológica do nitrogênio. Cada reação continha, em 25 µL: dNTPs (300 mM de cada); tampão de PCR (Tris-base 20 mM, pH 8.4 e KCl 50 mM); *primers* (15 pmol de cada); Taq DNA polimerase (1.0 U); e DNA (20 ng). As condições da reação foram realizadas de acordo com Grange *et al.* (2007). Os produtos de amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% (p/v), contendo marcador de massa “Low DNA Mass Ladder” Invitrogen® e corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com aparato Kodak Digital Science 120.

Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para a amplificação da região do DNA que codifica o 16S rRNA foram utilizados os *primers* fD1 e rD1 (QUADRO 2). Cada reação continha, em 50 µL: dNTPs (300 mM de cada); tampão de PCR (Tris-base 20 mM, pH 8.4 e KCl 50 mM); *primers* (15 pmol de cada); Taq DNA polimerase (1.0 U); e DNA (50 ng). As condições das reações foram realizadas de acordo com Menna *et al.* (2006). Os

produtos foram purificados por precipitação do DNA com acetato de amônio (4 µL a 7,5 M) e etanol absoluto (60 µL) e, para a reação de sequenciamento, cada amostra continha, em 10µL: 80 ng do produto de PCR purificado, 3 µL de dye (DYEnamic ET terminator reagent premix for the Mega-BACE, Amersham Biosciences®) e 3 pmol de *primer* (foi realizada uma reação para cada um dos *primers*: fD1, Y2, 362f, 786f e 1203f – QUADRO 2). O programa utilizado para amplificação foi: 35 ciclos de 30 s a 94°C, 15 s a 50°C e 90 s a 60°C, sendo que o produto foi precipitado por acetato de amônio e etanol para purificação do DNA. As amostras foram submetidas à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE Amersham Biosciences®. Em seguida, as sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com sequências existentes no RDP (*Ribosomal Database Project*)(COLE *et al.*, 2009). De acordo com o resultado do alinhamento foram selecionadas as sequências de linhagens de referência para a análise filogenética.

| Gene | Primer | Sequência (5' – 3') | Referência |
|--------------|-----------|----------------------------|---------------------------------|
| 16S rRNA | nifHF | TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA | LAGUERRE <i>et al.</i> , 2001 |
| | nifHI | AGCATGTCTCSAGYTCNTCCA | LAGUERRE <i>et al.</i> , 2001 |
| | fD1 | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | WEISBURG <i>et al.</i> , 1991 |
| | Y2 | CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT | YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991 |
| | 362f | CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG | MENNA <i>et al.</i> , 2006 |
| | 786f | CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG | MENNA <i>et al.</i> , 2006 |
| | 1203f | GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC | MENNA <i>et al.</i> , 2006 |
| | rD1 | AAGGAGGTGATCCAGCC | WEISBURG <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>gyrB</i> | gyrB343F | TTCGACCAGAAAYTCCTAYAAGG | MARTENS <i>et al.</i> , 2008 |
| | gyrB1043R | AGCTTGTCCTTSGTCTGCG | MARTENS <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>recA</i> | recA6F | CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA | GAUNT <i>et al.</i> , 2001 |
| | recA555R | CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT | GAUNT <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>glnII</i> | TSglnII | AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG | STEPKOWSKI <i>et al.</i> , 2005 |
| | TSglnIIr | SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCC | STEPKOWSKI <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>rpoA</i> | RRrpoAf | GGAAATCGCCATCAAGATGG | RIBEIRO <i>et al.</i> , 2009 |
| | RRrpoAr | ACGCTTGGCGAGATCTTC | RIBEIRO <i>et al.</i> , 2009 |

QUADRO 2 – PRIMERS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE *nifH* E PARA O SEQUENCIAMENTO DO 16S rRNA E MLSA

Multilocus sequence analysis (MLSA)

Para a análise de multilocus, foram utilizados os seguintes genes *housekeeping*: *gyrB* (DNA girase subunidade B), *recA* (proteína recombinase A) e *glnII* (glutamina sintase II), sendo que os *primers* utilizados e condições das reações estão descritos nos QUADROS 2 e 3. Considerando o cromossomo de *Rhizobium etli* (4.381.608 pb) os genes complementares estão posicionados como descritos a seguir (direção 5'- 3'): *gyrB* (8.271), *recA* (2.422.674) e *glnII* (3.250.540). Os reagentes para a reação de PCR contendo o DNA genômico e para a reação de

sequenciamento contendo o produto de PCR purificado foram utilizados como descrito para o gene 16S rRNA, utilizando os mesmos primers da reação de PCR para cada gene.

| Gene | Condições | Referência |
|--------------|--|---------------------------------|
| <i>gyrB</i> | 5 min a 95°C, 5x(2 min a 94°C, 2 min a 58°C, 1 min a 72°C), 28x(30 s a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C), 5 min a 72°C | MARTENS <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>recA</i> | 5 min a 95°C, 30x(45 s a 94°C, 1 min a 55°C, 90 s a 74°C), 5 min a 72°C | GAUNT <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>glnII</i> | 2 min a 95°C, 35x(45 s a 95°C, 30s a 58°C, 90 s a 72°C), 7 min a 72°C | STEPKOWSKI <i>et al.</i> , 2005 |

QUADRO 3 – CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE PCR UTILIZADAS NA ANÁLISE DE MLSA

Análise Filogenética

Para a construção da árvore filogenética, as sequências obtidas foram alinhadas com sequências de linhagens de referência obtidas no banco de dados GenBank (BENSON *et al.*, 2005), sendo que as linhagens tipo foram determinadas a partir do banco de dados StrainInfo (DAWYNDDT *et al.*, 2005)(QUADRO 4). O alinhamento das sequências foi realizado no MAFFT versão 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) e sua edição no programa MEGA 5.1 (TAMURA *et al.*, 2011), onde suas extremidades foram cortadas, mantendo o mesmo tamanho do fragmento para todas as sequências. No mesmo *software* foi definido o melhor modelo evolutivo para o conjunto de dados. Para a análise filogenética foram realizados a Inferência Bayesiana, utilizando o MrBayes versão 3.2 (RONQUIST *et al.*, 2012), e o método da Máxima Verossimilhança, utilizando o GARLI Web Service (<http://www.molecularevolution.org/software/phylogenetics/garli>), com 2000 amostragens na análise de bootstrap para suporte estatístico. Os resultados foram visualizados no FigTree versão 1.3.1.

Para cada gene foram utilizadas as referências descritas anteriormente, sendo que *Mesorhizobium huakuii* foi utilizado como grupo externo. Para a análise dos genes concatenados foram utilizadas somente as linhagens de referência para as quais estão disponíveis as sequências de todos os genes avaliados neste estudo.

| Linhagem | Hospedeiro | Código de acesso no GenBank | | | | Referência |
|--|------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------------------------------|
| | | 16S rDNA | <i>gyrB</i> | <i>recA</i> | <i>glnII</i> | |
| <i>R. tropici</i> CIAT899 ^T | <i>P. vulgaris</i> | U89832 | AM418836 | EU488815 | EU488791 | MARTÍNEZ-ROMERO <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>R. miluonense</i> CCBAU41251 ^T | <i>Lespedeza chinensis</i> | EF061096 | KC293527 | HM047131 | HM047120 | GU <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. multihospitium</i> CCBAU83401 ^T | <i>Robinia pseudoacacia</i> | EF035074 | KC293528 | EF490029 | EF490040 | HAN <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. hainanense</i> I66 ^T | <i>Desmodium sinuatum</i> | U71078 | HQ438236 | HQ394252 | GU726294 | CHEN <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>R. lusitanum</i> P1/7 ^T | <i>P. vulgaris</i> | AY738130 | KC293525 | DQ431674 | EF639841 | VALVERDE <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>R. leucaenae</i> CFN299 ^T | <i>P. vulgaris</i> | X67234 | KC293524 | EU488817 | EU488777 | RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>R. rhizogenes</i> ATCC11325 ^T | <i>Malus domestica</i> | AY945955 | AM418833 | AM182126 | FJ816281 | YOUNG <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>R. selenitireducens</i> B1 ^T | Biorreator | EF440185 | AB685478 | GU559877 | AB685476 | HUNTER; KUYKENDALL, 2007 |
| <i>R. etli</i> CFN42 ^T | <i>P. vulgaris</i> | CP000133 | CP000133 | CP000133 | CP000133 | QUINTO <i>et al.</i> , 1982 |
| <i>R. leguminosarum</i> WSM2304 | <i>Trifolium polymorphum</i> | CP001191 | CP001191 | CP001191 | CP001191 | REEVE <i>et al.</i> , 2010b |
| <i>R. leguminosarum</i> WSM1325 | <i>Trifolium pratense</i> | CP001622 | CP001622 | CP001622 | CP001622 | REEVE <i>et al.</i> , 2010a |
| <i>R. leguminosarum</i> 3841 | <i>Pisum sativum</i> | 115254414 | 115254414 | 115254414 | 115254414 | YOUNG <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>R. leguminosarum</i> USDA2370 ^T | <i>Pisum sativum</i> | U29386 | AM418830 | AJ294376 | AF169586 | RAMÍREZ-BAHENA <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. pisi</i> DSM30132 ^T | <i>Pisum sativum</i> | AY509899 | JQ795183 | DQ431676 | JN580715 | RAMÍREZ-BAHENA <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. phaseoli</i> ATCC14482 ^T | <i>Phaseolus vulgaris</i> | EF141340 | JN580716 | EF113136 | JN580716 | RAMÍREZ-BAHENA <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. phaseoli</i> CIAT652 | <i>P. vulgaris</i> | CP001074 | CP001074 | CP001074 | CP001074 | URIBE, 1993 |
| <i>R. leguminosarum</i> USDA2671 | <i>P. vulgaris</i> | U29388 | KC293526 | EU488811 | EU488784 | van BERKUM; BEYENE; EARDLY, 1996 |
| <i>R. fabae</i> CCBAU33202 ^T | <i>Vicia faba</i> | DQ835306 | KC293523 | EF579940 | EF579935 | TIAN <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. gallicum</i> R602 ^T | <i>P. vulgaris</i> | U86343 | AM418828 | EU488823 | EU488785 | AMARGER; MACHERET; LAGUERRE, 1997 |
| <i>R. rhizogenes</i> K84 | Solo | CP000628 | CP000628 | CP000628 | CP000628 | KERR, 1972 |
| <i>R. radiobacter</i> ATCC19358 ^T | Solo | AJ389904 | FR695243 | FM164311 | JN580718 | YOUNG <i>et al.</i> ; 2001 |
| <i>Rhizobium</i> sp. H13-3 | Solo | CP002248 | CP002248 | CP002248 | CP002248 | WIBBERG <i>et al.</i> ; 2011 |
| <i>Mesorhizobium huakuii</i> CCBAU2609 ^T | <i>Astragalus sinicus</i> | FJ491264 | 47118328 | 47118328 | 47118328 | CHEN <i>et al.</i> , 1991 |

QUADRO 4 – LINHAGENS DE REFERÊNCIA UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA

Eficiência simbiótica em plantas cultivadas em casa de vegetação

As sementes de *P. vulgaris* (cultivar BRS Estilo) foram desinfestadas utilizando álcool, hipoclorito de sódio a 10% e água purificada autoclavada. Foram plantadas em vasos de Leonard contendo areia e vermiculita (1:2) esterilizados (VINCENT, 1970), e solução nutritiva livre de nitrogênio (BROUGHTON;

DILWORTH, 1971). Quatro sementes foram semeadas por vaso, cada uma inoculada com 0,5 mL da cultura de bactérias, sendo realizado um desbaste para manutenção de duas plantas por vaso após 5 dias de plantio. O experimento foi montado utilizando delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo que foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento. Os tratamentos foram: a) controle sem inóculo e sem aplicação de nitrogênio; b) controle inoculado com *R. freirei* PRF81^T e c) plantas inoculadas com as linhagens a serem avaliadas. As bactérias foram cultivadas por 48 horas em frascos contendo 10 mL de meio YM (VINCENT, 1970), sob agitação (100 rpm) e temperatura de 28°C. A concentração de células foi verificada em espectrofotômetro e a densidade ótica foi padronizada em 0,5. Após 35 dias de desenvolvimento, foram avaliados por planta: número de nódulos (nº/pl); massa seca de nódulos (mg/pl); massa seca da raiz (g/pl); massa seca da parte aérea (g/pl), teor de nitrogênio (mg/g) e N total da parte aérea (mg/pl), sendo que o teor de N foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa Assistat versão 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009). Para ajustar a normalidade dos dados, como exigência deste teste paramétrico, os valores obtidos foram transformados utilizando-se a fórmula $\sqrt{(x+0,5)}$.

Resultados

Caracterização morfofisiológica, fixação do nitrogênio e eficiência simbiótica dos isolados

A amplificação do gene *nifH*, os resultados de crescimento bacteriano em condições adversas, e os resultados das avaliações do experimento de eficiência simbiótica estão representados na TABELA 1. Considerando as diferentes condições de crescimento, os isolados provenientes de campo (C) apresentaram melhor adaptação. Por outro lado, as bactérias isoladas de nódulos de plantas cultivadas em casa de vegetação (CV) foram mais eficientes na nodulação e desenvolvimento da planta. Além disso, apresentaram as maiores concentrações de nitrogênio na parte aérea, sendo que essa resposta também foi obtida pelo isolado de campo LGMB61. Ainda, os isolados estudados apresentaram características morfológicas

condizentes com rizóbios e acidificação do meio YMA, característica de rizóbios de crescimento rápido.

| Isolado | Condições adversas | | | | nifH | Eficiência simbiótica | | | | | |
|--|--------------------|-----------|------------|-----------------|------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
| | LB | PY- Ca | TY 40°C | TY pH 4,0 | | Número nódulos (n°/pl) | Massa nódulos (mg/pl) | Massa raiz (g/pl) | Massa aérea (g/pl) | Nitrogênio (mg/g) | N total (mg/pl) |
| LGMB9 (C) <i>R. radiobacter</i> | + | + | + | - | - | 0,00 ^e | 0,00 ^d | 0,505 ^{abc} | 0,46 ^c | 12,673 ^e | 5,752 ^d |
| LGMB10 (C) <i>Rhizobium</i> sp1. | - | - | - | + | + | 2,50 ^e | 1,85 ^d | 0,459 ^{bc} | 0,43 ^c | 13,545 ^e | 5,762 ^d |
| LGMB26 (C) <i>Rhizobium</i> sp2. | + | + | - | - | - | 237,25 ^{abcd} | 142,08 ^{bcd} | 0,444 ^{bc} | 1,07 ^{abc} | 31,580 ^b | 33,638 ^{bc} |
| LGMB40 (C) <i>Rhizobium</i> sp1. | + | + | - | + | + | 122,00 ^{bcde} | 53,85 ^d | 0,424 ^c | 0,34 ^c | 18,119 ^d | 6,172 ^d |
| LGMB41 (C) <i>Rhizobium</i> sp1. | + | + | - | + | + | 119,25 ^{cde} | 114,33 ^{cd} | 0,475 ^{abc} | 0,46 ^c | 35,974 ^{ab} | 17,042 ^{cd} |
| LGMB58 (C) <i>Rhizobium</i> sp1. | - | - | - | - | + | 73,50 ^{de} | 54,98 ^d | 0,456 ^{bc} | 0,61 ^{bc} | 26,409 ^c | 15,941 ^{cd} |
| LGMB61 (C) <i>Rhizobium</i> sp1. | - | - | - | - | + | 326,00 ^{abc} | 254,43 ^{abc} | 0,630 ^{ab} | 1,49 ^{ab} | 39,736 ^a | 58,944 ^{ab} |
| LGMB73 (CV) <i>R. miluonense</i> | - | - | - | - | + | 358,00 ^a | 295,90 ^{ab} | 0,577 ^{abc} | 1,98 ^a | 39,400 ^a | 77,716 ^a |
| LGMB88 (CV) <i>R. miluonense</i> | - | + | - | + | + | 357,00 ^a | 297,30 ^a | 0,651 ^a | 1,86 ^a | 37,047 ^a | 69,310 ^{ab} |
| LGMB95 (CV) <i>R. miluonense</i> | - | + | - | - | + | 343,75 ^{ab} | 308,65 ^a | 0,574 ^{abc} | 1,57 ^a | 37,982 ^a | 59,258 ^{ab} |
| Controle sem inóculo | NA | NA | NA | NA | NA | 0,00 ^e | 0,00 ^d | 0,433 ^c | 0,39 ^c | 25,186 ^c | 11,627 ^{cd} |
| <i>R. freirei</i> PRF81^T | NA | NA | NA | NA | NA | 356,25 ^a | 283,80 ^{ab} | 0,502 ^{abc} | 1,57 ^a | 36,008 ^{ab} | 56,894 ^{ab} |

TABELA 1 –DESENVOLVIMENTO DOS ISOLADOS EM CONDIÇÕES ADVERSAS E RESULTADOS DO EXPERIMENTO DE EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA (TEOR DE NITROGÊNIO E N TOTAL DA PARTE AÉREA, NÚMERO DE NÓDULOS, MASSA SECA DA RAIZ, DOS NÓDULOS E DA PARTE AÉREA DAS PLANTAS INOCULADAS COM *Rhizobium* spp.)

NOTA: -) não cresceu; +) cresceu; NA) não avaliado. Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Análise filogenética

Considerando todos os isolados, os três genes *housekeeping* e o gene ribossomal 16S rRNA apresentaram agrupamentos de acordo com o sistema de cultivo em que as bactérias foram obtidas, sendo que os resultados foram semelhantes para os dois métodos de reconstrução filogenética utilizados. Bactérias isoladas do experimento a campo apresentaram similaridade com linhagens dos grupos de *R. leguminosarum* (cinco isolados) ou *R. radiobacter* (dois isolados), enquanto que os três isolados de casa de vegetação agruparam com *R. miluonense*. No entanto, não apresentaram diferenças entre os centros de origem da cultivar utilizada.

Gene 16S rRNA

A árvore filogenética baseada no gene 16S rRNA, com 1033 pb que foram alinhadas para todas as linhagens, está apresentada na FIGURA 1. As três linhagens isoladas do experimento em casa de vegetação estão posicionadas no grupo de *R. tropici*, sendo que a espécie mais próxima é *R. miluonense*, cujo hospedeiro principal é *Lespedeza* (GU *et al.*, 2008). Por outro lado, os isolados provenientes do experimento de campo aparecem em dois grupos diferentes, sendo cinco no grupo de *R. leguminosarum* e dois no grupo de *R. radiobacter*, antes denominado *Agrobacterium tumefaciens* (YOUNG *et al.*, 2001).

A similaridade dos isolados de casa de vegetação com *R. miluonense* variou de 99,9 a 100%, enquanto que, entre os isolados de campo, os que agruparam com *R. leguminosarum* apresentaram similaridade entre 99,8 e 100% com as linhagens *R. leguminosarum* bv. phaseoli USDA2671, *R. leguminosarum* bv. trifolii WSM1325 e *R. leguminosarum* bv. trifolii WSM2340. Quanto aos demais isolados de campo, LGMB9 apresentou 99,9% de similaridade com *R. radiobacter* ATCC19358^T, enquanto que a sequência do gene 16S rRNA de LGMB26 é 100% similar à sequência extraída do genoma completo de *Rhizobium* sp2. C58.

Genes housekeeping

As árvores filogenéticas geradas a partir de cada gene utilizado na análise de multilocus apresentaram os mesmos agrupamentos dos isolados com os grupos de linhagens de referência, todos com forte suporte estatístico (FIGURAS 2 a 4). Além disso, foi analisada a quantidade de informação filogenética associada a cada gene, através do cálculo do número e porcentagem dos sítios variáveis e de parcimônia informativa (QUADRO 5). O gene que apresentou maior porcentagem de sítios de parcimônia informativa foi o *gyrB*, com 204 caracteres (49,3%), sendo o *glnII* o menos informativo, com 137 caracteres (31,3%).

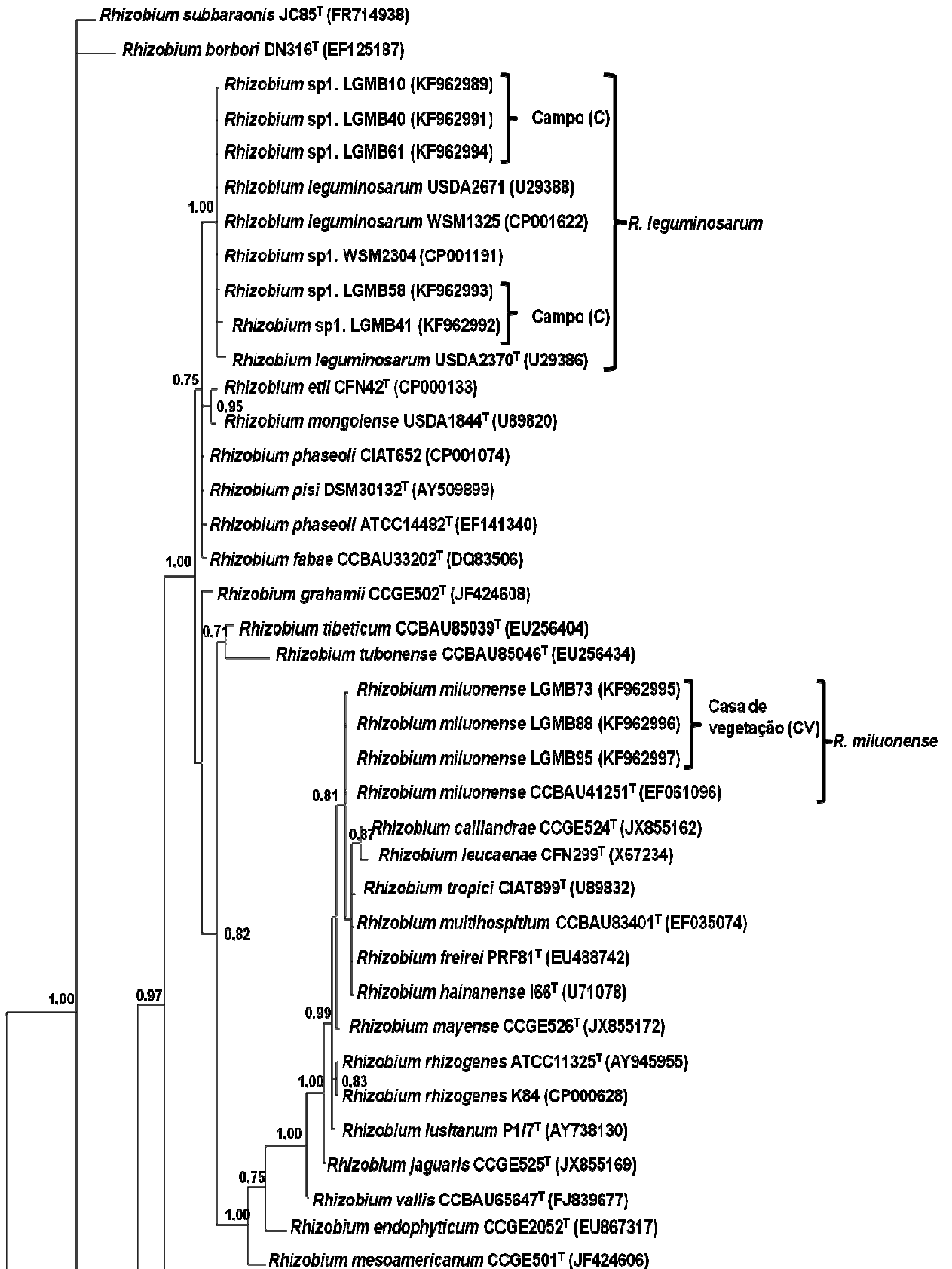


FIGURA 1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DO 16S rRNA DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA INFERÊNCIA BAYESIANA E GTR (GENERAL TIME-REVERSIBLE) COMO MODELO EVOLUTIVO (O CÓDIGO DE ACESSO NO GENBANK ESTÁ ENTRE PARÊNTESES)(continua)

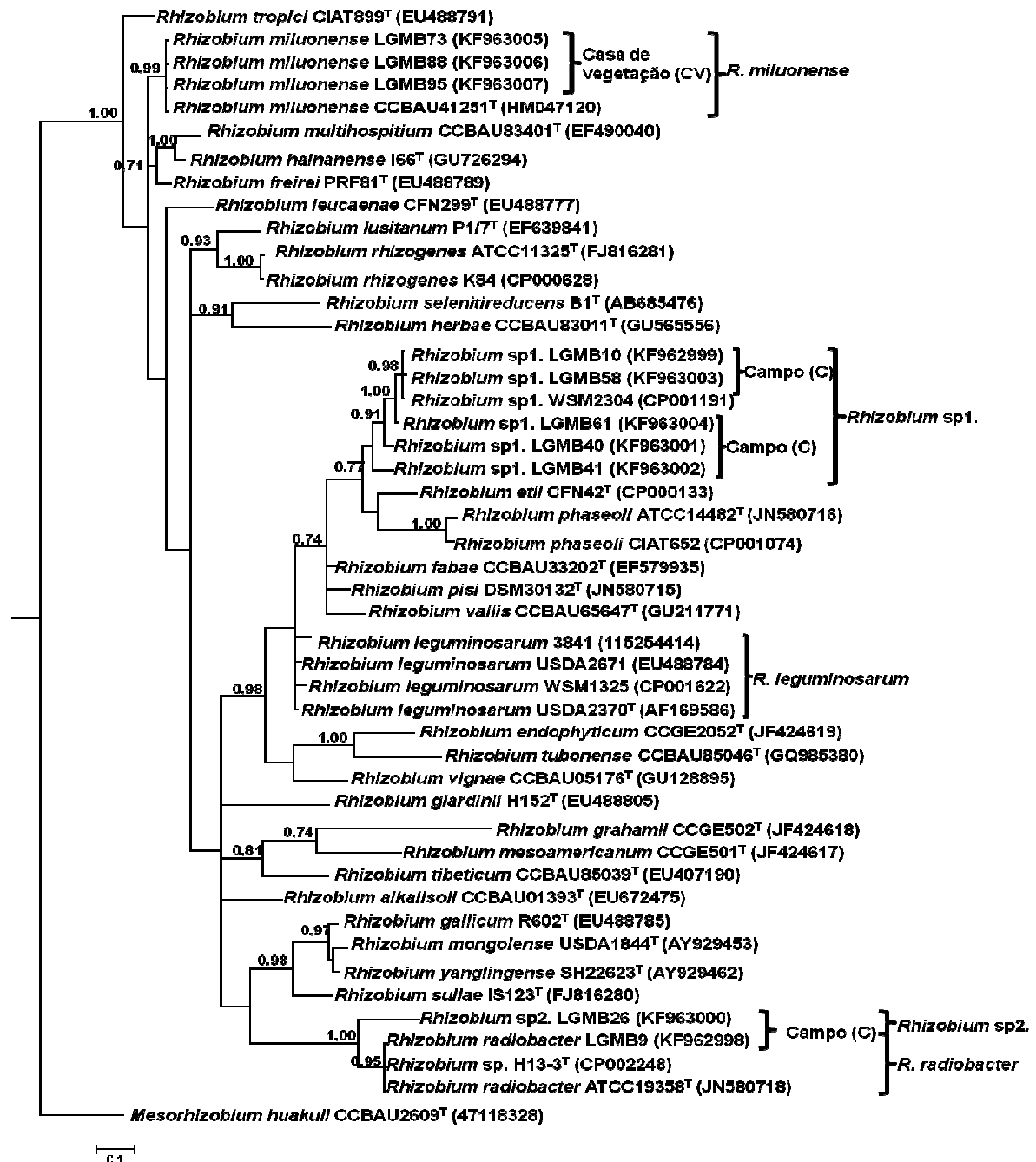


FIGURA 2 – ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DO GENE *glnII* DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA INFERÊNCIA BAYESIANA E GTR (GENERAL TIME-REVERSIBLE) COMO MODELO EVOLUTIVO (O CÓDIGO DE ACESSO NO GENBANK ESTÁ ENTRE PARÊNTESES)

| Locus | Linhagens analisadas | Número de nucleotídeos (Porcentagem) | | | Total |
|--------------------|----------------------|--------------------------------------|------------|------------------------|-------|
| | | Conservados | Variáveis | Parcimônia informativa | |
| 16S rRNA | 75 | 891 (86,3) | 142 (13,7) | 112 (10,8) | 1033 |
| <i>GlnII</i> | 47 | 279 (63,7) | 159 (36,3) | 137 (31,3) | 438 |
| <i>GyrB</i> | 46 | 169 (40,8) | 245 (59,2) | 204 (49,3) | 414 |
| <i>RecA</i> | 65 | 186 (57,4) | 138 (42,6) | 118 (36,4) | 324 |
| Genes concatenados | 33 | 715 (60,8) | 461 (39,2) | 357 (30,4) | 1176 |

QUADRO 5 – NÚMERO DE SEQUÊNCIAS E INFORMAÇÃO FILOGENÉTICA DOS LOCI ANALISADOS

NOTA: Alinhamento concatenado de *glnII* (438 nt), *gyrB* (414 nt) e *recA* (324 nt)

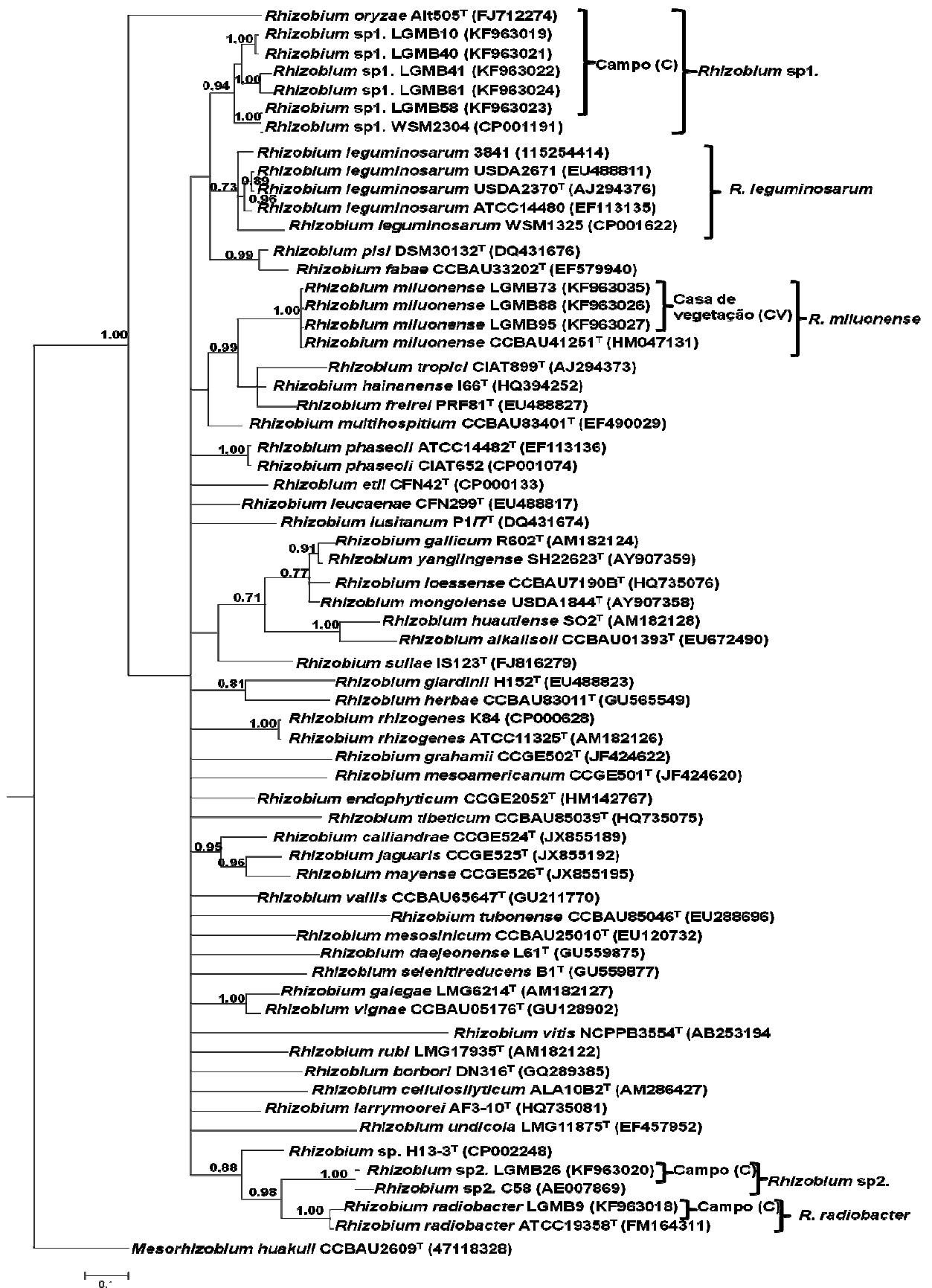


FIGURA 3 – ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DO GENE *recA* DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA INFERÊNCIA BAYESIANA E GTR (*GENERAL TIME-REVERSIBLE*) COMO MODELO EVOLUTIVO (O CÓDIGO DE ACESSO NO GENBANK ESTÁ ENTRE PARÊNTESES)

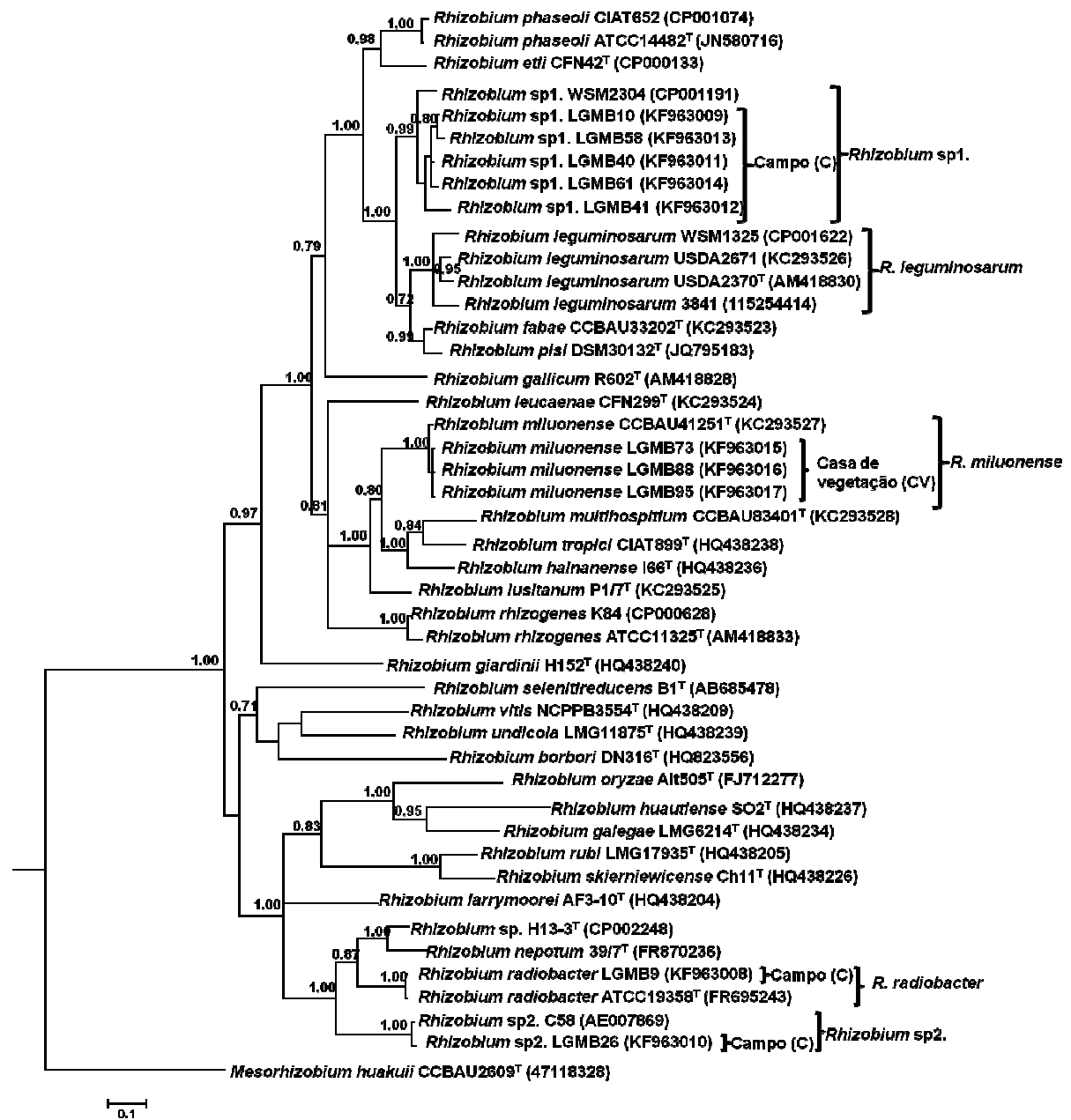


FIGURA 4 – ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DO GENE *gyrB* DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA INFERÊNCIA BAYESIANA E GTR (*GENERAL TIME-REVERSIBLE*) COMO MODELO EVOLUTIVO (O CÓDIGO DE ACESSO NO GENBANK ESTÁ ENTRE PARÊNTESES)

Assim como na análise do 16S rRNA e dos genes *housekeeping*, a análise dos genes concatenados (FIGURA 5) mostrou o agrupamento de todos os isolados de casa de vegetação com *R. miluonense* CCBAU41251^T, com altas similaridades (99,8%) e forte suporte estatístico (100%), enquanto que os isolados de campo (exceto LGMB9 e LGMB26) estão no clado do grupo de *R. leguminosarum*, apresentando 96,0 a 99,1% de similaridade com *Rhizobium* sp1. WSM2304. Os isolados LGMB9 (C) e LGMB26 (C) estão localizados no ramo de *R. radiobacter*,

também com 100% de probabilidade na Inferência Bayesiana, sendo que o primeiro apresentou 99,7% de similaridade com *R. radiobacter* ATCC19358^T e o último está posicionado no mesmo clado, mas agrupa com a linhagem *Rhizobium* sp2. C58 na análise dos genes avaliados isoladamente, com exceção do *glnII*, que não foi anotado no genoma completo desta linhagem, não sendo possível incluir a mesma na análise concatenada dos genes.

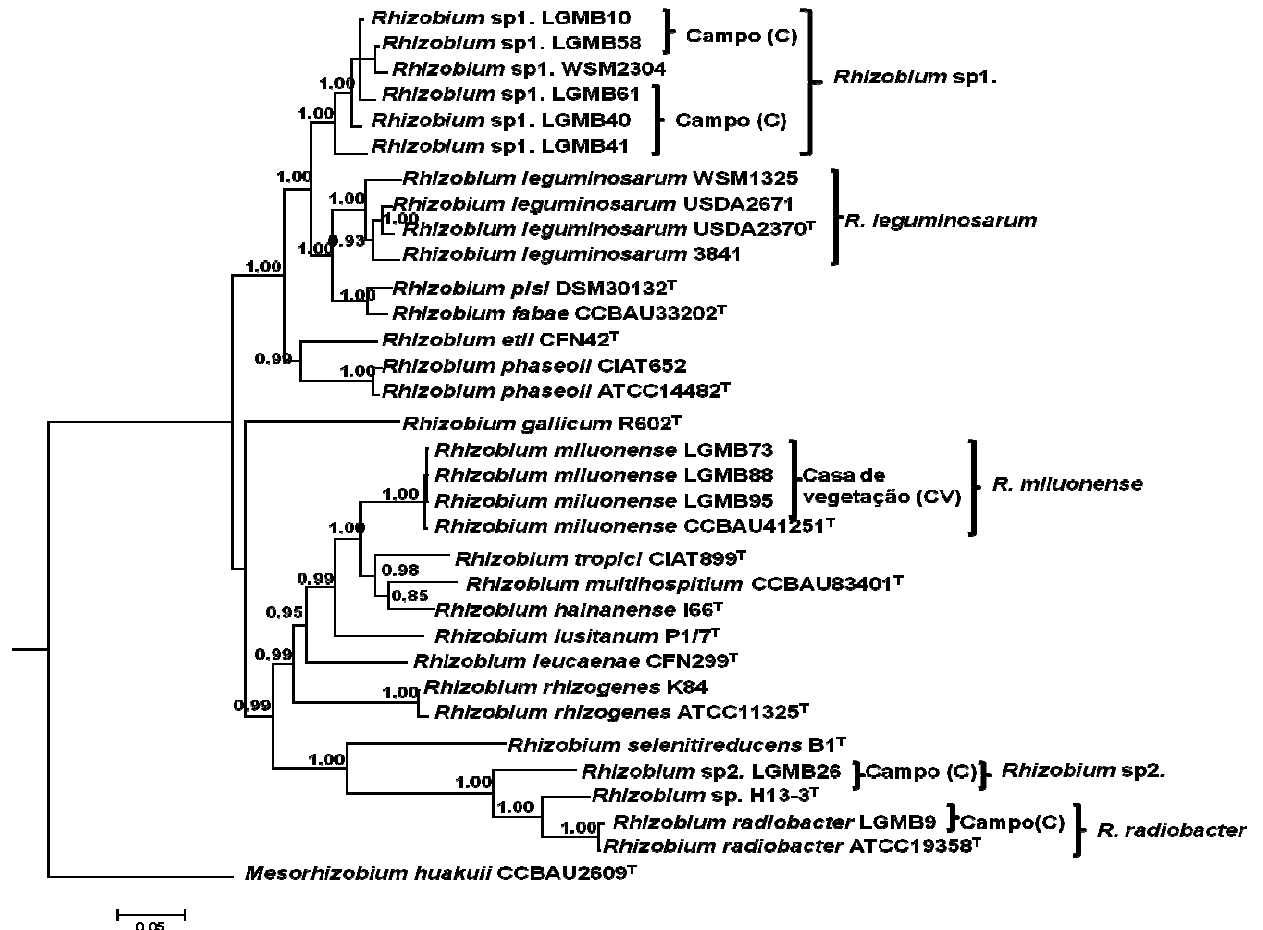


FIGURA 5 – ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS CONCATENADAS DOS GENES *HOUSEKEEPING* *glnII*, *gyrB* E *recA* DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA INFERÊNCIA BAYESIANA E GTR (*GENERAL TIME-REVERSIBLE*) COMO MODELO EVOLUTIVO

Discussão

Condições experimentais

No presente trabalho, o estudo de MLSA foi realizado com isolados de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* L., representativos de diferentes condições experimentais e diferentes centros de origem do feijoeiro. Com base nos

resultados apresentados constatou-se que, no processo de nodulação e colonização, não houve predominância de uma espécie bacteriana de acordo com o centro de origem da planta hospedeira. Por outro lado, observou-se que plantas cultivadas em campo e em casa de vegetação estabelecem o processo de simbiose com isolados apresentando diferentes características genéticas. Analisando a diversidade genética através de elementos repetitivos do genoma (REP-PCR), Alberton; Kaschuk; Hungria (2006) e Oliveira *et al.* (2011) também constataram diferenças na capacidade de colonização de acordo com o sistema de cultivo utilizado.

De uma forma geral, elementos responsáveis pela competitividade de espécies do gênero *Rhizobium* estão presentes em plasmídeos, que podem ser perdidos dependendo das condições ambientais onde as linhagens se encontram (LÓPEZ-GUERRERO *et al.*, 2012a). Dentre as principais diferenças entre os dois sistemas de cultivo estão a temperatura, o pH do solo ou solução nutritiva na qual as plantas foram cultivadas, e a concentração de bactérias, visto que, em casa de vegetação, as plantas foram inoculadas com o mesmo solo em que foram cultivadas a campo, porém nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} . De acordo com Lauber *et al.* (2009), o pH intracelular bacteriano normalmente aproxima-se do neutro, portanto, nas condições mais ácidas dos solos tropicais as células sofrem um processo de adaptação devido ao estresse provocado. No entanto, a capacidade de adaptação é mais facilmente perdida do que adquirida. Neste estudo, foi observada maior diversidade em condições de campo devido a este processo, onde as bactérias presentes no solo estudado (ácido) já estão adaptadas às condições estressantes. Por outro lado, quando o solo foi usado como inóculo em plantas cultivadas em solução com pH neutro, apenas as linhagens mais competitivas formaram nódulos (HUNGRIA *et al.*, 2000a; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003; GRANGE; HUNGRIA, 2004). Além disso, a quantidade de células bacterianas presentes no solo diluído é reduzida, favorecendo a nodulação por linhagens mais competitivas. Resultado semelhante foi observado por Oliveira *et al.* (2011), em que a diversidade genética, avaliada por BOX-PCR, foi reduzida com a diluição do solo, passando a haver predominância das linhagens com maior capacidade de nodulação.

Neste estudo, a competitividade dos isolados em condições de casa de vegetação foi confirmada no experimento que avaliou sua eficiência simbiótica, onde as bactérias classificadas como *R. miluonense* apresentaram os maiores índices de

nodulação, assim como concentração de nitrogênio na parte aérea da planta (TABELA 1). Além disso, com exceção do teor de N, os resultados foram semelhantes aos encontrados para o controle positivo, onde as plantas foram inoculadas com a linhagem comercial *R. freirei* PRF81^T. Com relação à concentração de N, os índices foram maiores entre os isolados de casa de vegetação (LGMB73, LGMB88 e LGMB95), além do isolado de campo LGMB61, quando comparadas ao padrão comercial. Esses dados demonstram uma possível transferência do plasmídeo responsável pela nodulação e fixação de nitrogênio para *R. miluonense*, visto que esta espécie foi isolada de *Lespedeza chinensis* e a linhagem tipo (CCBAU41252^T) forma apenas nódulos ineficientes em *P. vulgaris* (GU *et al.*, 2008). Ainda, com exceção de LGMB61 (C), todos os isolados classificados como *Rhizobium* sp1., *Rhizobium* sp2. e *R. radiobacter* apresentaram pouca nodulação e baixo desenvolvimento das plantas, confirmando a baixa capacidade de fixar nitrogênio de bactérias provenientes de plantas cultivadas a campo. Além disso, LGMB9 (C) e LGMB26 (C), classificados no grupo de *R. radiobacter*, não amplificaram o gene *nifH*, que codifica umas das subunidades de uma enzima envolvida no processo de fixação biológica de nitrogênio, a nitrogenase (FIGURA 6).

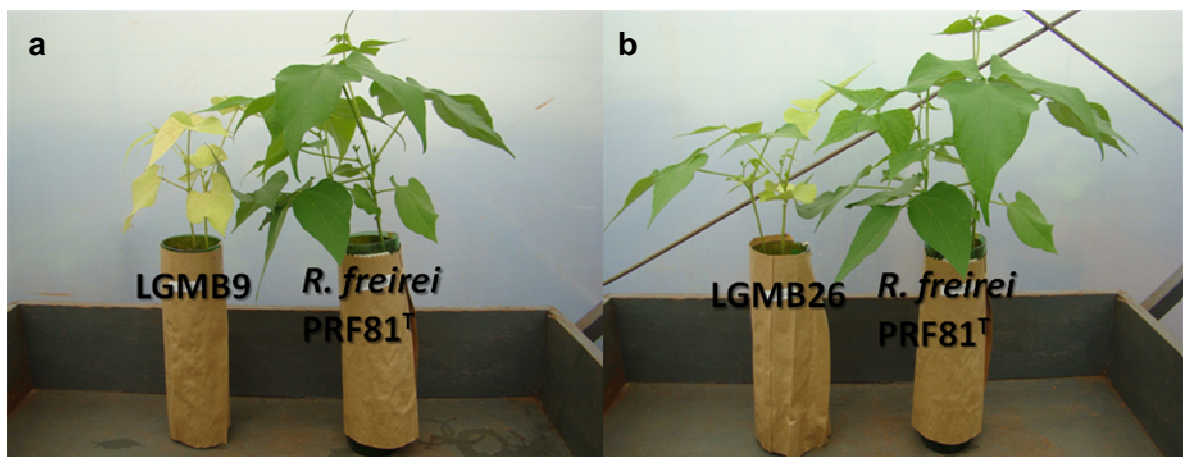


FIGURA 6 – DESEMPENHO DE PLANTAS INOCULADAS COM *R. radiobacter* LGMB9 (a) E *Rhizobium* sp2. (b), COMPARADO COM O PADRÃO COMERCIAL *R. freirei* PRF81^T.

Análise filogenética

Considerando a árvore gerada pela análise do 16S rRNA, verificou-se que algumas espécies estreitamente relacionadas não puderam ser separadas. Portanto, para a obtenção de uma predição filogenética, a utilização de apenas um gene deve ser evitada, sendo que a quantidade ideal de genes não está definida (MARTENS *et*

al., 2007; ASERSE *et al.*, 2012). Já na análise dos genes *housekeeping*, tanto de maneira isolada, como concatenada, foi possível observar a diferenciação das diversas espécies, o que não foi possível na análise do 16S rRNA. Ainda, as sequências concatenadas apresentam maior suporte na classificação taxonômica, fato observado por Aserse *et al.* (2012), que utilizaram os genes *recA*, *glnII*, *rpoB* e 16S rRNA parcial para análise filogenética de rizóbios que nodulam o feijoeiro comum, nativos da Etiópia. De acordo com esses autores, o suporte apresentado pela análise conjunta foi mais forte quando comparado com as árvores geradas na avaliação de cada gene isolado.

Para o grupo de *R. leguminosarum*, o uso do gene 16S rRNA não foi suficiente para separá-lo da linhagem tipo *R. leguminosarum* USDA2370^T. Já para a análise dos genes *housekeeping*, com exceção de LGMB41, os isolados de campo posicionados nesse grupo (LGMB10, LGMB40, LGMB58 e LGMB61) apresentaram de 97,4 a 99,1% de similaridade com *Rhizobium* sp1. WSM2304 na análise concatenada, podendo, portanto, pertencer à mesma espécie. Também, LGMB41 (C) apresentou apenas 96% de similaridade nas sequências com o mesmo, mas agrupa da mesma forma nas árvores de cada gene, o que indica que este isolado talvez esteja ainda em processo de especiação. Estudos realizados por Ribeiro *et al.* (2013) demonstraram que a linhagem WSM2304, hoje identificada como *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, não pode ser assim classificada, com base em análise por MLSA dos mesmos genes utilizados neste estudo, além do gene *rpoA*, sendo que o mesmo resultado foi observado no presente trabalho. *R. leguminosarum* é descrita como espécie incapaz de se desenvolver em condições de alta temperatura e pH ácido, fato que não foi observado entre os isolados de campo geneticamente próximos a ela. Neste caso, LGMB40 e LGMB41 expressaram capacidade de resistência ao baixo pH. Além disso, esses isolados foram capazes de crescer nos meios LB e PY isento de cálcio, em contraste com a literatura, que descreve a impossibilidade de sobrevivência de *R. leguminosarum* nestas condições (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991). Esses dados reafirmam a necessidade de uma análise polifásica para descrição da espécie a que pertencem essas bactérias.

Outro aspecto relevante está no fato de que dois isolados (LGMB9 e LGMB26) foram agrupados no ramo de *R. radiobacter*, que é a atual classificação do *A. tumefaciens* (YOUNG *et al.*, 2001). Entretanto, embora ambos tenham sido classificados igualmente, apresentaram comportamento distinto quanto à eficiência

simbiótica (com teor de N igual a 5,75 mg e 33,64 mg, respectivamente). Segundo Mhamdi *et al.* (2005), bactérias do gênero *Agrobacterium* podem ter perdido os genes simbióticos, mas continuam capazes de colonizar nódulos, por mecanismos desconhecidos. O mesmo evento foi considerado em outros simbiontes de feijoeiro comum por López-Guerrero *et al.* (2012a) e Ormeño-Orrillo *et al.* (2012b), que sugeriram a instabilidade no plasmídeo pSym nestas linhagens. Este comportamento pode ser confirmado neste trabalho, tanto pela ausência do *nifH* nos dois isolados, quanto pela ausência de nodulação e a clorose apresentada pelas plantas inoculadas com LGMB9 (C). É importante destacar que, mesmo tendo promovido nodulação, plantas inoculadas com o isolado LGMB26 apresentaram sinais de clorose, indicando clara ineficiência no processo de fixação do nitrogênio (FIGURA 6). Considerando ainda as árvores filogenéticas obtidas com as sequências dos genes 16S rRNA, *gyrB* e *recA*, esse isolado apresentou similaridade com *Rhizobium* sp2. C58, linhagem cujo genoma completo já foi sequenciado. De acordo com Wood *et al.* (2001) e Goodner *et al.* (2001), esta linhagem referência apresenta genes ortólogos aos encontrados em plasmídeos simbióticos de *Ensifer* (= *Sinorhizobium*) *meliloti*, que é capaz de nodular *P. vulgaris*. Ainda, estudos realizados por Martínez, Palacios, Sánchez (1897) demonstraram que a transferência destes elementos para *R. radiobacter* a tornam capaz de nodular e fixar N de maneira pouco eficiente. Portanto, a eficiência simbiótica de LGMB26 poderia ser atribuída tanto pela presença dos genes simbióticos em plasmídeos como pela sua aquisição por transferência horizontal. A linhagem C58 é atualmente classificada como *R. radiobacter*, mas os resultados da análise filogenética realizada, demonstrou que ela não está posicionada no mesmo ramo da linhagem tipo ATCC19358^T. Por sua vez, esta mesma linhagem agrupou em todas as análises com LGMB9. Como descrito anteriormente, LGMB9 e LGMB26 também apresentaram resultados contrastantes na eficiência simbiótica, indicando classificações taxonômicas distintas para estas bactérias e suas referências correspondentes, *R. radiobacter* ATCC19358^T e *Rhizobium* sp2. C58, respectivamente.

Em contraste à diversidade apresentada entre os isolados de campo, todos os isolados de casa de vegetação apresentaram alta similaridade com *R. miluonense*. Este resultado foi consistente tanto pela análise do 16S rRNA, como pelos genes *housekeeping*, sempre com forte suporte estatístico. Essa diferença de diversidade genética entre diferentes condições experimentais está de acordo com

os resultados obtidos por Oliveira *et al.* (2011) na análise de BOX-PCR, onde foi observada maior variabilidade entre isolados de campo, quando comparados com isolados do experimento em casa de vegetação.

O principal hospedeiro de *R. miluonense* é *Lespedeza* sp., sendo que Gu *et al.* (2008) demonstraram a formação de nódulos ineficientes desta espécie em *P. vulgaris*. No entanto, os isolados avaliados no presente trabalho foram capazes de nodulação eficaz (número e massa seca da planta) semelhante às linhagens utilizadas comercialmente na produção de inoculantes. Além disso, também foram capazes de fixar nitrogênio de maneira mais expressiva que o padrão *R. freirei* PRF81^T, observado especialmente no isolado LGMB73 cujo índice de N total foi de 77,7 mg/pl, significativamente superior aos 56,9 mg/pl observados no controle, e acompanhado de um bom desenvolvimento da planta (FIGURA 7). A formação de nódulos eficientes em feijoeiro por *R. miluonense* também foi observada por Ferreira *et al.* (2012), que utilizou isolados de *Macrottilium atropurpureum* para avaliar sua eficiência simbiótica. As três linhagens mais promissoras também foram mais tolerantes a pH ácido e à presença de alumínio.

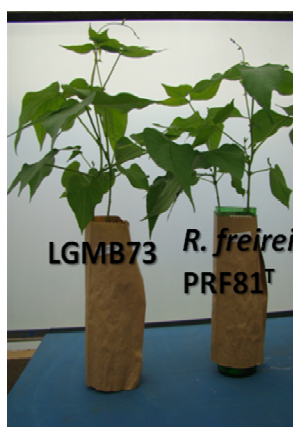


FIGURA 7 – DESEMPENHO DE PLANTAS INOCULADAS COM *R. miluonense* LGMB73, COMPARADO COM O PADRÃO COMERCIAL *R. freirei* PRF81^T.

De acordo com os dados apresentados no presente trabalho, foi possível demonstrar a influência do sistema de cultivo sobre a diversidade genética das bactérias capazes de estabelecer simbiose com *P. vulgaris*, sendo que em condições de casa de vegetação apenas espécies mais competitivas estabeleceram nodulação eficiente. Aqui todos os isolados nodulantes apresentam maior similaridade genética dos genes 16S rRNA, *glnII*, *gyrB* e *recA*, com *R. miluonense*, cuja linhagem tipo é descrita como incapaz de nodular feijoeiro (GU *et al.* 2008). Neste caso, pode-se considerar a possibilidade de transferência do plasmídeo

simbiótico típico de espécies noduladoras de *P. vulgaris* para esta espécie. Além disso, todos os isolados provenientes de casa de vegetação apresentaram os melhores resultados quanto à eficiência simbiótica, com índices de fixação de nitrogênio superiores ao padrão comercial, destacando-se LGMB73 como promissor para a fabricação de inoculantes. Ainda, ressalta-se a importância da utilização de genes adicionais ao 16S rRNA para uma identificação taxonômica mais precisa a nível de espécie, pois observou-se claramente que a análise do gene ribossomal permite a indicação de gênero, no caso do grupo de *R. leguminosarum*, não se mostrando suficiente para a separação de espécies estreitamente relacionadas. Os isolados classificados neste grupo pertencem a uma nova espécie, que deve ser descrita. Em relação ao grupo de *R. radiobacter*, a linhagem utilizada como referência *R. radiobacter* C58 deve ser reclassificada, pois não agrupa com *R. radiobacter* ATCC19358^T na análise filogenética e os isolados mais similares a cada uma delas apresentaram resultados contrastantes quanto à eficiência simbiótica.

Referências

AGUILAR, O.M.; RIVA, O.; PELTZER, E. Analysis of *Rhizobium etli* and its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, p.13548-13553, 2004.

ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1298-1307, 2006.

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.996-1006, 1997.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. USA: Association of Official Analytical Chemists Inc., 1995.

ASERSE, A.A.; RÄSÄNEN, L.A.; ASSEFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, p.120-131, 2012.

BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D.L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v.33, D34-D38, 2005.

BERNAL, G.; GRAHAM, P.H. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.526-534, 2001.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.62, p.293-300, 1951.

BROUGHTON, W.J.; DILWORTH, M.J. Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. **Biochemical Journal**, p.1075-1080, 1971.

CHEN, W.X.; LI, G.S.; QI, Y.L.; WANG, E.T.; YUAN, H.L.; LI, J.L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.275-280, 1991.

CHEN, W.X.; TAN, Z.Y.; GAO, J.L.; LI, Y.; WANG, E.T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., Isolated from Tropical Legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.870-873, 1997.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, K.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v.37, p.141-145, 2009.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), 2014. **Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_10_15_07_19_boletim_graos_janeiro_2014.pdf> Acesso em 13 de janeiro de 2014.

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

DAWYNDDT, P.; VANCANNEYT, M.; De MEYER, H.; SWINGS, J. Knowledge accumulation and resolution of data inconsistencies during the integration of microbial information sources, **IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering**, vol.17, no.8, p.1111-1126, 2005.

DEGEFU, T.; WOLDE-MESKEL, E.; FROSTEGARD, A. Multilocus sequence analysis reveal several unnamed *Mesorhizobium* genospecies nodulating *Acacia* species and *Sesbania* trees in Southern regions of Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology**, v.34, p.216-226, 2011.

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

FERREIRA, P.A.A.; BOMFETI, C.A.; SOARES, B.L.; MOREIRA, F.M.S. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1947–1959, 2012.

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.51, p.2037-2048, 2001.

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

GOODNER, B.; HINKLE, G.; GATTUNG, S.; MILLER, N.; BLANCHARD, M.; QUROLLO, B.; GOLDMAN, B.S.; CAO, Y.; ASKENAZI, M.; HALLING, C.; MULLIN, L.; HOUMIEL, K.; GORDON, J.; VAUDIN, M.; IARTCHOUK, O.; EPP, A.; LIU, F.; WOLLAM, C.; ALLINGER, M.; DOUGHTY, D.; SCOTT, C.; LAPPAS, C.; MARKELZ, B.; FLANAGAN, C.; CROWELL, C.; GURSON, J.; LOMO, C.; SEAR, C.; STRUB, G.; CIELO, C.; SLATER, S. Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, v.294, p.2323-2328, 2001.

GRAHAM, P.H.; VANCE, C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v.65, p.93-106, 2000.

GRANGE, L., HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 36, p. 1389-1398, 2004.

GRANGE, L., HUNGRIA, M., GRAHAM, P.H., MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.867-876, 2007.

GU, C.T.; WANG, E.T.; TIAN, C.F.; HAN, T.X.; CHEN, W.F.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.1364–1368, 2008.

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

HUNGRIA, M., ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.M.O., PROBANZA, A., GUITIERREZ-MANERO, F.J., MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 21, p. 1515-1528, 2000a.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. Benefits of inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v.39, p.88-93, 2003.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factor affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis in Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000b.

HUNTER, W.J.; KUYKENDALL, L.D. Reduction of Selenite to Elemental Red Selenium by *Rhizobium* sp. Strain B1. **Current Microbiology**, v.55, p.344-349, 2007.

KASCHUK, G., HUNGRIA, M., SANTOS, J.C.P., BERTON-JUNIOR, J.F. Differences in common beans rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v.87, n.2, p.205-217, 2006.

KAWAGUCHI, A. Genetic diversity of *Rhizobium vitis* strains in Japan based on multilocus sequence analysis of *pyrG*, *recA* and *rpoD*. **Journal of General Plant Pathology**, v.77, p.299-303, 2011.

KERR, A. Biological control of crown gall: seed inoculation. **Journal of Applied Microbiology**, v.35, p.493-497, 1972.

KWON, S.W.; PARK, J.Y.; KIM, J.S.; KANG, J.W.; CHO, Y.H.; LIM, C.K.; PARKER, M.A.; LEE, G.B. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.263-270, 2005.

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.

LARANJO, M.; YOUNG, J.P.W.; OLIVEIRA, S. Multilocus sequence analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, p.359-367, 2012.

LAUBER, C.L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.5111-5120, 2009.

LÓPEZ-GUERRERO, M.G.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ACOSTA, J.L.; MENDOZA-VARGAS, A.; ROGEL, M.A.; RAMÍREZ, M.A.; ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. **Plasmid**, v.68, p.149-158, 2012a.

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

LU, J.; KANG, L.; HE, X.; XU, D. Multilocus sequence analysis of the Rhizobia from five woody legumes in southern China. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, p.5343-5353, 2011.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2012a. **Feijão**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>> Acesso em 13 de janeiro de 2014.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2012b. Brasil projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao> Acesso em 13 de janeiro de 2014.

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

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

MARTÍNEZ, E.; PALACIOS, R.; SÁNCHEZ, F. Nitrogen-Fixing Nodules Induced by *Agrobacterium tumefaciens* Harboring *Rhizobium phaseoli* Plasmids. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.2828-2834, 1987.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v.252, p.11-23, 2003.

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

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.4, p.315-332, 2006.

MERCANTE, F.M.; CUNHA, C.O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO-JUNIOR, W.Q.; VANDERLEY DEN, J.; FRANCO, A.A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian cerrado region. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.49-58, 1998.

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

NASER, S.; THOMPSON, F.L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; THOMPSON, C.C.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Phylogeny and identification of enterococci using *atpA* gene sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.2224-2230, 2005.

OLIVEIRA, J.P.; GALLI-TERASAWA, L.; GLIENKE, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; ARMSTRONG, L.C.T.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of rhizobia in a Brazilian oxisol nodulating Mesoamerican and Andean genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.643-650, 2011.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; MENNA, P.; ALMEIDA, L.G.P.; OLLERO, F.J.; NICOLÁS, M.F.; RODRIGUES, E.P.; NAKATAMI, A.S.; BATISTA, J.S.S.; CHUEIRE, L.M.O.; SOUZA, R.C.; VASCONCELOS, A.T.R.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, v.13, p.735, 2012a.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.; CHUEIRE, L.M.O.; TIEDJE, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Genome sequences of *Burkholderia* sp. strains CCGE1002 and H160 isolated from legume nodules in Mexico and Brazil. **Journal of Bacteriology**, v.194, n.24, p.6927, 2012b.

PINTO, F.G.S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F.M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.1851-1864, 2007.

QUINTO, C.; de la VEGA, H.; FLORES, M.; FERNÁNDEZ, L.; BALLADO, T.; SOBERÓN, G.; PALACIOS, R. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. **Nature**, v.299, p.724-726, 1982.

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

REEVE, W.; O'HARA, G.; CHAIN, P.; ARDLEY, J.; BRÄU, L.; NANDESENA, K.; TIWARI, R.; COPELAND, A.; NOLAN, M.; HAN, C.; BRETTIN, T.; LAND, M.; OVCHINIKOVA, G.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; MARKOWITZ, V.; KYRPIDES, N.; MELINO, V.; DENTON, M.; YATES, R.; HOWIESON, J. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strain WSM1325, an effective microsymbiont of annual Mediterranean clovers. **Standards in Genomic Sciences**, v.2, p.347-356, 2010a.

REEVE, W.; O'HARA, G.; CHAIN, P.; ARDLEY, J.; BRÄU, L.; NANDESENA, K.; TIWARI, R.; MALFATTI, S.; KISS, H.; LAPIDUS, A.; COPELAND, A.; NOLAN, M.; LAND, M.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; MARKOWITZ, V.; KYRPIDES, N.; MELINO, V.; DENTON, M.; YATES, R.; HOWIESON, J. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii strain WSM2304, an effective microsymbiont of the South American clover *Trifolium polymorphum*. **Standards in Genomic Sciences**, v.2, p.66-76, 2010b.

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

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

RIBEIRO, R.A.; ROGEL, M.A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; BARCELLOS, F.G.; MARTÍNEZ, J.; THOMPSON, F.L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, n.5. p.1180-1185, 2012.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; van der MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; H'OHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v.61, p.539-542, 2012.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p.374-377, 1993.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, C.; VINUESA, P.; EGUIARTE, L.E.; SOUZA, V.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum* sensu lato, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. **Molecular Ecology**, v.14, p.4033-4050, 2005.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook of Rhizobia** – Methods in Legume Rhizobium Technology. Springer, 450 p., 1994.

SOUZA, V.; EGUIARTE, L.; AVILA, G.; CAPPELO, R.; GALLARDO, C.; MONTOYA, J.; PIÑERO, D. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1260-1268, 1994.

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

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

STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRYZANSKA, A.; McINNIS, A.; LAW, I.J.; HOWIESON, J. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of western Australia and south Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7041-7052, 2005.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.

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.

THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Taxonomy of vibrios. In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Eds). **The Biology of Vibrios**, Washington, DC: ASM Press, 2006.

TIAN, C.F.; WANG, E.T.; WU, L.J.; HAN, T.X.; CHEN, W.F.; GU, C.T.; GU, J.G.; CHEN, W.X. *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.2871-2875, 2008.

URIBE, L. Evaluación de medios para la selección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli tolerantes a baja concentración de fosfato em médio de cultivo. **Agronomia Costarricense**, v.17, p.103-109, 1993.

VALVERDE, A.; IGUAL, J.M.; PEIX, A.; CERVANTES, E.; VELAZQUEZ, E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2631-2637, 2006.

van BERKUM, P.; BEYENE, D.; EARDLY, B. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.240-244, 1996.

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

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study for root nodule bacteria**. Oxford: Blacwell, p.164, 1970.

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

WIBBERG, D.; BLOM, J.; JAENICKE, S.; KOLLIN, F.; RUPP, O.; SCHARF, B.; SCHNEIKER-BEKEL, S.; SCZCEPANOWSKI, R.; GOESMANN, A.; SETUBAL, J.C.; SCHMITT, R.; PÜHLER, A.; SCHLÜTER, A. Complete genome sequencing of *Agrobacterium* sp. H13-3, the former *Rhizobium lupini* H13-3, reveals a tripartite genome consisting of a circular and a linear chromosome and an accessory plasmid but lacking a tumor-inducing Ti-plasmid. **Journal of Biotechnology**, v.155, p.50–62, 2011.

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

WOOD, D.W.; SETUBAL, J.C.; KAUL, R.; MONKS, D.E.; KITAJIMA, J.P.; OKURA, V.K.; ZHOU, Y.; CHEN, L.; WOOD, G.E.; ALMEIDA Jr, N.F.; WOO, L.; CHEN, Y.; PAULSEN, I.T.; EISEN, J.A.; KARP, P.D.; BOVEE Sr., D.; CHAPMAN, P.; CLENDENNING, J.; DEATHERAGE, G.; GILLET, W.; GRANT, C.; KUTYAVIN, T.; LEVY, R.; LI, M.J.; McCLELLAND, E.; PALMIERI, A.; RAYMOND, C.; ROUSE, G.; SAENPHIMMACHAK, C.; WU, Z.; ROMERO, P.; GORDON, D.; ZHANG, S.; YOO, H.; TAO, Y.; BIDDLE, P.; JUNG, M.; KRESPAN, W.; PERRY, M.; GORDON-KAMM, B.; LIAO, L.; KIM, S.; HENDRICK, C.; ZHAO, Z.Y.; DOLAN, M.; CHUMLEY, F.; TINGEY, S.V.; TOMB, J.F.; GORDON, M.P.; OLSON, M.V.; NESTER, E.W. The Genome of the Natural Genetic Engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, v.294, p.2317-2323, 2001.

YOUNG, J.P.W.; CROSSMAN, L.C.; JOHNSTON, A.W.B.; THOMSON, N.R.; GHAZOU, Z.F.; HULL, K.H.; WEXLER, M.; CURSON, A.R.J.; TODD, J.D.; POOLE, P.S.; MAUCLINE, T.H.; EAST, A.K.; QUAIL, M.A.; CHURCHER, C.; ARROWSMITH, C.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T.; CLARKE, K.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; FRASER, A.; HANCE, Z.; HAUSER, H.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; NORBERTCZAK, H.; RABBINOWITSCH, E.; SANDERS, M.; SIMMONDS, M.; WHITEHEAD, S.; PARKHILL, J. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. **Genome Biology**, 7:R34, 2006.

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

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

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

3. CAPÍTULO 2

Ocupação natural e classificação de diferentes gêneros em nódulos radiculares de feijoeiro comum (Phaseolus vulgaris L.) avaliados em dois sistemas de cultivo

Resumo

Identificou-se a presença de seis gêneros extras ao *Rhizobium* em nódulos, cuja expectativa seria sua ocupação exclusiva. Estes resultados foram obtidos a partir do sequenciamento do DNA de dezoito isolados de nódulos radiculares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivado tanto em condições de campo como de casa de vegetação, aonde as plantas foram inoculadas com solo diluído. O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização morfofisiológica, a identificação molecular, avaliar a capacidade de promoção de crescimento vegetal destas bactérias e o seu efeito no processo de nodulação e fixação de nitrogênio por rizóbios. A análise filogenética foi realizada por meio da região que codifica a subunidade menor do ribossomo, 16S rRNA, sendo que as sequências obtidas foram contrastadas em bancos genéticos de dados. A comparação das mesmas demonstrou similaridade dos isolados com espécies pertencentes aos gêneros: *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Enterobacter* e *Burkholderia*. A análise do efeito de promoção de crescimento foi realizada através da produção de ácido indolacético (AIA), produção de sideróforos e solubilização de fosfatos. Exceto por um isolado, todos os demais apresentaram produção de sideróforos, apenas seis solubilizaram fosfato e dez produziram quantidade significativa de AIA. O melhor desempenho foi apresentado por isolados provenientes de casa de vegetação, sendo que LGMB72 (*Enterobacter* sp.) e LGMB82 (*Pseudomonas* sp5.) apresentaram as maiores concentrações de AIA, além da produção de sideróforos e capacidade de solubilizar fosfatos. Para verificar o efeito dos isolados na FBN, foi realizado um experimento em casa de vegetação, onde as plantas foram coinoculadas com as linhagens em estudo e uma linhagem comercial de *Rhizobium*. Não apresentaram resposta significativa para nodulação, mas importante efeito no teor de nitrogênio da parte aérea, significativamente

superior quando as plantas foram coinoculadas com *R. freirei* PRF81^T e cada isolado, quando comparado individualmente com este padrão comercial. A associação foi favorável entre o rizóbio e os isolados LGMB5 (*Xanthomonas* sp.), LGMB67 (*Pseudomonas* sp2.), LGMB76 (*Pseudomonas* sp3.) e LGMB82 (*Pseudomonas* sp5.).

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, sistema de cultivo, PGPR, classificação filogenética, coinoculação

Introdução

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de grande impacto na economia brasileira por ser a principal fonte protéica na alimentação de grande parte da nossa população. Trata-se de uma cultura capaz de estabelecer simbiose com bactérias presentes no solo, capazes de promover a formação de estruturas altamente específicas na raiz da planta hospedeira, os nódulos, aonde ocorre a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN). Deste processo, resulta a conversão do nitrogênio atmosférico (N₂) em formas assimiláveis pela planta (EMBRAPA, 2007). A formação e colonização destes nódulos é realizada predominantemente por bactérias pertencentes ao grupo dos rizóbios. Entretanto, outros microrganismos são capazes de interagir com as espécies fixadoras de nitrogênio, estimulando a formação destas estruturas, assim como atuando na promoção de crescimento da planta, que pode resultar no aumento do rendimento da cultura (STURZ *et al.*, 1997; ARAÚJO; HUNGRIA, 1999).

A atuação de rizóbios associados à bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR - *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) pode ser de forma direta ou indireta. Os mecanismos de ação direta incluem a síntese de sideróforos, produção de fitormônios, solubilização de fosfatos e aceleração dos processos de mineralização (SUMAN *et al.*, 2001; AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008; ZAIDI *et al.*, 2009). Por outro lado, dentre os mecanismos de ação indireta estão a indução de resistência sistêmica nos vegetais, produção de antibióticos e antagonismo a fitopatógenos (EMBRAPA, 2003). Além disso, algumas PGPR podem apresentar efeito sinérgico com a fixação simbiótica do nitrogênio, no caso das leguminosas (EMBRAPA, 1999). Malfanova (2013) propôs a classificação desses microrganismos

em três grupos principais: 1) promotores gerais de crescimento de plantas, que utilizam um ou mais mecanismos conhecidos; 2) fertilizantes microbianos para nutrientes específicos, sendo que os principais são nitrogênio, fósforo e íons de ferro; e 3) microrganismos reguladores do crescimento de plantas através de mecanismos hormonais. Diversos inoculantes comerciais compostos por PGPR já foram desenvolvidos, que atuam suprimindo doenças na planta (bioprotetores), aumentando a absorção de nutrientes (biofertilizadores), ou produzindo fitormônios (bioestimulantes). Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Agrobacterium* estão entre as mais utilizadas (TENUTA, 2003; BHATTACHARYYA; JHA, 2012;).

Com relação à produção de fitormônios, os microrganismos podem promover um estímulo ao crescimento vegetal e aumentar a produção de metabólitos pelas plantas que podem ser utilizados para o seu próprio crescimento. Isto ocorre através de modificações na morfologia das raízes (aumento do comprimento, número de pêlos e raízes laterais), alterando a absorção de nutrientes e água. Dentre as moléculas descritas estão as auxinas, as citocininas, as giberelinas e o etileno, sendo as auxinas os fitormônios mais amplamente estudados (MANULIS *et al.*, 1998; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; GLICK, 2012). Estimativas apontam que 80% das bactérias presentes na rizosfera apresentam capacidade de produzir auxinas reguladoras do crescimento vegetal. Um exemplo são bactérias do gênero *Azospirillum*, cujo principal fitormônio produzido é o ácido indolacético (AIA)(DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

Uma outra forma de promoção de crescimento em plantas é através da solubilização de fosfato inorgânico pelas PGPR, transformando o fósforo em formas assimiláveis pela planta, visto que, depois do nitrogênio, o fósforo (P) é o principal mineral limitante do crescimento vegetal (KHAN *et al.*; 2009). Isto é possível devido à secreção de ácidos orgânicos e fosfatases que facilitam a conversão das formas insolúveis de P em formas disponíveis para as plantas hospedeiras (KIM; JORDAN; McDONALD, 1998; KHAN; ZAIDI; WANI, 2006). Dentre os organismos capazes de realizar este processo estão as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Por outro lado, a produção de sideróforos ocorre em resposta à baixa disponibilidade de Fe^{3+} em solução e atuam como promotores de crescimento vegetal porque disponibilizam esse elemento absorvido para a planta, além de imobilizar o ferro que estaria disponível para a proliferação de fitopatógenos (VESSEY, 2003; INDIRAGANDHI *et al.*, 2008). São moléculas sequestradoras de ferro de baixo peso molecular e elevada afinidade pelo substrato. Estes compostos atuam do lado externo da membrana celular, capturando moléculas deste elemento químico em solução e ligando-se especificamente a receptores do complexo localizados na membrana, por onde são absorvidos, tornando assim o ferro disponível para o crescimento dos vegetais (NEILANDS; LEONG, 1986; RAJKUMAR *et al.*, 2010).

Além de rizóbios, o isolamento de bactérias associativas com potencial ação na promoção de crescimento, a partir de nódulos de leguminosas, tem sido descrito por diversos autores (BAI *et al.*, 2002; STAJKOVIC *et al.*, 2009; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2010; PALANIAPPAN *et al.*, 2010; ISSAR *et al.*, 2012; SHARMA; GAUR; CHOUDHARY, 2012; TARIQ *et al.*, 2012), sendo que o sistema de cultivo interfere na diversidade desses organismos (ALBERTON; KASCHUK; HUNGRIA, 2006). Diferentes linhagens são capazes de estabelecer e colonizar nódulos em resposta a diversas condições ambientais, tais como tipo de fertilização e manejo do solo (KASCHUK *et al.*, 2006; GIONGO *et al.*, 2007); e sua concentração, aonde diferentes bactérias são encontradas de acordo com a diluição do solo (GRANGE; HUNGRIA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA-FRANCESQUINI *et al.*, 2014, em preparação).

Tendo em vista que o processo de nodulação é realizado por rizóbios, espera-se que a ocupação dessa estrutura especializada na fixação de N_2 seja feita exclusivamente por espécies desse grupo. Entretanto, a colonização de nódulos por diferentes gêneros deve ser investigada para um melhor entendimento de sua função no desenvolvimento da planta. Sendo assim, a análise de diversidade destas bactérias e o conhecimento de sua atuação na planta hospedeira auxiliam no processo de desenvolvimento de tecnologias de baixo custo para a produção da cultura do feijoeiro, como o desenvolvimento de inoculantes. Estes produtos podem conter espécies fixadoras de nitrogênio ou espécies promotoras de crescimento vegetal, assim como a combinação mais eficiente entre estes dois tipos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética de bactérias que colonizam

nódulos radiculares de feijoeiro comum, em associação com rizóbios, provenientes de diferentes sistemas de cultivo: campo e casa de vegetação. Também foi avaliado o efeito dos isolados no processo nodulatório e fixação de nitrogênio em plantas inoculadas com uma linhagem comercial de *Rhizobium*, e sua atuação na promoção de crescimento vegetal.

Material e métodos

Seleção dos isolados

Foram avaliados 18 isolados obtidos a partir de nódulos radiculares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)(QUADRO 1), cultivado tanto em condições de campo (C), quanto em vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio, em casa de vegetação (CV). A seleção dos mesmos foi realizada a partir de dados do sequenciamento parcial do 16S rRNA, onde foram escolhidos gêneros diferentes de *Rhizobium*.

Os isolados são mantidos em meio de cultura YM líquido (VINCENT, 1970), contendo glicerol (50%) e armazenados a -20°C. As culturas em uso são mantidas em tubos contendo meio YMA (VINCENT, 1970), acrescido de azul de bromotimol como indicador de pH e armazenadas a 4 °C.

Caracterização morfofisiológica

A morfologia da colônia (tamanho, cor, mucosidade, transparência, bordas e elevação) e a alteração de pH do meio foram determinadas após 3 a 5 dias de crescimento a 28°C em meio YMA (VINCENT, 1970) contendo azul de bromotimol. Além disso, o crescimento dos isolados foi avaliado nos meios LB (BERTANI, 1951) e PY-Ca (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), assim como em TY (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994) a 40°C, e TY modificado para pH 4,0 (HUNGRIA *et al.*, 2000). Todas as avaliações foram realizadas em triplicata.

| Isolado/Linhagem | Código do isolado/linhagem | Código de acesso no GenBank (16S rRNA) | Linhagem | Código da linhagem | Código de acesso no GenBank (16S rRNA) |
|-----------------------------------|----------------------------|--|------------------------------------|-------------------------|--|
| <i>Xanthomonas</i> sp. (C) | LGMB5 | KJ136823 | <i>Brevundimonas nasdae</i> | GTC1043 ^I | AB071954 |
| <i>Bacillus</i> sp3. (C) | LGMB8 | KJ136824 | <i>Burkholderia pyrrocinia</i> | LMG14191 ^T | U96930 |
| <i>Bacillus</i> sp3. (C) | LGMB20 | KJ136825 | <i>Burkholderia ambifaria</i> | AMMD ^T | AF043302 |
| <i>Brevundimonas</i> sp. (C) | LGMB25 | KJ136826 | <i>Burkholderia stabilis</i> | LMG14294 ^T | AF097533 |
| <i>Pseudomonas</i> sp1. (C) | LGMB30 | KJ136827 | <i>Burkholderia diffusa</i> | R-15930 ^T | AM747629 |
| <i>Pseudomonas</i> sp2. (C) | LGMB34 | KJ136828 | <i>Enterobacter cancerogenus</i> | LMG2693 ^T | Z96078 |
| <i>Bacillus</i> sp3. (C) | LGMB43 | KJ136829 | <i>Enterobacter asburiae</i> | JCM6051 ^T | AB004744 |
| <i>Burkholderia</i> sp. (C) | LGMB50 | KJ136830 | <i>Pseudomonas geniculata</i> | ATCC19374 ^T | AB021404 |
| <i>Bacillus</i> sp1. (C) | LGMB66 | KJ136831 | <i>Pseudomonas beteli</i> | ATCC19861 ^T | AB021406 |
| <i>Pseudomonas</i> sp2. (C) | LGMB67 | KJ136832 | <i>Pseudomonas hibiscicola</i> | ATCC19867 ^T | AB021405 |
| <i>Enterobacter</i> sp. (CV) | LGMB72 | KJ136833 | <i>Pseudomonas veronii</i> | CIP104663 ^T | AF064460 |
| <i>Pseudomonas</i> sp3. (CV) | LGMB76 | KJ136834 | <i>Pseudomonas poae</i> | DSM14936 ^T | AJ492829 |
| <i>Pseudomonas</i> sp5. (CV) | LGMB81 | KJ136835 | <i>Pseudomonas trivialis</i> | DSM14937 ^T | AJ492831 |
| <i>Pseudomonas</i> sp5. (CV) | LGMB82 | KJ136836 | <i>Pseudomonas cedrina</i> | CFML96-198 ^T | AF064461 |
| <i>Bacillus</i> sp2. (CV) | LGMB83 | KJ136837 | <i>Pseudomonas reinekei</i> | MT1 ^T | AM293565 |
| <i>Pseudomonas</i> sp4. (CV) | LGMB100 | KJ136838 | <i>Pseudomonas extremaustralis</i> | CT14-3 ^I | AJ583501 |
| <i>Pseudomonas</i> sp2. (CV) | LGMB106 | KJ136839 | <i>Pseudomonas rhodesiae</i> | CIP104664 ^T | AF064459 |
| <i>Bacillus</i> sp3. (CV) | LGMB110 | KJ136840 | <i>Pseudomonas orientalis</i> | CFML96-170 ^I | AF064457 |
| <i>Bacillus altitudinis</i> | 41KF2b ^T | AJ831842 | <i>Pseudomonas monteilii</i> | CIP104883 ^T | AF064458 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | NBRC15535 ^T | AB255669 | <i>Pseudomonas vancouverensis</i> | DhA-51 ^T | AJ011507 |
| <i>Bacillus stratosphericus</i> | 41KF2a ^T | AJ831841 | <i>Pseudomonas taiwanensis</i> | BCRC17751 ^I | EU103629 |
| <i>Bacillus aerophilus</i> | 28K ^T | AJ831844 | <i>Pseudomonas marginalis</i> | LMG2210 ^T | Z76663 |
| <i>Bacillus methylotrophicus</i> | CBMB205 ^I | EU194897 | <i>Pseudomonas koreensis</i> | Ps9-14 ^I | AF468452 |
| <i>Bacillus siamensis</i> | PD-A10 ^I | GQ281299 | <i>Pseudomonas migulae</i> | CIP105470 ^I | AF074383 |
| <i>Bacillus flexus</i> | IFO15715 ^T | AB021185 | <i>Xanthomonas sacchari</i> | LMG471 ^T | Y10766 |
| <i>Bacillus megaterium</i> | IAM13418 ^I | D16273 | <i>Xanthomonas melonis</i> | LMG8670 ^I | Y10756 |
| <i>Brevundimonas vesicularis</i> | LMG2350 ^T | AJ227780 | <i>Xanthomonas hyacinthi</i> | LMG739 ^T | Y10754 |
| <i>Brevundimonas mediterranea</i> | V4.BO.10 ^T | AJ227801 | <i>Xanthomonas translucens</i> | LMG876 ^T | X99299 |
| <i>Brevundimonas aurantiaca</i> | DSM4731 ^T | AJ227787 | <i>Xanthomonas albilineans</i> | LMG494 ^T | X95918 |
| <i>Brevundimonas intermedia</i> | ATCC15262 ^T | AJ227786 | | | |

QUADRO 1 – ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA UTILIZADOS NESTE ESTUDO

NOTA: os isolados (LGMB) foram classificados ao nível de gênero. C – isolados de plantas cultivadas em campo; CV – isolados de plantas cultivadas em casa de vegetação

Testes bioquímicos para avaliação da capacidade de promoção de crescimento em plantas

Para avaliar a capacidade de atuar na promoção de crescimento de plantas, os isolados foram submetidos aos seguintes testes, de acordo com as respectivas referências: produção de sideróforos, através da medida do halo formado ao redor da colônia (SCHWYN; NEILANDS, 1987); produção de ácido indolacético (AIA), sendo determinada a concentração deste composto por meio de leitura em espectrofotômetro a 540nm (KUSS *et al.*, 2007), e solubilização de fosfatos, através da determinação do Índice de Solubilização (IS = diâmetro do halo / diâmetro da colônia), sendo que índices 2 caracterizam baixa capacidade de solubilização, entre 2 e 4, média capacidade e, 4, alta capacidade de solubilização de fosfatos (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010). Todos os testes foram realizados em triplicata. Os

resultados obtidos na avaliação de produção de AIA foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo que o delineamento foi inteiramente casualizado, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa Assistat versão 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009).

Caracterização genética

Sequenciamento do gene 16S rRNA

O DNA dos isolados foi extraído como descrito por Kaschuk *et al.* (2006) e para a amplificação da região do DNA que codifica o 16S rRNA foram utilizados os *primers* fD1 e rD1 (QUADRO 2). Cada reação continha, em 50 μ L: dNTPs (300 mM de cada); tampão de PCR (Tris-base 20 mM, pH 8.4 e KCl 50 mM); *primers* (15 pmol de cada); Taq DNA polimerase (1.0 U); e DNA (50 ng). As condições das reações foram realizadas de acordo com Menna *et al.* (2006), sendo que os *primers* utilizados estão descritos no QUADRO 2. Os produtos foram purificados por precipitação do DNA com acetato de amônio (4 μ L a 7,5 M) e etanol absoluto (60 μ L) e, para a reação de sequenciamento, cada amostra continha, em 10 μ L: 80 ng do produto de PCR purificado, 3 μ L de dye (DYEnamic ET terminator reagent premix for the Mega-BACE, Amersham Biosciences®) e 3 pmol de *primer* (foi realizada uma reação para cada um dos *primers*: fD1, Y2, 362f, 786f e 1203f – QUADRO 2). O programa utilizado para amplificação foi: 35 ciclos de 30 s a 94°C, 15 s a 50°C e 90 s a 60°C, sendo que o produto foi precipitado por acetato de amônio e etanol para purificação do DNA. As amostras foram submetidas à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE Amersham Biosciences®.

| Primer | Sequência (5' – 3') | Referência |
|--------|---------------------------|-------------------------------|
| fD1 | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | WEISBURG <i>et al.</i> , 1991 |
| Y2 | CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT | YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991 |
| 362f | CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG | MENNA <i>et al.</i> , 2006 |
| 786f | CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG | MENNA <i>et al.</i> , 2006 |
| 1203f | GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC | MENNA <i>et al.</i> , 2006 |
| rD1 | AAGGAGGTGATCCAGCC | WEISBURG <i>et al.</i> , 1991 |

QUADRO 2 – PRIMERS UTILIZADOS PARA O SEQUENCIAMENTO DO 16S rRNA

Análise Filogenética

Para a construção da árvore filogenética, as sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com sequências existentes no RDP (*Ribosomal Database Project*) (COLE *et al.*, 2009). De acordo com o resultado, foram selecionadas as sequências de linhagens de referência para a análise filogenética.

O alinhamento das sequências foi realizado no MAFFT versão 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) e sua edição no programa MEGA 5.1 (TAMURA *et al.*, 2011). No mesmo *software* foi definido o melhor modelo evolutivo para o conjunto de dados. Para a análise filogenética foram realizados a Inferência Bayesiana, utilizando o MrBayes versão 3.2 (RONQUIST *et al.*, 2012), e a construção da árvore pelo método da Máxima Verossimilhança, utilizando o GARLI Web Service (<http://www.molecularevolution.org/software/phylogenetics/garli>), com 2000 amostragens na análise de *bootstrap* para suporte estatístico. Os resultados foram visualizados no FigTree versão 1.3.1.

Eficiência simbiótica em plantas cultivadas em casa de vegetação

As sementes de *P. vulgaris* (cultivar BRS Estilo) foram desinfestadas utilizando álcool, hipoclorito de sódio a 10% e água purificada autoclavada. Foram plantadas em vasos de Leonard contendo areia e vermiculita (1:2) esterilizados (VINCENT, 1970), e solução nutritiva livre de nitrogênio (BROUGHTON; DILWORTH, 1971). Quatro sementes foram semeadas por vaso, cada uma inoculada com 0,5 mL da cultura de bactérias e 0,5 mL da linhagem padrão, sendo realizado um desbaste para manutenção de duas plantas por vaso após 5 dias de plantio. O experimento foi montado utilizando delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para cada tratamento. Os tratamentos foram: a) controle sem inóculo e sem aplicação de nitrogênio; b) controle inoculado com *R. freirei* PRF81^T, utilizada como inoculante comercial e c) plantas coinoculadas com as linhagens a serem avaliadas e a a linhagem comercial. As bactérias foram cultivadas por 48 horas em frascos contendo 10 mL de meio YM (VINCENT, 1970), sob agitação (100 rpm) e temperatura de 28°C. A concentração de células foi verificada em espectrofotômetro e a densidade ótica foi padronizada em 0,5. Após 35 dias de desenvolvimento, foram avaliados por planta: número de nódulos (nº/pl);

massa seca de nódulos (mg/pl); massa seca da raiz (g/pl); massa seca da parte aérea (g/pl), teor de nitrogênio (mg/g) e N total da parte aérea (mg/pl), sendo que o teor de N foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$, utilizando o programa Assistat versão 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009). Para ajustar a normalidade dos dados, como exigência deste teste paramétrico, os valores obtidos foram transformados utilizando-se a fórmula $\sqrt{(x+0,5)}$.

Resultados

Caracterização genética, morfofisiológica e promoção de crescimento

A amplificação do gene *nifH*, a caracterização genética pela sequência parcial do 16S rRNA, os resultados de crescimento bacteriano em condições adversas e dos testes bioquímicos para avaliação da capacidade de promoção de crescimento em plantas estão representados na TABELA 1.

| Isolado | Classificação | LB | PY-Ca | TY 40°C | TY pH 4,0 | Sideróforos | AIA (µg/mL) | Solub. Fosfato |
|--------------|--------------------------|----|-------|------------|--------------|-------------|-----------------------------|-------------------|
| LGMB5 (C) | <i>Xanthomonas</i> sp. | + | + | + | - | Sim | 4,18 ± 0,67 ^c | Não |
| LGMB8 (C) | <i>Bacillus</i> sp3. | - | - | - | - | Não | 2,13 ± 0,34 ^c | Não |
| LGMB20 (C) | <i>Bacillus</i> sp3. | + | + | + | - | Sim | 10,60 ± 2,65 ^{bc} | Não |
| LGMB25 (C) | <i>Brevundimonas</i> sp. | + | + | - | - | Sim | 7,88 ± 1,82 ^c | Não |
| LGMB30 (C) | <i>Pseudomonas</i> sp1. | + | + | - | + | Sim | 31,71 ± 6,33 ^{bc} | Não |
| LGMB34 (C) | <i>Pseudomonas</i> sp2. | + | + | - | + | Sim | 34,51 ± 2,63 ^{bc} | Média |
| LGMB43 (C) | <i>Bacillus</i> sp3. | - | - | - | - | Sim | 32,94 ± 3,95 ^{bc} | Não |
| LGMB50 (C) | <i>Burkholderia</i> sp. | + | + | + | + | Sim | 14,02 ± 2,81 ^{bc} | Média |
| LGMB66 (C) | <i>Bacillus</i> sp1. | - | - | - | - | Sim | 6,51 ± 4,47 ^c | Não |
| LGMB67 (C) | <i>Pseudomonas</i> sp2. | + | + | - | + | Sim | 31,53 ± 2,55 ^{bc} | Média |
| LGMB72 (CV) | <i>Enterobacter</i> sp. | + | + | + | + | Sim | 293,79 ± 16,20 ^a | Baixa |
| LGMB76 (CV) | <i>Pseudomonas</i> sp3. | + | + | + | - | Sim | 6,34 ± 0,84 ^c | Não |
| LGMB81 (CV) | <i>Pseudomonas</i> sp5. | - | + | - | - | Sim | 9,46 ± 0,94 ^c | Não |
| LGMB82 (CV) | <i>Pseudomonas</i> sp5. | + | + | - | + | Sim | 75,68 ± 5,80 ^b | Média |
| LGMB83 (CV) | <i>Bacillus</i> sp2. | - | - | - | - | Sim | 6,04 ± 1,66 ^c | Não |
| LGMB100 (CV) | <i>Pseudomonas</i> sp4. | - | + | - | + | Sim | 21,37 ± 2,15 ^{bc} | Não |
| LGMB106 (CV) | <i>Pseudomonas</i> sp2. | - | + | - | + | Sim | 6,34 ± 1,10 ^c | Não |
| LGMB110 (CV) | <i>Bacillus</i> sp3. | - | - | - | - | Sim | 1,17 ± 0,29 ^c | Não |

TABELA 1 – CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, DESENVOLVIMENTO EM CONDIÇÕES ADVERSAS E TESTES BIOQUÍMICOS PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS

NOTA: -) não cresceu; +) cresceu. Os valores de AIA seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Para a solubilização de fosfatos, índices 2 caracterizam baixa capacidade de solubilização, entre 2 e 4, média capacidade e, 4, alta capacidade. C – isolados de plantas cultivadas em campo; CV – isolados de plantas cultivadas em casa de vegetação

Grande parte dos isolados apresentou sensibilidade à temperatura (treze isolados, 72,2%), visto que não cresceram a 40°C. Aproximadamente a metade foi sensível ao pH 4,0 (dez isolados, 55,5%). Dez isolados cresceram em meio LB (55,5%) e treze (72,2%) no meio PY-Ca. Em relação aos testes de promoção de crescimento, com exceção de LGMB8 (C), todos os demais produziram sideróforos (dezessete isolados, 94,4%), dez apresentaram produção de ácido indolacético (55,5%) acima da concentração mínima da curva padrão (8,76 µg/mL) e apenas cinco (27,8%) apresentaram baixa ou média solubilização de fosfatos.

Análise filogenética

A árvore filogenética obtida com as sequências do 16S rRNA dos isolados e das linhagens de referência (447 pb) está apresentada na FIGURA 1. Os diferentes gêneros nos nódulos se classificam claramente nos agrupamentos correspondentes. Também estão de acordo com os resultados obtidos quando as sequências dos isolados foram comparadas com sequências de linhagens de referência depositadas no banco de dados RDP. LGMB5 (C) agrupou com *Xathomonas* sp., LGMB25 (C) com *Brevundimonas* sp., LGMB50 (C) com *Burkholderia* sp. e LGMB72 (CV) com *Enterobacter* sp. Os isolados que agruparam com *Bacillus* sp. foram LGMB8 (C), LGMB20 (C), LGMB43 (C), LGMB66 (C), LGMB83 (CV) e LGMB110 (CV), enquanto que LGMB30 (C), LGMB34 (C), LGMB67 (C), LGMB76 (CV), LGMB81 (CV), LGMB82 (CV), LGMB100 (CV) e LGMB106 (CV) estão no grupo de *Pseudomonas* sp.

Para o gênero *Bacillus* foi analisado um fragmento de 974 pb do gene 16S rRNA, sendo que LGMB8 (C), LGMB20 (C), LGMB43 (C) e LGMB110 (CV) apresentaram similaridades com cada espécie do grupo *B. altitudinis*/*B. stratosphericus*/*B. aerophilus* de 100%, 99,3%, 100% e 99,8%, respectivamente. Os isolados LGMB66 (C) e LGMB83 (CV) agruparam com *B. megaterium* (99,5% de similaridade) e *B. amyloliquefaciens*/*B. methylotrophicus* (99,7% de similaridade), respectivamente. Em relação aos gêneros *Brevundimonas* e *Burkholderia*, o fragmento de 1398 pb de LGMB25 (C) apresentou 99,5% de similaridade com as espécies *Brevundimonas vesicularis* e *Brevundimonas nasdae*, enquanto que 605 pb do 16S rRNA de LGMB50 (C) são 99,6% similares ao mesmo fragmento de *Burkholderia diffusa*. Ainda, LGMB72 (CV) apresentou 98,4% de similaridade com

Enterobacter asburiae (570 pb), e a sequência de 783 pb de LGMB5 (C) foi idêntica às sequências das espécies *Xanthomonas melonis* e *X. translucens*. Finalmente, o isolados classificados como *Pseudomonas* sp. apresentaram as seguintes similaridades (447 pb): LGMB30 (C) – 99,3% com *P. geniculata*/*P. beteli*; LGMB76 (CV) – 100% com *P. monteilii*; LGMB81 (CV) – 99,7% com *P. marginalis*; LGMB82 (CV) – 99,3% com *P. veronii*/*P. extremaustralis*/*P. marginalis*; LGMB100 (CV) – 100% com *P. reinekei*/*P. vancouverensis*/*P. koreensis*; e LGMB34 (C), LGMB67 (C) e LGMB106 (CV) – 100% com *P. cedrina*.

Eficiência simbiótica em plantas cultivadas em casa de vegetação

Os resultados das avaliações realizadas com as plantas coinoculadas com os isolados e a linhagem utilizada como inoculante comercial *Rhizobium freirei* PRF81^T estão apresentados na TABELA 2. Considerando as plantas coinoculadas, não houve aumento expressivo tanto para nodulação, como nas massas da parte aérea e radicular, quando comparado ao uso do padrão *R. freirei* PRF81^T. Entretanto, foi observada diferença entre os controles, sendo que todos os parâmetros analisados tiveram índices inferiores para o controle sem inóculo, de acordo com o esperado. Foi expressiva a alta concentração de nitrogênio observada nos dados de massa aérea da planta, cujos resultados estatisticamente significativos discriminam os controles em relação aos tratamentos. Para este mesmo parâmetro estimado destacaram-se os isolados LGMB5 (C) e LGMB67 (C), ambos isolados de plantas cultivadas em condições de campo e classificados como *Xanthomonas* sp. e *Pseudomonas* sp., respectivamente. Os índices de N total obtidos foram 63,473 mg/pl para LGMB5 e 64,408 mg/pl para LGMB67, superiores aos 56,894 mg/pl observados no padrão comercial.



FIGURA 1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA COM AS SEQUÊNCIAS DO 16S rRNA DOS ISOLADOS E LINHAGENS DE REFERÊNCIA, UTILIZANDO O MÉTODO DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA E KIMURA-2-PARÂMETROS COMO MODELO EVOLUTIVO (OS CÓDIGOS DE ACESSO NO GENBANK ESTÃO ENTRE PARÊNTESES)

Nota: C – isolados de plantas cultivadas em campo e CV – isolados de plantas cultivadas em casa de vegetação

| Tratamento | Número nódulos (n°/pl) | Massa nódulos (mg/pl) | Massa raiz (g/pl) | Massa aérea (g/pl) | Nitrogênio (mg/g) | N total (mg/pl) |
|--|------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| LGMB5 (C) <i>Xanthomonas</i> sp. | 333,75 ^a | 266,03 ^a | 0,440 ^{ab} | 1,703 ^a | 37,246 ^{bc} | 63,473 ^a |
| LGMB8 (C) <i>Bacillus</i> sp3. | 263,75 ^a | 245,33 ^{ab} | 0,439 ^{ab} | 1,561 ^a | 37,376 ^{bc} | 58,295 ^{abc} |
| LGMB20 (C) <i>Bacillus</i> sp3. | 313,00 ^a | 216,38 ^{ab} | 0,485 ^{ab} | 1,321 ^{ab} | 37,260 ^{bc} | 49,241 ^{abc} |
| LGMB25 (C) <i>Brevundimonas</i> sp. | 328,75 ^a | 237,93 ^{ab} | 0,462 ^{ab} | 1,436 ^{ab} | 38,042 ^{bc} | 54,657 ^{abc} |
| LGMB30 (C) <i>Pseudomonas</i> sp1. | 297,25 ^a | 233,63 ^{ab} | 0,451 ^{ab} | 1,224 ^{ab} | 38,402 ^{bc} | 46,921 ^{abc} |
| LGMB34 (C) <i>Pseudomonas</i> sp2. | 296,75 ^a | 228,88 ^{ab} | 0,484 ^{ab} | 1,379 ^{ab} | 36,442 ^{bc} | 50,049 ^{abc} |
| LGMB43 (C) <i>Bacillus</i> sp3. | 327,50 ^a | 249,85 ^{ab} | 0,444 ^{ab} | 1,611 ^a | 37,830 ^{bc} | 61,125 ^{abc} |
| LGMB50 (C) <i>Burkholderia</i> sp. | 332,75 ^a | 236,58 ^{ab} | 0,454 ^{ab} | 1,471 ^{ab} | 35,358 ^{bc} | 52,288 ^{abc} |
| LGMB66 (C) <i>Bacillus</i> sp1. | 226,50 ^a | 168,30 ^b | 0,334 ^b | 0,943 ^b | 40,096 ^{ab} | 37,684 ^{bc} |
| LGMB67 (C) <i>Pseudomonas</i> sp2. | 335,00 ^a | 247,05 ^{ab} | 0,471 ^{ab} | 1,619 ^a | 39,798 ^{abc} | 64,408 ^a |
| LGMB72 (CV) <i>Enterobacter</i> sp. | 335,50 ^a | 236,40 ^{ab} | 0,433 ^{ab} | 1,421 ^{ab} | 38,276 ^{bc} | 54,244 ^{abc} |
| LGMB76 (CV) <i>Pseudomonas</i> sp3. | 334,75 ^a | 252,43 ^{ab} | 0,471 ^{ab} | 1,598 ^a | 39,008 ^{abc} | 62,278 ^{ab} |
| LGMB81 (CV) <i>Pseudomonas</i> sp5. | 229,75 ^a | 194,25 ^{ab} | 0,413 ^{ab} | 1,071 ^{ab} | 34,274 ^c | 36,660 ^c |
| LGMB82 (CV) <i>Pseudomonas</i> sp5. | 315,50 ^a | 266,30 ^a | 0,441 ^{ab} | 1,383 ^{ab} | 45,052 ^a | 62,320 ^{ab} |
| LGMB83 (CV) <i>Bacillus</i> sp2. | 304,00 ^a | 227,85 ^{ab} | 0,438 ^{ab} | 1,220 ^{ab} | 37,752 ^{bc} | 46,395 ^{abc} |
| LGMB100 (CV) <i>Pseudomonas</i> sp4. | 309,50 ^a | 240,43 ^{ab} | 0,516 ^a | 1,276 ^{ab} | 37,188 ^{bc} | 47,183 ^{abc} |
| LGMB106 (CV) <i>Pseudomonas</i> sp2. | 299,50 ^a | 231,70 ^{ab} | 0,470 ^{ab} | 1,306 ^{ab} | 36,672 ^{bc} | 47,973 ^{abc} |
| LGMB110 (CV) <i>Bacillus</i> sp3. | 224,50 ^a | 208,85 ^{ab} | 0,385 ^{ab} | 1,168 ^{ab} | 35,450 ^{bc} | 41,046 ^{abc} |
| Controle sem inóculo | 0,00 ^b | 0,000 ^c | 0,433 ^{ab} | 0,395 ^c | 25,186 ^d | 11,627 ^d |
| <i>R. freirei</i> PRF81^T | 356,25 ^a | 283,80 ^a | 0,502 ^a | 1,571 ^a | 36,008 ^{bc} | 56,894 ^{abc} |

TABELA 2 – TEOR DE NITROGÊNIO E N TOTAL DA PARTE AÉREA, NÚMERO DE NÓDULOS, MASSA SECA DA RAIZ, DOS NÓDULOS E DA PARTE AÉREA DAS PLANTAS COINOCULADAS COM OS ISOLADOS UTILIZADOS NESSE ESTUDO E *R. freirei* PRF81^T

NOTA: Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. C – isolados de plantas cultivadas em campo; CV – isolados de plantas cultivadas em casa de vegetação

Discussão

O processo nodulatório em leguminosas é estabelecido por bactérias do grupo dos rizóbios e espera-se que a ocupação dessas estruturas seja realizada exclusivamente por espécies pertencentes a este grupo. No entanto, esse fato não foi observado quando as sequências do gene ribossomal 16S rRNA de isolados de nódulos de feijoeiro comum foram avaliadas. Com base na classificação obtida pela

análise dessa região, entre os gêneros extras ao *Rhizobium*, houve predominância de *Pseudomonas*, especialmente em plantas cultivadas em casa de vegetação. Esse fato já foi observado por Sharma, Gaur, Choudhary (2012) entre isolados de nódulos radiculares de *Cicer arietinum* L. e *Vigna aconitifolia* L, sendo que as bactérias apresentaram produção de AIA e sideróforos, além da capacidade de solubilizar fosfato inorgânico. Esses dados demonstram que diferentes bactérias podem ser encontradas colonizando nódulos radiculares de leguminosas, beneficiando a planta por um ou mais mecanismos. Além disso, a presença de *Pseudomonas* spp. nessas estruturas foi descrita por Issar *et al.* (2012), que isolaram diferentes espécies desse gênero a partir de nódulos radiculares de cinco espécies: *Trifolium pretense*, *Cicer arietinum*, *Amaranthus polygamus*, *Vigna mungo*, e *Trigonella foenum*. Ainda, diversos mecanismos de promoção de crescimento vegetal já foram observados em *Pseudomonas* spp., sendo que alguns exemplos são produção de AIA e sideróforos, e solubilização de fosfatos por *P. putida* e *P. aeruginosa* (AHEMAD; KHAN, 2010; AHEMAD; KHAN, 2011a, 2011b; AHEMAD; KHAN, 2012a, 2012b, 2012c); e produção de sideróforos por *P. fluorescens* (BRAUD *et al.*, 2009). Isto também está em concordância com os resultados obtidos nesse trabalho, sendo que todas as bactérias apresentaram pelo menos um dos mecanismos de promoção de crescimento avaliados. Todos os isolados identificados como *Pseudomonas* spp. produziram sideróforos, além de apresentarem resistência a alta temperatura (*Pseudomonas* sp3. LGMB76) e ao pH ácido (demais isolados), características predominantes no solo brasileiro. Esses resultados demonstram o potencial de espécies desse gênero na promoção do crescimento vegetal e capacidade de desenvolvimento em condições ambientais adversas.

Diversos estudos realizados associando-se rizóbios a PGPR já foram realizados em leguminosas. Malik; Sindhu (2011) observaram aumento na nodulação e massa seca da planta, utilizando uma linhagem produtora de AIA associada à *Mesorhizobium* sp. em grão de bico. No presente estudo, a maior produção de AIA foi observada em LGMB82 (CV)(75,68 µg/mL), que também foi capaz de solubilizar fosfato inorgânico, onde os isolados LGMB34 (C) e LGMB67 (C) apresentaram média capacidade de solubilização dos sais utilizados. Entretanto, não promoveram aumento na nodulação. Por outro lado, o uso de LGMB67 (C) e LGMB82 (CV) associados ao rizóbio apresentaram índices de N (64,408 mg/pl e 62,320 mg/pl, respectivamente) superiores ao padrão comercial, quando utilizado

isoladamente (56,894 mg/pl). Esse resultado também foi observado por Stajkovic *et al.* (2011) em feijoeiro comum coinoculado com *R. phaseoli* e *Pseudomonas* sp, indicando um desempenho superior do rizóbio quando associado a PGPR no nódulo. Sendo assim, LGMB67 e LGMB82 apresentaram resposta favorável no desenvolvimento vegetal, quando associados ao rizóbio, demonstrando o potencial dessa interação no incremento da produção na cultura de *P. vulgaris*.

A presença de *Bacillus* spp. em nódulos e sementes de leguminosas tem sido descrita por diversos autores (BAI *et al.*, 2002; STAJKOVIC *et al.*, 2009; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2010; PALANIAPPAN *et al.*, 2010; TARIQ *et al.*, 2012), e vários mecanismos de promoção de crescimento em plantas tem sido identificados (JOSEPH; PATRA; LAWRENCE, 2007; WANI; KHAN; ZAIDI, 2007; AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008; PALANIAPPAN *et al.*, 2010; WANI; KHAN, 2010). Nesse trabalho, dos seis isolados classificados como *Bacillus* sp., quatro são provenientes de plantas cultivadas a campo. Considerando que LGMB43 (C) apresentou produção significativa de AIA, que nenhum dos isolados desse gênero foi capaz de solubilizar fosfato, mas que todos produziram sideróforos (com exceção de LGMB8), pode-se verificar que estas bactérias podem contribuir favoravelmente com um ou mais parâmetros para a FBN ou promoção de crescimento. Ainda, de acordo com estes resultados, não há sustentação bioquímica que permita a identificação de todas as variáveis produzindo uma “super” linhagem. É necessário levar em conta o tipo de resposta buscado como critério de seleção, embora os isolados também não tenham contribuído para o aumento do desempenho do padrão *Rhizobium freirei* PRF81^T na eficiência simbiótica. Por outro lado, a atuação de algumas espécies do gênero *Bacillus*, quando utilizadas coinoculadas com rizóbios, já foi avaliada quanto à capacidade de aumentar a produtividade de algumas culturas, apresentando resultados positivos. Dentre as contribuições desses microrganismos estão o aumento da produção de grãos, da massa total das plantas, da concentração de leghemoglobina e atividade da nitrogenase (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; TARIQ *et al.*, 2012).

Uma menor frequência de isolados por gênero identificado aparece em *Xanthomonas*, que agrupa com o LGMB5 (C), *Brevundimonas* com o LGMB25 (C) e *Burkholderia* com o LGMB50 (C), todos provenientes de plantas cultivadas a campo. LGMB72 (CV) agrupa com *Enterobacter*, e foi isolado de planta cultivada em casa de vegetação. LGMB72 (CV) foi capaz de solubilizar fostato e produziu a maior

concentração de AIA (293,79 µg/mL), entre todos os isolados utilizados neste trabalho. Além disso, se adaptou a diferentes meios de cultivo e resistiu a alta temperatura e ao baixo pH, demonstrando seu potencial na contribuição do desenvolvimento vegetal e resistência a condições ambientais estressantes. Vários mecanismos de promoção de crescimento utilizados por *Enterobacter* spp. foram descritos por Kumar *et al.* (2008) e Ahemad; Khan (2010), o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Ainda, a produção de AIA e de sideróforos, além da solubilização de fosfatos também já foram descritas para *Xanthomonas* spp. (SHENG; XIA, 2006) e *Burkholderia* spp. (JIANG *et al.*, 2008). LGMB5 (*Xanthomonas* sp.) apresentou resposta favorável na eficiência simbiótica, quando associado com a linhagem padrão de *Rhizobium*, e LGMB50 (*Burkholderia* sp.) mostrou-se capaz de se desenvolver em diferentes meios de cultivo, além de resistir a temperatura de 40°C e pH 4,0.

A sequência que codifica a subunidade ribossômica 16S rRNA possui nove regiões variáveis (VAN de PEER; CHAPELLE; de WACHTER, 1996), sendo que os fragmentos analisados para todos os gêneros encontrados compreendem algumas das regiões informativas, possibilitando portanto, a classificação ao nível de gênero. Devido à proximidade entre as linhagens de referência utilizadas na análise filogenética, não foi possível identificar os isolados em nível de espécie, sendo necessário o uso de mais sequências codificantes para realizar um posicionamento taxonômico mais preciso (GEVERS *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2005; THOMPSON; SWINGS, 2006; MARTENS *et al.*, 2007; MARTENS *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009, 2012; DEGEFU; WOLDE-MESKEL; FROSTEGARD, 2011; KAWAGUCHI, 2011; LU *et al.*, 2011; LARANJO; YOUNG; OLIVEIRA, 2012; DALL'AGNOL *et al.*, 2013). Entretanto, as informações obtidas já foram suficientes para observar a maior diversidade de gêneros entre os isolados provenientes de plantas cultivadas em condições de campo, em relação às bactérias originadas de casa de vegetação. No entanto, ao analisar a árvore filogenética obtida neste trabalho, observa-se que os isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* podem ser classificados em diferentes espécies, o que aumenta a diversidade das bactérias obtidas a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação. Em contraste aos resultados obtidos por Oliveira-Franceschini *et al.* (2014, em preparação), onde a capacidade nodulatória de rizóbios foi condicionada

pelo sistema de cultivo em plantas de *P. vulgaris*, nesse estudo não foi observada colonização de nódulos de acordo com o ambiente.

A contaminação de rios e solos resultante do uso dos fertilizantes contrapõe seu benefício de suprir as necessidades de elementos como o fósforo e o nitrogênio nas culturas de grãos, além de elevar substancialmente o custo de produção. Esta é a razão da crescente pesquisa que permita apresentar alternativas sustentáveis e que minimizem o custo do pacote tecnológico da produção de culturas importantes (MALFANOVA, 2013), como a do feijoeiro. A utilização de microrganismos capazes de fornecer os nutrientes necessários para a planta a partir do ambiente é uma alternativa para a substituição da adubação química. Sendo assim, a fixação biológica do nitrogênio realizada pelos rizóbios é a principal fonte deste elemento (VANCE, 2001) e a atuação sinérgica de algumas PGPR pode contribuir para o fornecimento de outros nutrientes, dentre eles o fósforo (EMBRAPA, 1999; KHAN *et al.*, 2009). De acordo com os resultados dos testes de promoção de crescimento vegetal realizados com as bactérias utilizadas neste estudo, os microrganismos associados à *Rhizobium freirei* PRF81^T nos nódulos possivelmente exercem alguma função no desenvolvimento das plantas, além de contribuir para o aumento da FBN por rizóbios.

Apesar de não apresentarem resposta significativa na nodulação quando coinoculados com a linhagem comercial de *Rhizobium*, todos os isolados foram capazes de responder favoravelmente ao menos a um dos fatores envolvidos na promoção de crescimento vegetal, além de promoverem aumento da concentração de nitrogênio na sua parte aérea. Tendo em vista essas avaliações, as bactérias originadas do cultivo em casa de vegetação apresentaram melhor desempenho quanto aos mecanismos apresentados por PGPR, em relação aos provenientes de campo. Isto pode ser evidenciado especialmente no isolado LGMB72 (*Enterobacter* sp. - CV), que apresentou a maior produção de AIA, o melhor desenvolvimento nas condições adversas, além de produzir sideróforos e solubilizar fosfatos (TABELA 1). Ainda, considerando o efeito na eficiência simbiótica quando associados a rizóbios, dois isolados de campo (LGMB5 – *Xanthomonas* sp. e LGMB67 – *Pseudomonas* sp2.) e dois de casa de vegetação (LGMB76 – *Pseudomonas* sp3. e LGMB82 – *Pseudomonas* sp5.) apresentaram resposta favorável, demonstrando seu potencial benefício no desenvolvimento vegetal, podendo contribuir para o aumento da produtividade da cultura do feijoeiro.

Referências

- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p.173-181, 2008.
- AHEMAD, M; KHAN, M.S. Phosphate-solubilizing and plant growth-promoting *Pseudomonas aeruginosa* PS1 improves greengram performance in quizalafop-p-ethyl and clodinafop amended soil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.58, p.361-372, 2010.
- AHEMAD, M; KHAN, M.S. Toxicological assessment of selective pesticides towards plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.58, p.169-187, 2011a.
- AHEMAD, M; KHAN, M.S. *Pseudomonas aeruginosa* strain PS1 enhances growth parameters of greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] in insecticide-stressed soils. **Journal of Pest Sciences**, v.84, p.123-131, 2011b.
- AHEMAD, M; KHAN, M.S. Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. **Chemosphere**, v.86, p.945-950, 2012a.
- AHEMAD, M; KHAN, M.S. Evaluation of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide-stress. **Annals of Microbiology**, v.62, p.1531-1540, 2012b.
- AHEMAD, M; KHAN, M.S. Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.19, p.451-459, 2012c.
- ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1298-1307, 2006.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. USA: Association of Official Analytical Chemists Inc., 1995.
- ARAÚJO, F.F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.9, p.1633-1643, 1999.
- BAI, Y.; D'AOUST, F.; SMITH, D.L.; DRISCOLL, B.T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.230-238, 2002.
- BERTANI, G. Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.62, p.293-300, 1951.

BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1327-1350, 2012.

BRAUD, A.; JÉZÉQUEL, K.; BAZOT, S.; LEBEAU, T. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr-, Hg- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore producing bacteria. **Chemosphere**, v.74, p. 280-286, 2009.

BROUGHTON, W.J.; DILWORTH, M.J. Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. **Biochemical Journal**, p.1075-1080, 1971.

CHAGAS JUNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A.; OLIVEIRA, A.N.; WILLERDING, A.L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.2, p.359-366, 2010.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, K.; McGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v.37, p.141-145, 2009.

DALL'AGNOL, R.F.; RIBEIRO, R.A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.A.; DELAMUTA, J.R.M.; ANDRADE, D.S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium freirei*, a symbiont of *Phaseolus vulgaris* very effective in fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2013. (online, DOI: 10.1099/ijs.0.052928-0).

DEGEFU, T.; WOLDE-MESKEL, E.; FROSTEGARD, A. Multilocus sequence analyses reveal several unnamed *Mesorhizobium* genospecies nodulating *Acacia* species and *Sesbania sesban* trees in Southern regions of Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology**, v.34, p.216-226, 2011.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, n.2, p.107–149, 2003.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Métodos Qualitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**, Documentos, v.139, 1999.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**, Documentos, v.161, 2003.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2007. **Origem e história do feijão**. Disponível em <<http://www.cnpaf.embrapa.br>> Acesso em 13 de janeiro de 2014.

FIGUEIREDO, M.V.B.; MARTINEZ, C.R.; BURITY, H.A.; CHANWAY, C.P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.1187-1193, 2008.

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

GIONGO, A.; PASSAGLIA, L.M.P.; FREIRE, J.R.J.; SÁ, E.L.S. de. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p.593-598, 2007.

GLICK, B.R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Hindawi Publishing Corporation**, 2012.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1389-1398, 2004.

HUNGRIA, M., ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.M.O., PROBANZA, A., GUITIERREZ-MANERO, F.J., MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, n. 21, p. 1515-1528, 2000.

INDIRAGANDHI, P.; ANANDHAM, R., MADHAIYAN, M.; SA, T.M. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Current Microbiology**, v.56, p.327-333, 2008.

ISSAR, S.; SHARMA, S.; CHOUDHARY, D.K.; GAUTAM, H.K.; GAUR, R.K. Molecular characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from root nodules of various leguminous plants of Shekhawati region, Rajasthan, India. **American Journal of Plant Sciences**, v.3, p.60-63, 2012.

JIANG, C.; SHENG, X.; QIAN, M.; WANG, Q. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal polluted soil. **Chemosphere**, v.72, p.157-164, 2008.

JOSEPH, B.; PATRA, R.R.; LAWRENCE, R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Plant Production**, v.2, p.141-152, 2007.

KASCHUK, G., HUNGRIA, M., SANTOS, J.C.P., BERTON-JUNIOR, J.F. Differences in common beans rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v.87, n.2, p.205-217, 2006.

KAWAGUCHI, A. Genetic diversity of *Rhizobium vitis* strains in Japan based on multilocus sequence analysis of *pyrG*, *recA* and *rpoD*. **Journal of General Plant Pathology**, v.77, p.299-303, 2011.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.27, p.29-43, 2006.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A.; OVES, M. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. **Environmental Chemistry**, lett.7, p.1-19, 2009.

KIM, K. Y., JORDAN, D., McDONALD, G. A. Effects of phosphate solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, n.26, p.79–87, 1998.

KUMAR, K.V.; SINGH, N.; BEHL, H.M.; SRIVASTAVA, S. Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in *Brassica juncea* grown in fly ash amended soil. **Chemosphere**, v.72, p.678-683, 2008.

KUSS, A.N.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1459-1465, 2007.

LARANJO, M.; YOUNG, J.P.W.; OLIVEIRA, S. Multilocus sequence analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, p.359-367, 2012.

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

LU, J.; KANG, L.; HE, X.; XU, D. Multilocus sequence analysis of the Rhizobia from five woody legumes in southern China. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, p.5343-5353, 2011.

MALFANOVA, N.V. Endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol abilities. In: de BRUIJN, F.J. Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere. **Wiley-Blackwell**, 2013.

MALIK, D.K.; SINDHU, S.S. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.17, p.25-32, 2011.

MANULIS, S.; HAVIV-CHESNER, A.; BRANDI, M.T.; LINDOW, S.E.; BARASH, I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*e. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, n.7, p.634-642, 1998.

- MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; de VOS, P.; WILLWMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.200-214, 2008.
- MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; de VOS, P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.489-503, 2007.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E., SEGOVIA, L., MERCANTE, F.M., FRANCO, A.A., GRAHAN, P., PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*: a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 41, p. 417-426, 1991.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.4, p.315-332, 2006.
- NEILANDS, J.B.; LEONG, S.A. Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annual Reviews in Plant Physiology**, v.37, p.187-208, 1986.
- OLIVEIRA, J.P.; GALLI-TERASAWA, L.; GLIENKE, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; ARMSTRONG, L.C.T.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of rhizobia in a Brazilian oxisol nodulating Mesoamerican and Andean genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.643-650, 2011.
- PALANIAPPAN, P.; CHAUHAN, P.S.; SARAVANAN, V.S.; ANANDHAM, R.; SA, T. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology and Fertility of Soils**, v.46, p.807-816, 2010.
- RAJKUMAR, M.; AE, N.; PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v.28, p.142-149, 2010.
- RIBEIRO, R.A.; BARCELLOS, F.G.; THOMPSON, F.L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v.160, p.297-306, 2009.
- RIBEIRO, R.A.; ROGEL, M.A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; BARCELLOS, F.G.; MARTÍNEZ, J.; THOMPSON, F.L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, n.5. p.1180-1185, 2012.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; van der MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; H'OHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v.61, p.539-542, 2012.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal assay for detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.

SHARMA, S.; GAUR, R.K.; CHOUDARY, D.K. Phenetic and functional characterization of endophytic root-nodule bacteria isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and mothbean (*Vigna aconitifolia* L.) of arid and semi-arid regions of Rajasthan, India. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.15, p.889-894, 2012.

SHENG, X.F.; XIA, J.J. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. **Chemosphere**, v.64, p.1036-1042, 2006.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook of Rhizobia – Methods in Legume Rhizobium Technology**. Springer, 450 p., 1994.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, p.425-448, 2007.

STAJKOVIC, O.; DELIC, D.; JOSIC, D'; KUZMANOVIC, D.; RASULIC, N.; KNEZEVIC-VUKCEVIC, J. Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, v.16, p.5919-5926, 2011.

STAJKOVIC, O.; de MEYER, S.; MILICIC, B.; WILLEMS, A.; DELIC, D. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Botanica Serbica**, v.33, p.107-114, 2009.

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.

SUMAN, A.; SHASANY, A.K.; SINGH, M.; SHAHI, H.N.; GAUR, A.; KHANUJA, S.P.S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.39-45, 2001.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.

TARIQ, M.; HAMEED, S.; YASMEEN, T.; ALI, A. Non-rhizobial bacteria for improved nodulation and grain yield of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.15012-15019, 2012.

TENUTA, M. Plant growth promoting rhizobacteria: prospects for increasing nutrient acquisition and disease control. **Proceedings of 2003 Manitoba Agronomists Conference**, p. 72-77, 2003.

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.

THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Taxonomy of vibrios. In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J. (Eds). **The Biology of Vibrios**, Washington, DC: ASM Press, 2006.

VAN de PEER, Y.; CHAPELLE, S.; de WACHTER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Research**, v.24, n.17, p.3381-3391, 1996.

VANCE, C.P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition: plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, v.127, p.390-397, 2001.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, n.255, p.571-586, 2003.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study for root nodule bacteria**. Oxford: Blacwell, 1970, 164 p.

WANI, P.A.; KHAN, M.S. *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.3262-3267, 2010.

WANI, P.A.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.170, p.283-287, 2007.

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

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

ZAIDI, A.; KHAN, M.S.; AHEMAD, M.; OVES, M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.56, p.263-284, 2009.

4. DISCUSSÃO GERAL

A caracterização genética dos isolados de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, utilizados neste estudo, demonstrou grande diversidade de bactérias, expressa por diferentes gêneros, aonde era esperada a presença exclusiva de *Rhizobium*. No entanto, já tem sido relatada a ocupação natural destas bactérias em nódulos de leguminosas (BAI *et al.*, 2002; STAJKOVIC *et al.*, 2009; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*; 2010; PALANIAPPAN *et al.*, 2010; ISSAR *et al.*, 2012; SHARMA; GAUR; CHOUDHARY, 2012; TARIQ *et al.*, 2012). Esses microrganismos possivelmente exercem alguma função no desenvolvimento do hospedeiro, o que foi demonstrado pelos resultados dos testes que avaliaram a capacidade dos isolados na promoção de crescimento vegetal. Todos eles apresentaram ao menos um dos mecanismos analisados (produção de AIA, produção de sideróforos e solubilização de fosfato), além do incremento nos índices de nitrogênio na parte aérea das plantas, quando associados a rizóbios. Considerando essa interação, os isolados mais promissores para o incremento na produtividade do feijoeiro foram LGMB5 (*Xanthomonas* sp.), LGMB67 (*Pseudomonas* sp2.), LGMB76 (*Pseudomonas* sp3.) e LGMB82 (*Pseudomonas* sp5.).

A influência do sistema de cultivo pode ser observada na competitividade dos rizóbios que estabeleceram nodulação, assim como em seus resultados nos testes de eficiência simbiótica, sendo que as bactérias provenientes de condições de casa de vegetação apresentaram os maiores índices de N fixado na planta. Desta forma, LGMB73 mostrou-se o isolado mais promissor para a produção de inoculantes. Além disso, as bactérias obtidas a partir deste sistema de cultivo, não classificadas como *Rhizobium*, apresentaram os melhores índices nos testes que avaliaram a capacidade de promoção de crescimento vegetal, com bons resultados na produção de AIA e de sideróforos, além da capacidade de solubilizar fosfato. Em plantas cultivadas a campo, bactérias pouco competitivas foram capazes de estabelecer nodulação, fato que foi demonstrado pela maior diversidade genética de *Rhizobium* spp., e confirmado por sua baixa eficiência simbiótica (com exceção de LGMB61). Por outro lado, isolados provenientes de casa de vegetação apresentaram baixa diversidade e alta eficiência simbiótica. Diferentes índices de diversidade em resposta ao sistema de cultivo já foram observados em rizóbios, em

diversos estudos utilizando elementos repetitivos do genoma (GRANGE; HUNGRIA, 2004; ALBERTON; KASCHUK; HUNGRIA, 2006; KASCHUK *et al.*, 2006; GIONGO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011). No presente trabalho, a diversidade foi confirmada através da caracterização genética por meio de sequenciamento dos genes *glnII*, *gyrB*, *recA*, além do 16S rRNA.

Considerando somente o grupo dos rizóbios, apenas *R. miluonense* foi isolado de plantas cultivadas em casa de vegetação. Diferente do esperado e descrito na literatura, essas bactérias apresentaram os melhores resultados no experimento de eficiência simbiótica. O principal hospedeiro dessa espécie é *Lespedeza* sp., sendo capaz de estabelecer nodulação em *P. vulgaris*, porém ineficiente na fixação de nitrogênio (GU *et al.*, 2008). Esses dados sugerem a transferência do plasmídeo simbiótico típico de espécies capazes de nodular o feijoeiro, para *R. miluonense*. Por outro lado, bactérias dos grupos de *R. leguminosarum* e *R. radiobacter* estão presentes entre os isolados de campo. De acordo com as árvores obtidas na análise filogenética, considerando os genes *housekeeping*, as bactérias classificadas como *R. leguminosarum* (por meio de seqüências de 16S rRNA) formam um grupo com a linhagem WSM2304, separado das demais linhagens utilizadas como referência dessa espécie, com forte suporte estatístico. Isto foi observado tanto nas árvores filogenéticas individuais de cada gene, quanto na concatenada, sendo que estas bactérias devem ser descritas como espécie nova. Resultados semelhantes foram obtidos por Ribeiro *et al.* (2013), utilizando os mesmos genes. Em relação a *R. radiobacter*, a ausência do gene *nifH* e ineficiência simbiótica estão de acordo com estudos realizados por Mhamdi *et al.* (2005), que descrevem a capacidade desta espécie de colonizar nódulos, porém sem a presença do plasmídeo simbiótico. Além disso, LGMB9 mostrou-se geneticamente similar a linhagem tipo de *R. radiobacter* (ATCC19358^T) enquanto que LGMB26 agrupou com *Rhizobium* sp2. C58, que devem ser avaliados quanto a sua classificação ao nível de espécie.

Os demais gêneros isolados dos nódulos de feijoeiro utilizados nesse estudo foram *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, sendo *Pseudomonas* predominante em casa de vegetação. Como descrito anteriormente, bactérias provenientes desse sistema de cultivo apresentaram os melhores resultados nos testes de promoção de crescimento. Vários mecanismos de atuação no desenvolvimento vegetal tem sido descritos para

essas bactérias, incluindo os avaliados neste estudo (produção de AIA e sideróforos, solubilização de fosfatos)(SHENG; XIA, 2006; JIANG *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2008; BRAUD *et al.*, 2009; PALANIAPPAN *et al.*, 2010; AHEMAD; KHAN, 2012). Quanto ao seu efeito na eficiência simbiótica em associação com rizóbios, dois isolados de campo (LGMB5 e LGMB67) e dois de casa de vegetação (LGMB76 e LGMB82) apresentaram resultados favoráveis no desenvolvimento da planta.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- O centro de origem da planta hospedeira (*Phaseolus vulgaris* L.) não influenciou na colonização dos isolados.
- O sistema de cultivo interferiu na capacidade nodulatória de rizóbios, sendo que maior diversidade genética foi observada entre isolados de plantas cultivadas a campo.
- Os isolados provenientes de plantas cultivadas em casa de vegetação foram classificados como *R. miluonense*, enquanto que os provenientes de plantas cultivadas em campo foram distribuídos em *Rhizobium* sp1., *Rhizobium* sp2. e *R. radiobacter*.
- As bactérias classificadas como *R. miluonense* apresentaram os melhores resultados na avaliação da eficiência simbiótica, cuja linhagem tipo forma apenas nódulos ineficientes em *P. vulgaris*.
- *R. miluonense* LGMB73 mostrou-se o isolado mais promissor para a produção de inoculantes.
- Os isolados não classificados como *Rhizobium* (LGMB5 – *Xanthomonas* sp.; LGMB67 – *Pseudomonas* sp2.; LGMB76 – *Pseudomonas* sp3. e LGMB82 – *Pseudomonas* sp5.) também apresentaram bons resultados quanto ao aumento da fixação de nitrogênio, quando coinoculados com *R. freirei* PRF81^T.
- Isolados classificados como *R. leguminosarum* por meio do 16S rRNA, assim como a linhagem WSM2304, devem ser descritos como nova espécie.

- Para o grupo de *R. leguminosarum*, a análise filogenética baseada no gene 16S rRNA mostrou-se insuficiente para a classificação taxonômica a nível de espécie, sendo necessário, portanto, o uso de MLSA.
- Em relação ao grupo de *R. radiobacter*, LGMB26 mostrou-se similar a *Rhizobium* sp2. C58, e não foram posicionados no ramo da linhagem tipo *R. radiobacter* ATCC19358^T. LGMB9 foi classificado como *R. radiobacter* e apresentou resultados contrastantes a LGMB26 na eficiência simbiótica.
- Estudos mais aprofundados devem ser realizados para classificar LGMB26 ao nível de espécie, assim como a linhagem utilizada como referência *Rhizobium* sp2. C58, atualmente classificada como *R. radiobacter*.
- Considerando os testes que avaliaram a capacidade das bactérias de promoverem crescimento vegetal, os isolados de casa de vegetação apresentaram os melhores resultados (LGMB72 – *Enterobacter* sp. e LGMB82 – *Pseudomonas* sp5.).

Referências

AHEMAD, M; KHAN, M.S. Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. **Chemosphere**, v.86, p.945-950, 2012.

ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1298-1307, 2006.

BAI, Y.; D'AOUST, F.; SMITH, D.L.; DRISCOLL, B.T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.230-238, 2002.

BRAUD, A.; JÉZÉQUEL, K.; BAZOT, S.; LEBEAU, T. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr-, Hg- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore producing bacteria. **Chemosphere**, v.74, p. 280-286, 2009.

GIONGO, A.; PASSAGLIA, L.M.P.; FREIRE, J.R.J.; SÁ, E.L.S. de. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p.593-598, 2007.

GRANGE, L., HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 36, p. 1389-1398, 2004.

GU, C.T.; WANG, E.T.; TIAN, C.F.; HAN, T.X.; CHEN, W.F.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.1364–1368, 2008.

ISSAR, S.; SHARMA, S.; CHOUDHARY, D.K.; GAUTAM, H.K.; GAUR, R.K. Molecular characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from root nodules of various leguminous plants of Shekhawati region, Rajasthan, India. **American Journal of Plant Sciences**, v.3, p.60-63, 2012.

JIANG, C.; SHENG, X.; QIAN, M.; WANG, Q. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal polluted soil. **Chemosphere**, v.72, p.157-164, 2008.

KASCHUK, G., HUNGRIA, M., SANTOS, J.C.P., BERTON-JUNIOR, J.F. Differences in common beans rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v.87, n.2, p.205-217, 2006.

KUMAR, K.V.; SINGH, N.; BEHL, H.M.; SRIVASTAVA, S. Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in *Brassica juncea* grown in fly ash amended soil. **Chemosphere**, v.72, p.678-683, 2008.

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

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

OLIVEIRA, J.P.; GALLI-TERASAWA, L.; GLIENKE, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; ARMSTRONG, L.C.T.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of rhizobia in a Brazilian oxisol nodulating Mesoamerican and Andean genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.643-650, 2011.

PALANIAPPAN, P.; CHAUHAN, P.S.; SARAVANAN, V.S.; ANANDHAM, R.; SA, T. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology and Fertility of Soils**, v.46, p.807-816, 2010.

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

SHARMA, S.; GAUR, R.K.; CHOUDARY, D.K. Phenetic and functional characterization of endophytic root-nodule bacteria isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and mothbean (*Vigna aconitifolia* L.) of arid and semi-arid regions of Rajasthan, India. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.15, p.889-894, 2012.

SHENG, X.F.; XIA, J.J. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. **Chemosphere**, v.64, p.1036-1042, 2006.

STAJKOVIC, O.; de MEYER, S.; MILICIC, B.; WILLEMS, A.; DELIC, D. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Botanica Serbica**, v.33, p.107-114, 2009.

TARIQ, M.; HAMEED, S.; YASMEEN, T.; ALI, A. Non-rhizobial bacteria for improved nodulation and grain yield of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.15012-15019, 2012.

APÊNDICE

MATERIAL E MÉTODOS

1. Meios de Cultura

1.1. Meio YMA (VINCENT, 1970)

| | |
|--|--------|
| Manitol | 10,0 g |
| K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 0,5 g |
| NaCl | 0,1 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 g |
| Extrato de Levedura | 1,0 g |
| Ágar | 15,0 g |

O volume final foi completado para 1000 mL com água purificada. O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 com NaOH 1 M e/ou HCl 1 N conforme a necessidade. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

1.2. Meio YMA-Azul de Bromotimol

Foi adicionado ao volume final de 1000 mL do Meio YMA 5 mL do corante Azul de Bromotimol (0,5%). O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 e o meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

1.3. Meio LB (BERTANI, 1951)

| | |
|---------------------|------|
| Triptona | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| Extrato de levedura | 5 g |
| Ágar | 5 g |

O volume final foi completado para 1000 mL com água purificada. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 M e/ou HCl 1 N conforme a necessidade. O meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

1.4. Meio PY-Ca (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991)

| | |
|---------------------|------|
| Peptona | 5 g |
| Extrato de levedura | 3 g |
| Ágar | 15 g |

O volume final foi completado para 1000 mL com água purificada. O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 com NaOH 1 M e/ou HCl 1 N conforme a necessidade. O meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

1.5. Meio TY (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994)

| | |
|---------------------|-------|
| Triptona | 5 g |
| Extrato de levedura | 3 g |
| CaCl ₂ | 0,9 g |
| Ágar | 15 g |

O volume final foi completado para 1000 mL com água purificada. O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 com NaOH 1 M e/ou HCl 1 N conforme a necessidade. O meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

1.6. Meio TY pH 4,0 (HUNGRIA *et al.*, 2000)

| | |
|---------------------|-------|
| Triptona | 5 g |
| Extrato de levedura | 3 g |
| CaCl ₂ | 0,9 g |

O volume final foi completado para 1000 mL com água purificada. O pH foi ajustado para 4,0 com NaOH 1 M e/ou HCl 1 N conforme a necessidade. O meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

1.7. Meio DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JUNIOR, VICTOR, 1986)

| | |
|------------------------|--------|
| Dextrose | 2,0 g |
| Peptona | 1,5 g |
| Extrato de levedura | 2,0 g |
| $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ | 0,5 g |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,5 g |
| Ácido L-glutâmico | 1,5 g |
| Ágar | 15,0 g |

O volume final foi completado para 1000 mL com água purificada. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 M e/ou HCl 1 N conforme a necessidade. O meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

1.8. Meio GL (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010)

| | |
|---------------------|--------|
| Glicose | 10,0 g |
| Extrato de levedura | 2,0 g |
| Ágar | 15,0 g |

O volume final foi completado para 1000 mL com água purificada. O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 1 M e/ou HCl 1 N conforme a necessidade. O meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

2. Soluções e Reagentes

2.1. NaCl 0,25 M

| | |
|-----------------|------------|
| NaCl | 14,61 g |
| Água purificada | p/ 1000 mL |

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.2. Acetato de Sódio 0,3 M

| | |
|-------------------------|------------|
| Acetato de Sódio Anidro | 24,63 g |
| Água purificada | p/ 1000 mL |

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.3. SDS 10%

| | |
|--------------------------|----------|
| Dodecil sulfato de sódio | 10 g |
| Água purificada | p/100 mL |

A solução foi autoclavada e mantida a temperatura ambiente.

2.4. Solução Salina 0,85%

| | |
|-----------------|------------|
| NaCl | 8,5 g |
| Água purificada | p/ 1000 mL |

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.5. EDTA 0,5 M

| | |
|-----------------|-----------|
| EDTA | 37,22 g |
| Água purificada | p/ 200 mL |

O pH foi ajustado para 8,0 com a adição de NaOH 1 M.

2.6. Tris HCl-EDTA (TE) 10:1

| | |
|---------------------|-----------|
| Tris-HCl 1 M pH 8,0 | 1 mL |
| EDTA 0,5 M pH 8,0 | 0,2 mL |
| Água purificada | p/ 100 mL |

2.7. Tris HCl-EDTA (TE) 50:20

| | |
|---------------------|-----------|
| Tris-HCl 1 M pH 8,0 | 5 mL |
| EDTA 0,5 M pH 8,0 | 4 mL |
| Água purificada | p/ 100 mL |

2.8. Tris HCl-EDTA (TE) 100:50

| | |
|---------------------|-----------|
| Tris-HCl 1 M pH 8,0 | 10 mL |
| EDTA 0,5 M pH 8,0 | 10 mL |
| Água purificada | p/ 100 mL |

2.9. PBS

| | |
|---|-----------|
| NaCl | 1,745 g |
| Na ₂ HPO ₄ anidro | 0,568 g |
| Água purificada | p/ 100 mL |

O pH foi ajustado para 7,4 com HCl 1 M. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.10. DNA polimerase

A enzima Taq DNA polimerase utilizada nas reações de amplificação foi da marca Invitrogen, na concentração de 5 U/uL.

2.11. dNTPs

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dAPT, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100 mM), foram diluídos em água ultra pura a 2,5 mM (solução de uso). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,3 mM de cada dNTP.

2.12. Gel de Agarose (0,8%)

| | |
|---------------|--------|
| Agarose | 0,8 g |
| Tampão TBE 1x | 100 mL |

2.13. Gel e Agarose (1,5%)

| | |
|---------------|--------|
| Agarose | 1,5 g |
| Tampão TBE 1x | 100 mL |

2.14. Marcador de peso molecular (DNA *Ladder* 100pb LUDWIG BIOTEC)

O marcador de peso molecular foi diluído no momento do uso na proporção de: 1 μ L de marcador : 1 μ L do tampão da amostra : 4 μ L de água ultra pura autoclavada.

2.15. Marcador de peso molecular (DNA de fago lambda clivado com Hind III Gibco)

O marcador de peso molecular foi diluído no momento do uso na proporção de: 1 μ L de marcador : 1 μ L do tampão da amostra : 4 μ L de água ultra pura autoclavada.

2.16. Solução de Brometo de Etídio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989)

Foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitando-se por várias horas. A solução foi estocada à temperatura ambiente. Para revelação, diluiu-se 5 μ L em 100 μ L de água destilada.

2.17. Tampão de Corrida TBE 10x pH 8,0

| | |
|----------------------------|-----------|
| Tris base | 54 g |
| Ácido Bórico (H_3BO_3) | 27,5 g |
| EDTA | 4,65 g |
| Água purificada | p/ 500 mL |

2.18. Tampão de Corrida TBE 1x pH 8,0

| | |
|-----------------|-----------|
| TBE 10x | 100 mL |
| Água purificada | p/ 900 mL |

2.19. RNase

Foi preparada na concentração de 10 mg/mL de Tris-HCL (pH 7,5) e 15 mM de NaCl, aquecida a 100°C por 15 minutos e estocada a -20°C.

2.20. Proteinase K (20 mg/mL)

Foram adicionados 200 mg de Proteinase K em 10 mL de água ultra pura. A solução foi estocada a -20°C.

2.21. Lizosima (5 mg/mL)

Foram adicionados 5 mg de Lizosima em 1 mL de Tampão TE 100:50. A solução foi estocada a -20°C.

2.22. Solução CAS

| | |
|---|-------|
| Solução de cromo azurol S | 50 mL |
| Solução Ferro (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) | 10 mL |
| Solução HDTMA | 40 mL |

Foram dissolvidos 60,5 mg de cromo azurol S em 50 mL de água destilada, misturados a 10 mL de ferro (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – cloreto férrico hexaidratado a 1 mM em HCl – ácido clorídrico a 10 mM), a solução foi autoclavada e reservada. Separadamente, foram dissolvidos 72,9 mg de HDTMA (hexadecyltrimethylamonium) em 40 mL de água, a solução autoclavada e misturada sob agitação vagarosamente à solução anterior.

2.23. Reagente de Salkowski (GORDON; VERBER, 1951)

| | |
|-------------------------|---------|
| FeCl ₃ 0,5 M | 2,0 mL |
| HClO ₄ 35% | 98,0 mL |

2.24. Solução de acetato de amônio 7,5 M

| | |
|-------------------|------------|
| Acetato de amônio | 20 g |
| Água purificada | p/ 1000 mL |

2.25. Solução nutritiva livre de nitrogênio para plantas (BROUGHTON; DILWORTH, 1971)

Soluções estoques

| | |
|--|----------|
| 1. CaCl ₂ . 2H ₂ O | 14,705 g |
| Água purificada | p/100 mL |

| | |
|------------------------------------|----------|
| 2. KH ₂ PO ₄ | 6,805 g |
| Água purificada | p/100 mL |

| | |
|--------------------------------------|----------|
| 3. Fe-EDTA | 0,367 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 6,165 g |
| K ₂ SO ₄ | 4,350 g |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0,0169 g |
| Água purificada | p/100 mL |

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 4. H ₃ BO ₃ | 0,0124 g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,0144 g |
| CuSO ₄ . 5H ₂ O | 0,005 g |
| CoSO ₄ .7H ₂ O | 0,0028 g |
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | 0,00553 g |
| Água purificada | p/100 mL |

Um volume de 1,0 mL de cada solução estoque foi adicionado a um volume final de 1000 mL de água purificada. O pH foi ajustado para 6,8 e a solução foi esterilizada.

3. Avaliação do crescimento dos isolados em condições adversas

Para avaliar a capacidade de crescimento dos isolados em diferentes condições ambientais, foram testados os meios de cultura LB (BERTANI, 1951) e PY isento de cálcio (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991). Além disso, as bactérias foram cultivadas em meio TY (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994) a 40°C para avaliar seu desenvolvimento em altas temperaturas, e no mesmo meio, com pH ajustado para 4,0 (HUNGRIA *et al.*, 2000), para avaliação do crescimento em condições ácidas, características predominantes nos solos brasileiros.

Para os meios LB, PY-Ca e TY (40 °C), o experimento foi realizado em placas de Petri, onde os isolados foram cultivados em triplicata e o tamanho da colônia desenvolvida foi medido em 24, 48 e 72 horas. Por outro lado, para o meio TY ajustado para pH 4,0, o experimento foi conduzido em tubos contendo 1 mL de meio, em triplicata, e o número de células foi contado em câmara de Neubauer nos mesmos períodos citados acima.

4. Extração de DNA genômico dos isolados

O DNA dos isolados foi extraído como descrito por Kaschuk *et al.* (2006), com algumas modificações. As bactérias foram crescidas em tubos de 2,0 mL contendo meio líquido YM e mantidas sob agitação durante dois dias a 28°C. Após o crescimento a cultura de bactérias foi centrifugada a 13200 g por 15 minutos e lavada por três vezes com 750 µL de PBS. Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 400 µL de TE 50:20.

Em seguida, foram adicionados 50 µL de SDS 10%, 10 µL de Lisozima, 5 µL de Proteinase K e 1 µL de RNase. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C por uma hora (até clarear). Após a incubação, com auxílio de um pipetador de 1000 µL, a mistura foi homogeneizada com movimento de sucção/liberação com o

objetivo de retirar a viscosidade. A seguir foram acrescentados 30 μL de NaCl 0,25 M e 60 μL de AcNa 0,3 M. As amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 1 hora a 4°C. Foram centrifugadas a 13200 g por 15 minutos e o sobrenadante foi recolhido, transferido para tubos de 1,5 mL e adicionados de 2 vezes o volume de etanol 95% (mantido a 4°C). Incubou-se a -20°C *overnight*. No dia seguinte, após as amostras serem centrifugadas novamente a 13200 g por 15 minutos, o etanol foi descartado e os precipitados colocados para secar em estufa a 37°C por 30-40 minutos e, em seguida, ressuspensos em água purificada. O DNA extraído foi estocado a -20°C. Todas as soluções foram previamente autoclavadas.

O DNA obtido foi quantificado e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, que foi corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com aparato Kodak Digital Science 120. Além disso, foram determinadas as absorbâncias em espectrofotômetro a 260 nm, para quantificação.

5. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

A reação de amplificação do DNA foi realizada com os *primers* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC -3') (WEISBURG *et al.*, 1991), nas seguintes condições: 2,5 μL de tampão PCR 10x, 0,75 μL de MgCl_2 (50 mM), 2 μL de dNTP (2,5 μM), 0,5 μL de cada *primer* (10 μM), 0,125 μL de Taq DNA polimerase (5 U/ μL), 2 μL de DNA (10 ng/ μL) e 16,625 μL de água ultrapura para o volume final de 25 μL .

A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® modelo "Mastercycler Gradient", com desnaturação inicial a 95° C por 2 min.; 30 ciclos de 15 s a 94° C, 45 s a 93° C, 45 s a 56° C, 2 min. a 72° C; seguida de extensão final de 5 min. a 72° C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com marcador de massa "Low DNA Mass Ladder" Invitrogen®.

Aos produtos da amplificação das PCRs com os *primers* descritos anteriormente, foram acrescentados 4 μL de acetato de amônio 7,5 M, 60 μL de etanol absoluto e incubados a 4° C por 1 hora. Após este período os tubos foram

centrifugados por 45 minutos a 15°C e 10000 g. O sobrenadante foi descartado com auxílio de pipeta, e ao precipitado foram adicionados 100 µL de etanol 70% gelado. Após 1 minuto em etanol 70% os tubos foram centrifugados a 10000 g por 10 minutos a 15°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi ressuscitado em 15 µL de água ultrapura e deixado em temperatura ambiente por 2 horas. Após a purificação, os produtos da PCR foram quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa “Low DNA Mass Ladder” Invitrogen®.

O sequenciamento da região 16S rRNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia, utilizando a incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes, em Sequenciador Automático de DNA (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Para a reação foram utilizados de 50 a 100 ng do produto da PCR purificado, 0,25 µM do *primer* fD1, 2 µL da mistura para sequenciamento ET (kit “DYEnamic ET Dyeterminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE” da Amersham Biosciences®) e água ultrapura quando necessária para completar um volume final de 10 µL. A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® modelo “Mastercycler Gradient”, seguindo uma desnaturação inicial a 95° C por 2 min.; 35 ciclos de 30 s a 94° C, 15 s a 50° C e 90 s a 60° C.

Ao produto da reação de sequenciamento foram adicionados 2 µL de acetato de amônio 7,5 M e 65 µL de etanol absoluto. A placa de sequenciamento foi fechada e o conteúdo misturado por inversão por 30 vezes. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 3200 g e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 150 µL de etanol 70% recém preparado. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 3200 g. O sobrenadante foi descartado e um *spin down* a 300 g foi realizado. As amostras foram colocadas em estufa a 37° C por 15 minutos e ressuscitadas em 7 µL de água ultrapura. A placa foi fechada com adesivo, envolvida em papel alumínio e agitada no vórtex por 1 minuto. Após um *spin* a 2500 g, a placa foi submetida à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE Amersham Biosciences®.

Os parâmetros de eletroforese durante o sequenciamento foram: voltagem de injeção de 2 kV, tempo de injeção de 70 s, voltagem da corrida de 6 kV e tempo de corrida de 100 minutos. As corridas efetuadas foram analisadas através de programas disponíveis no pacote de *softwares* do MegaBACE. O “Sequence Analyser” gerou os eletroferogramas de cada isolado e através do programa

“ScoreCard” foram obtidas as informações estatísticas de cada sequência, como número de nucleotídeos obtidos e eficiência.

Os fragmentos obtidos foram submetidos aos *softwares* Phred (EWING *et al.*, 1998), Phrap (www.phrap.org) e Consed (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) para a verificação da qualidade e obtenção da sequência consenso. Em seguida, estas sequências foram alinhadas e comparadas com outras sequências existentes no GenBank pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), o qual permite detectar similaridade de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes. Para análise das sequências obtidas no presente trabalho, foi utilizada a opção BLASTn que compara sequências de nucleotídeos com um banco de dados de sequências de nucleotídeos.

6. Amplificação de genes simbióticos – nifH

Foi realizada uma PCR com o DNA dos isolados, utilizando-se os *primers* para amplificação do gene *nifH* (*nifHF*: 5'- TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA -3', e *nifHI*: 5' – AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA -3')(LAGUERRE *et al.*, 2001), afim de verificar a presença deste gene, indicando a capacidade de fixação de nitrogênio pelo isolado avaliado. A reação foi realizada nas seguintes condições: 2,5 µL de tampão PCR 10x, 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 2 µL de dNTP (2,5 µM), 0,5 µL de cada *primer* (10 µM), 0,125 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL), 2 µL de DNA (10 ng/µL) e 16,625 µL de água ultrapura para o volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® modelo “Mastercycler Gradient”, com desnaturação inicial a 95°C por 2 min.; 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 45 s a 60°C, 2 min. a 72°C; seguida de extensão final de 7 min. a 72°C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com marcador de massa “Low DNA Mass Ladder” Invitrogen®.

7. Testes bioquímicos para avaliação da capacidade de promoção de crescimento em plantas

7.1. Produção de sideróforos

A avaliação da produção de sideróforos foi realizada de acordo com Schwyn e Neilands (1987), com algumas modificações. Foi utilizado o meio DYGS acrescido de 10 mL da solução CAS por litro de meio, adquirindo assim uma coloração azul escura, devido ao complexo corante-ferro altamente colorido desta solução. Os isolados foram cultivados em triplicatas e a liberação de sideróforos no meio foi detectada pela formação de um halo amarelo ao redor da colônia, formado através da ligação do sideróforo com o ferro, liberando o corante no meio. As placas foram avaliadas após 24, 48 e 72 horas de crescimento.

7.2. Produção de ácido indolacético (KUSS, 2007)

Para a avaliação da produção de ácido indolacético (AIA), os isolados foram cultivados em meio DYGS líquido. Foram utilizados 3 tubos contendo meio acrescido de triptofano 5 mM (1 mL para 100 mL de meio), e um tubo sem triptofano, como controle negativo, para cada isolado. Após 72 horas os tubos foram centrifugados a 10000 g por 10 minutos, foram coletados 900 µL do sobrenadante e adicionados 600 µL do reagente de Salkowski. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos e o resultado foi avaliado através da leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 540 nm. Além disso, foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações (0,05 a 1,00 mM) de auxina comercial, para estimar a concentração de AIA produzida pelos isolados. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo que o delineamento foi inteiramente casualizado, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$, utilizando o programa Assistat versão 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009).

7.3. Solubilização de fosfatos (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010)

Para a avaliação da capacidade de solubilização de fosfatos, os isolados foram cultivados em meio GL acrescido de fosfato de potássio bibásico (0,25 g/L) e cloreto de cálcio (1,00 g/L), adicionados ao meio separadamente, para a formação de fosfato de cálcio, que forma um precipitado deixando o meio opaco. O resultado foi avaliado através da formação de halo transparente de solubilização ao redor da colônia. Após 72 horas de crescimento as colônias e os halos foram medidos, e

determinados os Índices de Solubilização (IS = diâmetro do halo / diâmetro da colônia), sendo que índices menores que 2 caracterizam baixa capacidade de solubilização, entre 2 e 4, média capacidade e, acima de 4, alta capacidade de solubilização de fosfatos.

8. Análise de MLSA (Multilocus Sequence Analysis) e sequenciamento total do gene 16S rRNA

Com base nos resultados do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, na avaliação da capacidade de crescimento em diferentes condições ambientais e nos resultados dos testes bioquímicos para avaliação da capacidade de promoção de crescimento em plantas, alguns isolados foram selecionados para a análise de MLSA e sequenciamento total do gene 16S rRNA. Os *primers* utilizados nesta etapa e as condições de PCR para a análise de MLSA estão descritos nos QUADROS 1 a 3. As reações de amplificação para o sequenciamento total do gene 16S rRNA foram realizadas seguindo as condições para o sequenciamento parcial deste gene.

| Gene | Primer | Sequência | Referência |
|--------------|----------------------|----------------------------|---------------------------------|
| <i>gyrB</i> | gyrB343F | TTCGACCAGAAYTCCTAYAAGG | MARTENS <i>et al.</i> , 2008 |
| | gyrB1043R | AGCTTGTCTTSGTCTGCG | |
| <i>recA</i> | recA6F | CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA | GAUNT <i>et al.</i> , 2001 |
| | recA555R | CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT | |
| <i>glnII</i> | TSglnII _f | AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG | STEPKOWSKI <i>et al.</i> , 2005 |
| | TSglnII _r | SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCTG | |
| <i>rpoA</i> | RRrpoAf | GGAAATCGCCATCAAGATGG | RIBEIRO <i>et al.</i> , 2009 |
| | RRrpoAr | ACGCTTGGCGAGATCTTC | |

QUADRO 1 - PRIMERS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE MLSA

| Gene | Condições |
|--------------|--|
| <i>gyrB</i> | 5 min a 95°C, 5x(2 min a 94°C, 2 min a 58°C, 1 min a 72°C), 28x(30 s a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C), 5 min a 72°C |
| <i>recA</i> | 5 min a 95°C, 30x(45 s a 94°C, 1 min a 55°C, 90 s a 74°C), 5 min a 72°C |
| <i>glnII</i> | 2 min a 95°C, 35x(45 s a 95°C, 30s a 58°C, 90 s a 72°C), 7 min a 72°C |
| <i>rpoA</i> | 2 min a 95°C, 35x(45 s a 94°C, 45 s a 55°C, 2 min a 72°C), 5 min a 72°C |

QUADRO 2 - CONDIÇÕES DE REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADAS NA ANÁLISE DE MLSA

| Primer | Sequência | Referência |
|--------|---------------------------|-------------------------------|
| fD1 | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | WEISBURG <i>et al.</i> , 1991 |
| Y2 | CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT | YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991 |
| 362f | CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG | MENNA <i>et al.</i> , 2006 |
| 786f | CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG | MENNA <i>et al.</i> , 2006 |
| 1203f | GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC | MENNA <i>et al.</i> , 2006 |
| rD1 | AAGGAGGTGATCCAGCC | WEISBURG <i>et al.</i> , 1991 |

QUADRO 3 - PRIMERS UTILIZADOS PARA O SEQUENCIAMENTO TOTAL DO GENE 16S rRNA

Os produtos de PCR obtidos nestas análises foram purificados e submetidos à reação de sequenciamento de acordo com a metodologia utilizada para o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Referências

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.62, p.293-300, 1951.

BROUGHTON, W.J.; DILWORTH, M.J. Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. **Biochemical Journal**, p.1075-1080, 1971.

CHAGAS JUNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A.; OLIVEIRA, A.N.; WILLERDING, A.L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.2, p.359-366, 2010.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.

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.51, p.2037-2048, 2001.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indolacetic acid. **Plant Physiology**, v.26, p.192-195, 1951.

HUNGRIA, M., ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.M.O., PROBANZA, A., GUITIERREZ-MANERO, F.J., MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, n. 21, p. 1515-1528, 2000.

KASCHUK, G., HUNGRIA, M., SANTOS, J.C.P., BERTON-JUNIOR, J.F. Differences in common beans rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v.87, n.2, p.205-217, 2006.

KUSS, A.N.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1459-1465, 2007.

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.

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

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

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.4, p.315-332, 2006.

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

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri Tipo B. **Summa Phytopatologica**, v.12, p.16, 1986.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal assay for detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook of Rhizobia** – Methods in Legume Rhizobium Technology. Springer, 450 p., 1994.

STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRYZANSKA, A.;McINNES, A.;LAW, I.J.; HOWIESON, J. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of western Australia and south Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7041-7052, 2005.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study for root nodule bacteria**. Oxford: Blacwell, 1970, 164 p.

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

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