

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)**

ANA PAOLLA PROTACHEVICZ

**DIVERSIDADE E FILOGENIA MOLECULAR DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS A
DESMODIUM spp. NATIVOS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ**

**PONTA GROSSA
2018**

ANA PAOLLA PROTACHEVICZ

**DIVERSIDADE E FILOGENIA MOLECULAR DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS A
DESMODIUM spp. NATIVOS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração de Biologia Evolutiva).

Orientadora: Prof^a. Dra. Jesiane S. da Silva Batista

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto

Ponta Grossa

2018

Protachevycz, Ana Paolla
P967 Diversidade e filogenia molecular de rizóbios associados a *Desmodium spp*
. Nativos dos Campos Gerais do Paraná / Ana Paolla Protachevycz. Ponta Grossa, 2018
64 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa

Orientadora: Profa. Dra. Jesiane S. da Silva Batista.
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto.

1. Rizóbio.. 2. Desmodium. 3. Unidade de conservação. 4. Leguminosas. I. Batista, Jesiane S. da Silva. II. Etto, Rafael Mazer. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. IV.T.

CDD: 581

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia Fernandes Bertholino dos Santos- CRB9/986



PARANÁ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 07/2018

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Ana Paolla Protachevicz**.

Aos onze dias do mês de maio de dois mil e dezoito, no Núcleo de Tecnologia e Educação Aberta e a Distância Auditório NUTEAD, Central de salas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência da Dr^a Jesiane Stefania da Silva Batista em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Ana Paolla Protachevicz** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr.^a Jesiane Stefania da Silva Batista (Orientadora UEPG), Dr. Renan Augusto Ribeiro (EMBRAPA SOJA) e Dr.^a Carolina Weigert Galvão (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Diversidade e Filogenia de Rizóbios Associados a *Desmodium* spp. Nativas dos Campos Gerais do Paraná**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário):

OBSERVAÇÕES FORAM ENCAMINHADAS AO DISCENTE
PELA BANCA.

Alteração de Título: sim ☒ não ☐

Novo título: DIVERSIDADE E FILOGENIA MOLECULAR DE RIZÓBIOS
ASSOCIADOS A DESMODIUM SPP. NATIVOS DOS CAMPOS GERAIS
DO PARANÁ

Ponta Grossa, 11 de maio de dois mil e dezoito.

Prof.^a Dr.^a Jesiane Stefania da Silva Batista (UEPG)

Prof. Dr. Renan Augusto Ribeiro (EMBRAPA SOJA)

Prof.^a Dr.^a Carolina Weigert Galvão (UEPG)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Jesiane, pela oportunidade e atenção em todas as etapas de realização desse trabalho; pelo seu entusiasmo na pesquisa e na docência; por ser exemplo de profissional ética e comprometida; sobretudo pelo imenso privilégio de poder contar com seus ensinamentos e orientação durante este período.

Ao coorientador, Profa. Dr. Rafael pela disponibilidade, apoio, auxílio e contribuições durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos membros da banca: Dra. Carol, Dr. Rafael e Dr. Renan por terem aceito o convite; por demandarem seu tempo com contribuições e apontamentos, os quais são de grande valia para a construção e enriquecimento desse trabalho.

A todos que participaram desta pesquisa e se tornaram grandes amigos de jornada: aos amigos do laboratório que compartilhamos muitas vivências e nos tornamos uma família científica: Fabiane, Milena, Marina, Pablo, Leandro, Vanessa e Francielly. Foi muito especial conviver com vocês.

Aos amigos da Botânica que sempre nos ajudaram nas coletas e identificações: Jorge, Adriane e Profa. Marta.

A todos do Programa de Pós-graduação de Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

A Embrapa-Soja (Londrina-PR), por todo o suporte técnico e auxílio durante a realização da pesquisa.

Ao meu pai, Ricardo, biólogo de coração, pelo incentivo e amor incondicional. À minha mãe Ana, por ter sido uma grande incentivadora dos meus estudos. Ao meu irmão Paulo, por ser um amigo sem igual em todos os momentos e sempre me ouvir sobre bactérias fixadoras de nitrogênio.

A Deus, sem Ele nada seria possível, e graças a Ele somos capazes de explorar nosso potencial e trazer benefícios a humanidade.

“Que a beleza do que você ama, seja o que você faz.” (Rumi)

RESUMO

Considerando a grande riqueza e abundância de plantas leguminosas na região dos Campos Gerais, bem como as lacunas existentes a respeito da biodiversidade microbiana na região, o presente estudo realizou, por meio de um levantamento exploratório, o isolamento de vinte e nove rizóbios de nódulos radiculares de plantas hospedeiras das espécies *Desmodium barbatum*, *D. incanum* e *D. discolor*. Os espécimes são oriundos de três áreas de conservação dos Campos Gerais: Parque Nacional dos Campos Gerais, Parque Estadual do Vila Velha (ambos em Ponta Grossa-PR), e Parque Estadual do Cerrado (Jaguariaíva-PR). Os solos das áreas de estudo foram caracterizados como ácidos e apresentaram grande variação entre os valores de macronutrientes, apresentando baixa fertilidade natural. A análise filogenética baseada nos genes 16S DNAr e *recA* permitiu a identificação de dezoito estirpes como Alfa proteobactérias, sendo uma pertencente ao gênero *Allorhizobium*, quatro ao gênero *Rhizobiume* treze estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. Ainda, foram isoladas onze estirpes de Betaproteobacterias identificadas como *Paraburkholderia* spp, cujas inferências taxonômicas baseadas na filogenia do gene 16S DNAr foram relacionadas com suas respectivas origens geográficas. Por meio da técnica BOX-PCR verificou-se uma elevada variabilidade genômica entre as estirpes, visto que todos os isolados apresentaram perfis únicos. Nesse contexto, a análise da diversidade de rizóbios associados a *Desmodium* spp. permitiu a constatação de sua promiscuidade simbiótica, em especial da espécie *D. barbatum*. Além disso, o isolamento de beta-rizóbios pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* pode estar associado a características edáficas das áreas de amostragem, especialmente o pH ácido.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, simbiose, leguminosas, unidades de conservação.

ABSTRACT

Considering the great richness and abundance of leguminous plants in the Campos Gerais region, as well as the existing gaps regarding microbial biodiversity in the region, the present study carried out, through an exploratory survey, the isolation of twenty-nine rhizobia of root nodules of host plants of the species *Desmodium* barbatum, *D. incanum* and *D. discolor*. The specimens come from three conservation areas of Campos Gerais: Campos Gerais National Park, Vila Velha State Park (both in Ponta Grossa-PR), and Cerrado State Park (Jaguariaíva-PR). The soils of the study areas were characterized as acids and presented great variation between the macronutrient values, presenting low natural fertility. Phylogenetic analysis based on the 16S rDNA and recA genes allowed the classification of eighteen strains as Alphaproteobacteria, one belonging to the genus *Allorhizobium*, four to the genus *Rhizobium* and thirteen strains belonging to the genus *Bradyrhizobium*. Eleven strains of Betaproteobacteria classified as *Paraburkholderia* spp were isolated, whose taxonomic inferences based on the phylogeny of the 16S DNAr gene were related to their respective geographical origins. By means of the BOX-PCR technique, there was a high genomic variability between the strains, since all the isolates presented unique profiles. In this context, the analysis of the diversity of rhizobia associated with *Desmodium* spp. allowed the confirmation of its symbiotic promiscuity, especially of the species *D. barbatum*. In addition, the isolation of beta-rhizobia belonging to the genus *Paraburkholderia* may be associated with edaphic characteristics of the sampling areas, especially acid pH.

Keywords: biological fixation, microsymbiont, leguminous, conservation unit

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organogênese de nódulos radiculares em plantas da família Fabaceae.....	11
Figura 2 - Árvore filogenética de sequencias do gene 16S rDNA de espécies representativas de rizóbios.....	13
Figura 3 - A espécie <i>D. incanum</i>	15
Figura 4 - Localização dos pontos de coleta Parque Estadual do Cerrado (PC1 e PC2); Parque Nacional dos Campos Gerais-Furnas Gêmeas (FG) e Parque Estadual de Vila Velha (VV1 e VV2).....	22
Figura 5 - Árvore filogenética baseada em sequencias parciais do gene 16S rDNA de beta-rizóbios isolados de nódulos radiculares de <i>D. barbatum</i> , <i>D. incanum</i> e <i>D. discolor</i> (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura 3-parametros) utilizando o <i>software</i> Mega 6.06. O suporte de <i>bootstrap</i> foi baseado em 1000 repetições.....	36
Figura 6 - Árvore filogenética baseada em sequencias parciais do gene 16S rDNA de alfa-rizóbios isolados de nódulos radiculares de <i>D. barbatum</i> e <i>D. incanum</i> (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura 3-parametros) utilizando o <i>software</i> Mega 6.06. O suporte de <i>bootstrap</i> foi baseado em 1000 repetições.....	38
Figura 7 - Árvore filogenética baseada em sequencias parciais do gene <i>recA</i> de alfa-rizóbios isolados de nódulos radiculares de <i>D. barbatum</i> e <i>D. incanum</i> (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura 3 - parametros) utilizando o <i>software</i> Mega 6.06. O suporte de <i>bootstrap</i> foi baseado em 1000 repetições.....	41
Figura 8 - Dendrograma baseado nos perfis de BOX-PCR de rizóbios isolados de nódulos de <i>Desmodium</i> sp., utilizando o algoritmo UPGMA, coeficiente de Jaccard e 2% de tolerância, utilizando o <i>software</i> Bionumerics.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

FG – Parque Nacional dos Campos Gerais, Furnas Gêmeas

N – Nitrogênio

PC – Parque Estadual do Cerrado

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

DNA_r - Ácido Desoxirribonucleico Ribossômico

VV – Parque Estadual de Vila Velha

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	<i>A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO</i>	<i>12</i>
2.2	<i>RIZÓBIOS E A FBN.....</i>	<i>13</i>
2.2.1	<i>A Simbiose Rizóbio-Leguminosa</i>	<i>13</i>
2.2.2	<i>Taxonomia De Rizóbios.....</i>	<i>15</i>
2.3	<i>O GÊNERO Desmodium</i>	<i>17</i>
2.3.1	<i>Diversidade De Microssiombiontes De Desmodium Spp.....</i>	<i>18</i>
2.4	<i>UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DOS CAMPOS GERAIS.....</i>	<i>19</i>
3	JUSTIFICATIVA	21
4	OBJETIVOS	23
4.1	<i>OBJETIVO GERAL</i>	<i>23</i>
4.2	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	<i>23</i>
5	MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1	<i>LOCAIS DE COLETA</i>	<i>24</i>
5.2	<i>COLETA E ANÁLISE DE SOLO</i>	<i>25</i>
5.3	<i>ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS</i>	<i>25</i>
5.4	<i>ESTOCAGEM DE LINHAGENS BACTERIANAS</i>	<i>26</i>
5.5	<i>CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE RIZÓBIOS EM MEIO YM.....</i>	<i>26</i>
5.6	<i>EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL</i>	<i>26</i>
5.7	<i>AMPLIFICAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL 16S DNAR</i>	<i>26</i>
5.8	<i>AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE RECA</i>	<i>27</i>
5.9	<i>SEQUENCIAMENTO DOS GENES 16S DNAR E RECA.....</i>	<i>28</i>
5.10	<i>ANÁLISE DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO</i>	<i>29</i>
5.11	<i>AMPLIFICAÇÃO DO DNA PARA A REAÇÃO DE BOX-PCR.....</i>	<i>29</i>
6	ALFA E BETA-RIZÓBIOS SÃO SIMBIONTES DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE DESMODIUM SPP. NATIVAS DO BRASIL	31
6.1	<i>INTRODUÇÃO.....</i>	<i>32</i>
6.2	<i>MATERIAL E MÉTODO.....</i>	<i>33</i>
6.2.1	<i>Locais De Amostragem De Desmodium Spp. Nodulíferas E Solos</i>	<i>33</i>
6.2.2	<i>Isolamento De Rizóbios E Preservação</i>	<i>33</i>
6.2.3	<i>Extração Do DNA Total E Análises Moleculares</i>	<i>34</i>

6.2.4	Amplificação dos Genes 16s Dna E Reca.....	34
6.2.5	DNA-Fingerprint Por BOX-PCR.....	34
6.2.6	Análise Dos Dados Moleculares.....	35
7	RESULTADOS.....	36
7.1	<i>AMOSTRAGEM DE PLANTAS NODULÍFERAS DE Desmodium SPP. E</i> <i>CARACTERÍSTICAS DOS PONTOS DE COLETA.....</i>	36
7.2	<i>ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS</i> <i>SIMBIONTES.....</i>	37
7.3	<i>FILOGENIA MOLECULAR DOS ISOLADOS DE Desmodium Spp.....</i>	37
7.3.1	Beta-Rizóbios.....	38
7.3.2	Alfa-Rizóbios.....	39
7.4	<i>DNA-FINGERPRINT POR BOX-PCR.....</i>	44
8	DISCUSSÃO.....	46
9	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR.....	62

1 INTRODUÇÃO

A região dos Campos Gerais apresenta ecossistemas únicos, que abrigam elevada biodiversidade em diferentes escalas e níveis organizacionais. Reconhecida por sua rica fauna e flora endêmica, diversas espécies têm sido apontadas em listas de espécies ameaçadas em extinção. Essa região sofre forte pressão antrópica devido a expansão das atividades agrícolas e pecuárias, além de se tratar de áreas negligenciadas pelas políticas públicas.

Algumas dessas áreas são unidades de conservação já implementadas, como o Parque Estadual do Vila Velha, Parque Nacional dos Campos Gerais, ambos no município de Ponta Grossa, e Parque Estadual do Cerrado localizado no município de Jaguariaíva.

Estudos têm sido conduzidos quanto aos aspectos da fauna, flora e geomorfologia da região; no entanto, ainda se mergulha em um grande desconhecimento sobre os aspectos relacionados à diversidade microbiana dos solos, as relações ecológicas e filogenéticas entre os grupos, além dos fatores que exercem influência sob os mesmos.

Os benefícios de se conhecer a biodiversidade microbiana do solo são inúmeros, visto que a diversidade microbiana está diretamente atrelada a complexidade dos sistemas, a riqueza florística bem como a resiliência dos ecossistemas (NANNIPIERI et al., 2003).

Nesse contexto, as bactérias fixadoras de nitrogênio, em especial na associação rizóbios-leguminosas, apresentam grande importância, pois permitem a incorporação de nitrogênio para os ecossistemas naturais. Tal processo apresenta uma grande importância ecológica tanto quanto à fotossíntese (SILVA JUNIOR et al., 2013).

Levantamentos florísticos apontaram elevada riqueza e diversidade de leguminosas nativas na região dos Campos Gerais, como representantes do gênero *Crotalaria*, *Desmodium*, *Mimosa*, *Stylosanthes*, entre outras (ANDRADE et al., 2009). A ocorrência de nódulos radiculares, que são órgãos especializados na fixação de nitrogênio de leguminosas, já foi confirmado em várias espécies leguminosas nativas (KLEPA et al., 2016).

Desta forma, o presente trabalho visa melhor compreender a simbiose *Desmodium*-rizóbio em ecossistemas naturais na região dos Campos Gerais bem

como correlacionar os parâmetros edáficos à diversidade de plantas hospedeiras e seus microssimbiontes em três unidades de conservação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é um elemento químico limitante para o crescimento das plantas, por ser essencial constituinte de várias biomoléculas como aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios, da clorofila, entre outros (MORGANTE, 2003).

Embora sua ocorrência seja abundante na atmosfera, compondo aproximadamente 80%, esse macronutriente não pode ser assimilado pelas plantas em sua forma molecular (N_2) devido à elevada estabilidade química existente na tripla ligação entre os átomos (TATE, 1995; CREWS, 1999).

As principais fontes de N para os ecossistemas são o N do solo, gerado pela decomposição da matéria orgânica e das rochas; a fixação não-biológica via descargas elétricas, combustão, radiação ultravioleta e vulcanismo, que resulta em nitrato o qual é incorporado ao solo; e o mais significativo que é por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Estima-se que a FBN contribui com 65% da incorporação desse elemento aos ecossistemas da Terra (NEWTON, 2000; HUNGRIA et al., 2001; MALAVOLTA, 2006).

A FBN é um processo realizado exclusivamente por procariotos, denominados diazotróficos, que apresentam componentes metabólicos essenciais à redução do N_2 a amônia (REIS; TEIXEIRA, 2006; RAVEN et al., 2001; SAWADA et al., 2003). Tal redução deve-se à ação da enzima nitrogenase, comum a todos os organismos diazotróficos. Existem três tipos de nitrogenases: molibdênio-ferro (MoFe), vanádio-ferro (Vnf) e a ferro-ferro (Fe-Fe) (SEEFELDT et al. 2009; DOS SANTOS et al., 2012; YANG et al., 2014).

No caso do sistema MoFe, a redução do N_2 inicia-se pela doação de elétrons para subunidade Ferro-proteína, mediada pela ferredoxina, que é uma enzima transportadora de elétrons oriunda da fase fotoquímica da fotossíntese (NUNES et al., 2003).

A ferredoxina, desta maneira, atua como um doador de elétrons para a Ferro-proteína, que hidrolisa o ATP e transfere os elétrons para a outra subunidade, a Molibdênio-Ferro-proteína. A transferência de elétron vai ocorrendo um a um para a subunidade MoFe proteína, até que se concentrem oito elétrons, que é a quantidade

requerida para que o N_2 seja reduzido a NH_3 , segundo a reação: $N_2 + 16 ATP + 8e^- + 8H^+ \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$ (HUNGRIA et al., 1994; TAIZ; ZIEGER, 2004; MALAVOLTA, 2006).

Os microrganismos diazotróficos podem estabelecer diferentes níveis de interação com espécies vegetais. A interação entre plantas e microrganismos diazotróficos pode conferir diversos benefícios ao macrossimbionte e, conseqüentemente, ao ecossistema no qual encontram-se, tais como favorecer o desenvolvimento de plantas pioneiras, melhorias à qualidade do solo, ciclagem de nutrientes, proteção de espécies vegetais contra estresses e pragas, entre outros (MORENO et al., 2012; CASTANHEIRA et al., 2014).

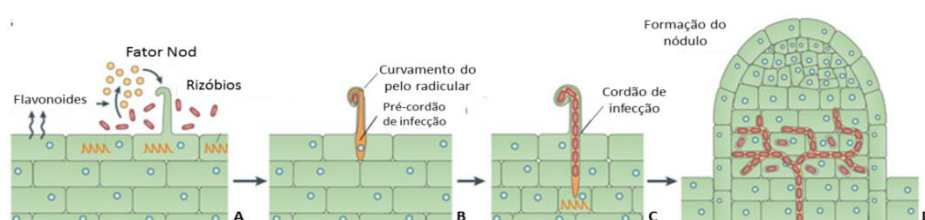
Dentre os organismos diazotróficos, os rizóbios compreendem um grupo taxonomicamente diverso de procariotos que são capazes de estabelecer uma interação simbiótica com elevado grau de especificidade com plantas leguminosas (WANG et al., 2012; ANDREWS, 2017).

2.2 RIZÓBIOS E A FBN

2.2.1 A Simbiose Rizóbio-Leguminosa

A interação simbiótica entre rizóbios e leguminosas culmina na organogênese de estruturas radiculares denominadas nódulos. O processo de formação de nódulos radiculares inicia-se com trocas de sinais moleculares entre ambos os simbiossiontes, seguida de expressão coordenada de genes, envolvendo mudanças morfológicas e fisiológicas tanto dos microssimbiontes como da planta hospedeira (Figura 1) (HUNGRIA et al, 1994; DROZDOWICZ, 1997).

Figura 1 - Organogênese de nódulos radiculares em plantas leguminosas. Adaptado de: OLDROYD, 2013.



A etapa inicial envolve a liberação radicular de compostos fenólicos (flavonoides) pelas sementes e raízes das plantas hospedeiras. Ao serem reconhecidos por rizóbios compatíveis presentes no solo, os flavonoides atuam como sinais moleculares, comportando-se como substâncias quimiotáticas, estimuladores da multiplicação dos rizóbios e indutora dos genes bacterianos *nod* (Figura 1A) (PERRET et. al., 2000).

A expressão dos genes *nod* leva à síntese e secreção de oligossacarídeos lipoquitínicos que são denominados fatores de nodulação (fatores Nod). Os fatores Nod são sinais químicos produzidos pelos rizóbios, que ao serem reconhecidos pela planta, induzem a uma série de modificações na mesma, como o encurvamento dos pelos radiculares, invaginação da parede celular, indução do meristema do nódulo, dentre outros (Figura 1B). Após essa indução, o cordão de infecção prolonga-se até atingir o primórdio do nódulo e iniciam-se sucessivas divisões das células corticais (Figura 1C). Os rizóbios migram por tal cordão de infecção, atingindo a região cortical, onde se diferenciam em bacteroides, que são as formas capazes de realizar a FBN (SCHULTZE et al., 1992; JONES et al., 2007) (Figura 1D).

A amônia sintetizada é transferida do bacteroide pela membrana peribacteroidal para o citosol da planta hospedeira e, em seguida é transportada para os demais tecidos da planta via xilema, na forma de amidas, aminoácidos e ureídos (HUNGRIA et al., 1994). Em contrapartida ao aporte de N pelos rizóbios, a planta mantém o aporte de fontes reduzidas de carbono e demais nutrientes essenciais para os simbiossiontes (RAVEN et al., 2001; SY et al., 2001; BROUGHTON et. al., 2006).

A taxonomia abrange três pilares imprescindíveis no estudo dos microrganismos: classificação, nomenclatura e identificação. A classificação consiste na criação de novos grupos por meio da ordenação de categorias taxonômicas ou taxa com base na similaridade entre os grupos; a nomenclatura refere-se a designações específicas regidas por normas internacionais presentes no “*Internacional Code of Nomenclature of Bacteria*” e a identificação trata de determinar, alocar os microrganismos dentro de grupos já conhecidos (COENYE et al., 2005).

Antigamente no estudo da taxonomia bacteriana se utilizava de métodos clássicos de caracterização fenotípica, fundamentados em aspectos bioquímicos, sorológicos, morfológicos e fisiológicos, com técnicas dependentes de cultivo (SCHELEIFER, 2004). No entanto, sabe-se que os caracteres morfofisiológicos são critérios limitantes para estudo das relações evolutivas entre os grupos (filogenética), levando a classificações equivocadas.

Com o avanço das tecnologias que permitiram o uso de técnicas moleculares, tais como sequenciamento e análise do DNA e dos genes ribossomais e a metodologia de hibridização DNA-DNA, permitiram um maior refinamento de informações para a classificação microbiana (STACKEBRANDT et al, 2002).

Em função disso, uma nova abordagem foi apresentada por Colwell e colaboradores (1970), a qual foi denominada de taxonomia polifásica, que se utiliza de uma integração de dados de forma mais abrangente, incluindo aspectos fenotípicos, genotípicos, evolutivos, ecológicos para classificar as estirpes estudadas. Tal perspectiva, na Microbiologia, propicia que assim como objetiva a taxonomia proporcione atributos preditivos, confiáveis e permanente para utilização (COLWELL et al., 1970; THOMPSON, 2013). A taxonomia polifásica é largamente utilizada no estudo dos rizóbios.

2.2.2 Taxonomia De Rizóbios

Atualmente, os rizóbios encontram-se classificados taxonomicamente como pertencentes a: Domínio: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Classe: Alphaproteobacteria; Ordem: Rhizobiales. São distribuídos nas Famílias Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Methylobacteriaceae e Hiphomicrobiaceae; e compreendendo doze gêneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Microvirga*, *Blastobacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Pararhizobium* (MOUSAVI et al., 2015; REMIGI et al., 2016) (Figura 2). Por serem os rizóbios inicialmente descritos, aqueles pertencentes à classe Alphaproteobacteria são usualmente denominados “rizóbios clássicos” ou alfa-rizóbios.

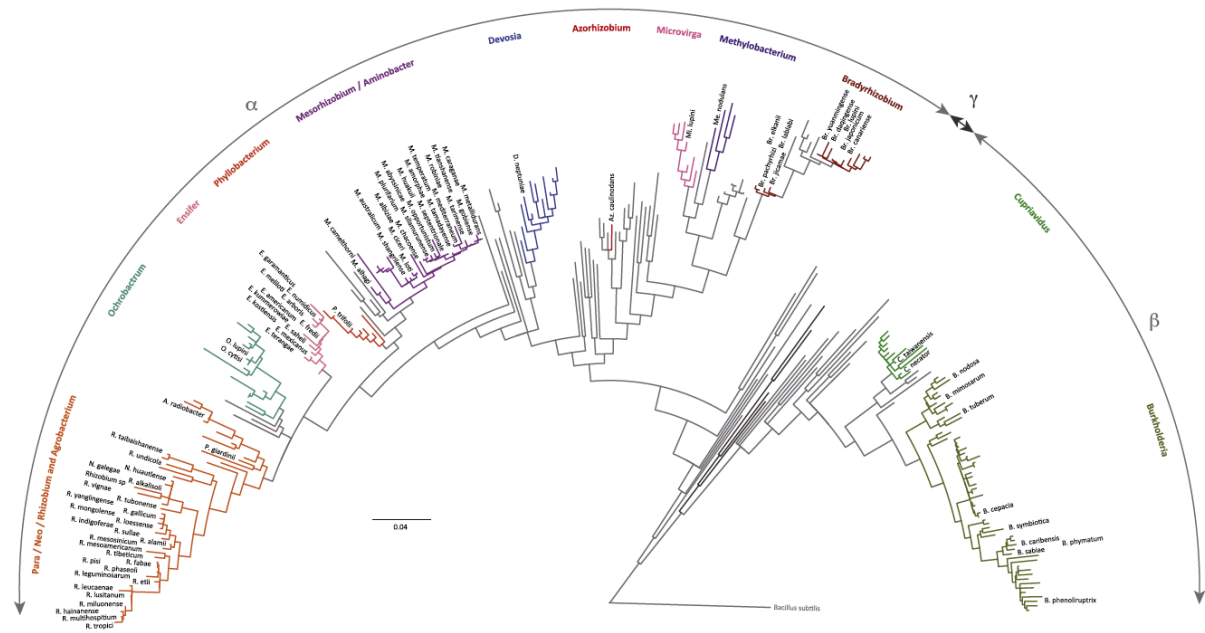
Mais recentemente, estudos passaram a relatar a ocorrência de rizóbios pertencentes à classe Betaproteobacteria e, por isso, são designados como beta-rizóbios (MOULIN et al., 2015) (Figura 2). Os beta-rizóbios foram inicialmente classificados como pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia* (CHEN et al., 2001, MOULIN et al., 2001) e possuem uma grande afinidade simbiótica com leguminosas do gênero *Mimosa* (MOULIN et al., 2015).

Os dois gêneros conhecidos de beta-rizóbios tiveram seus estados taxonômicos recentemente revistos. Os rizóbios classificados como *Ralstonia* foram

reclassificados, passando a pertencer ao gênero *Cupriavidus* (VANDAMME; COENYE, 2004).

ESTRADA-DE LOS SANTOS et al. (2013), em estudo sobre filogenética de bactérias do gênero *Burkholderia*, observou que o gênero poderia ser dividido em dois grupos e que tal classificação acompanhava características ecológicas e fenotípicas das espécies analisadas. SAWANA et al. (2014) e DOBRITSA; SAMADPOR (2016) propuseram a transferência de todas as espécies de interesse ambiental (inclusive os beta-rizóbios) para os novos gêneros *Paraburkholderia* e *Caballeronia*, enquanto as espécies reconhecidas como patógenos de plantas e animais permaneceram como pertencentes ao gênero *Burkholderia*.

Figura 2 - Árvore filogenética de sequências do gene 16S rDNA de espécies representativas de rizóbios.



Fonte: Remigi et al., 2016

Existe uma reconhecida especificidade entre planta hospedeira-microsimbiontes, que pode ser inclusive influenciada por fatores edafoclimáticos. Tal especificidade pode ser especialmente determinada nos estágios iniciais na infecção bacteriana (WANG et al., 2012). Nesse contexto, algumas espécies vegetais são capazes de serem noduladas por vários táxons de rizóbios enquanto outras possuem um espectro estrito quanto à taxonomia dos seus simbiontes.

2.3 O GÊNERO *Desmodium*

Plantas pertencentes à família Fabaceae (ou Leguminosae) apresentam distribuição cosmopolita, podendo se encontradas nos mais diversos ambientes, no entanto seu centro de irradiação é a região neotropical (LAVIN et al., 2004; QUEIROZ, 2009). Tal família botânica é formada por aproximadamente 19.500 espécies, que estão distribuídos em 751 gêneros, sendo considerada a terceira maior família das Angiospermas, seguido de Asteraceae e Orchidaceae (LEWIS et al., 2005). Ainda, Fabaceae divide-se em três subfamílias: Cesalpinoideae, Mimosoideae e Faboideae (LEWIS et al., 2005).

O gênero *Desmodium* pertence à subfamília Faboideae, e é caracterizado pelo hábito arbustivo, subarbustivo ou arbóreo; folhas alternas, unifolioladas ou trifolioladas; flores zigomorfas, papilionáceas, pediceladas, imbricadas, com pétala superior mais externa, duas pétalas laterais livres e duas pétalas basais conadas ou aderentes no ápice; fruto do tipo lomento articulado ou craspédio (AZEVEDO, 1981; OLIVEIRA 1983) (Figura 3).

Figura 3 - Imagem da planta *D. incanum* com fruto e flor



Fonte: McComack, 2007

O gênero é conhecido por abrigar espécies de importância forrageira, assim como espécies pioneiras na colonização de novos ambientes (CORADIN et al., 2011). Tais plantas destacam-se por sua capacidade de desenvolvimento em ambientes

hostis à grande parte das espécies vegetais, como solos com baixa fertilidade, condições xerotérmicas e em amplas faixas de pH (SKERMAN et al., 1991; MEDEIROS et al., 2006; TONIUTTI et al., 2017).

De acordo com Lewis et al. (2005), o gênero *Desmodium* apresenta aproximadamente 275 espécies distribuídas nos trópicos, subtropicais e nas regiões temperadas, sendo pouco documentado no continente europeu. Os principais centros de diversidade do gênero são África-Madagascar, sudeste e leste da Ásia, América do Norte, México, América Central, zonas tropicais e subtropicais da América do Sul e Austrália (AZEVEDO, 1981; OHASHI, 2005).

No Brasil são encontradas aproximadamente trinta e três espécies do gênero presentes nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal (LIMA, 2011).

Estudos sobre o levantamento florísticos na região dos Campos Gerais do Paraná relataram a ocorrência de *D. incanum* e *D. barbatum* no Parque Estadual do Vila Velha (SILVA, 2016), *D. incanum* e *D. barbatum* no Parque Nacional dos Campos Gerais (ANDRADE, 2017) e *D. barbatum*, *D. incanum* e *D. leiocarpum* no Parque Estadual do Cerrado (AGUIAR, 2010).

Em um levantamento de espécies de Fabaceae nodulíferas em unidades de conservação na região dos Campos Gerais foram documentadas algumas espécies deste gênero como *D. ascendens*, *D. barbatum* e *D. incanum* (KLEPA et al., 2016).

2.3.1 Diversidade De Microsymbiontes De *Desmodium* Spp

Estudos sobre diversidade de bactérias isoladas de nódulos radiculares de diferentes espécies do gênero *Desmodium* relatam sua elevada especificidade simbiótica com alfa-rizóbios (GU et al., 2007, XU et al., 2016, TONIUTTI et al., 2017).

Um estudo realizado por GU et al. (2007) sobre diversidade genética de microsymbiontes de sete espécies de *Desmodium* na China apontou que a maioria dos isolados pertencia ao gênero *Bradyrhizobium*, apresentando elevada identidade com *B. elkanii*, *B. japonicum* e *B. yuanmingense*, e alguns isolados foram classificados como *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*.

Os resultados apresentados por XU et al. (2016) sobre rizóbios associados a *D. elegans*, *D. gangeticum*, *D. sequax* e *D. oldhamii* nas regiões de solos áridos de Panxi, também na China, apontaram uma elevada diversidade dentre os microsymbiontes,

visto que os isolados foram classificados como *Pararhizobium giardinii*, *B. japonicum*, *Mesorhizobium septentrionale*, *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp. e *Agrobacterium* sp.

Na Argentina, sessenta e quatro rizóbios isolados de *D. Incanum* foram classificados como *B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. yuanmingense*, *B. liaoningense*, *B. denitrificans* e *R. tropici*, alguns dos quais apresentaram notável tolerância a condições extremas de temperatura, salinidade e pH (TUNIOTTI et al., 2017).

Um estudo sobre a diversidade de rizóbios que nodulam *Desmodium* realizado na região Sul do Brasil, utilizando vinte e duas plantas do gênero pertencente às espécies *D. adscendens*, *D. incanum*, *D. triarticulatum*, *D. uncinatum* e *D. affine* coletadas em regiões do estado do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, mostraram que 53,5% dos isolados obtidos foram pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, enquanto que 43,7% faziam parte dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Allorhizobium* (ONZI et al., 2010). Salienta-se que classificação baseou-se apenas em características morfofisiológicas.

Na América do Norte, um estudo tratando sobre a estrutura populacional e seleção de *Bradyrhizobium* sp. para *Desmodium* mostrou uma baixa especificidade entre as espécies de leguminosas e seus microssimbiontes, apontando uma elevada sobreposição na utilização dos simbiontes pelas plantas, pouca exclusividade simbiótica entre ambos, com a proporção altamente variável de acordo com cada espécie de planta. Foi sugerido também neste trabalho que habitats dominados por diferentes plantas hospedeiras favorecem a simbiose de diferentes conjuntos de linhagens bacterianas (PARKER, et al., 2015).

2.4 UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DOS CAMPOS GERAIS

As unidades de conservação (UCs) são áreas protegidas para manutenção da biodiversidade biológica, estabelecidas em ecossistemas que apresentam características naturais relevantes no território nacional. Dentre os objetivos das UCs estão preservar os bancos genéticos; proteger recursos hídricos e paisagens de importância cultural, histórica e arqueológica; propiciar o desenvolvimento de pesquisas e viabilizar a condução de atividades de educação ambiental para comunidade (BRUCK et al., 1983, MANETTA et al., 2015).

De acordo com Moreira; Rocha (2007), na região dos Campos Gerais atualmente existem 9 UCs, que compõem uma área total de aproximadamente 4343 km², sendo 6 de Proteção Integral e 3 que se enquadram na modalidade de uso sustentável. Essas unidades representam “ilhas” de ecossistemas naturais margeadas por paisagens antropizadas em diferentes níveis (MENEGUZO; ALBUQUERQUE, 2009).

O Parque Estadual de Vila Velha (Ponta Grossa-PR) foi implementado no ano de 1953, conhecido pelo expressivo valor cênico, de seus arenitos, apresenta uma área de aproximadamente 3.122,11 hectares, a qual é composta de vegetação estepe gramíneo lenhosa e Floresta Ombrófila Mista e floresta estacional semidecidual. Apresenta uma elevação topográfica que varia de 800-110 metros a nível do mar. O clima segundo a classificação de Köppen é do tipo Cfb, com temperatura média no mês mais frio abaixo de 18°C, com verões frescos, temperatura média no mês mais quente de 22°C e sem estação seca definida (ZILLER, 2000).

O Parque Nacional dos Campos Gerais é uma Unidade de Conservação Federal criada em 2006, a qual abrange partes dos municípios de Ponta Grossa, Castro e Carambeí, inserida na borda da Escarpa Devoniana do Paraná e compreende uma área de aproximadamente 21.288 hectares (DALAZOANA, 2010). O clima predominante, de acordo com o Köppen, é Cfb, com temperatura média variando entre 16 °C no mês mais frio e 22°C no mês mais quente, com precipitação média anual variando entre 1.200 e 1.800 mm (MELO et al., 2003). A altitude média da região é de 980 metros. Apresenta vegetação formada por um mosaico de estepe gramíneo lenhoso e capões fragmentados de Floresta Ombrófila Mista (ALMEIDA; MORO, 2007).

O Parque Estadual do Cerrado (Jaguariaíva-PR) foi implementado em 1992, localiza-se no segundo Planalto Paranaense. Compõem uma pequena área de aproximadamente 420 hectares, com altitude que varia de 700-800 metros a nível do mar, sendo a única UC com representação do Cerrado na região Sul, além de representar o limite sul do bioma (LISINGEN et al., 2006). A vegetação do Parque abrange um remanescente de Cerrado que é composta por distintas fitofisionomias desta vegetação savânica, que inclui campo limpo/campo sujo, campo cerrado, campo *stricto sensu* até uma pequena área de cerradão, juntamente com uma Floresta de Galeria com ocorrência da *Araucaria angustifolia*, margeado por plantações e reflorestamento de *Pinnus* spp. (UHLMANN et al., 1998).

3 JUSTIFICATIVA

A relevância da FBN é largamente documentada em sistemas agrícolas e agroflorestais onde plantas como feijão, soja, amendoim se beneficiam. No entanto, a importância ecológica da simbiose rizóbio-leguminosa para os ecossistemas naturais ainda é pouco discutida. O aporte de nitrogênio fornecido por esta interação é fundamental na manutenção e funcionalidade dos ecossistemas (FRANCO ; FARIA, 1997).

O Brasil é reconhecido por ser o país que abriga a maior diversidade florística do planeta e Fabaceae é uma das famílias que apresentam maior riqueza e expressivo endemismo (FORZZA et al., 2014); no entanto ainda são pouco estudados os ecossistemas naturais e as relações ecológicas que sustentam os berçários intrínsecos de biodiversidade.

De acordo com Myers et al. (2000), o bioma Cerrado é considerado uma área prioritária para conservação por ser um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade, sendo considerado a savana tropical mais diversificada do mundo, com alto endemismo e riqueza de fauna e flora (KLINK; MACHADO, 2005). E muito embora seja o segundo maior bioma do país, o qual é superado em área apenas pela Amazônia, aproximadamente 55% deste ecossistema está desmatado, transformado em áreas de pastagens, cultivos anuais e outros tipos de uso (MACHADO et al., 2004). O Parque Estadual do Cerrado, localizado em Jaguariaíva (PR) representa o limite Sul desse bioma e configura uma área de preservação ainda pouco pesquisada. Além disso, os Campos Gerais apresentam ecótonos entre Mata Atlântica, outro *hotspot* de biodiversidade, e Cerrado.

A região dos Campos Gerais apresenta uma grande diversidade de plantas da família Fabaceae e alguns representantes do gênero *Desmodium*, como *D. adscendens*, *D. incanum*, *D. ascendens* e *D. barbatum* as quais foram recentemente relatados como nodulíferas (KLEPA et al., 2016). No entanto, ainda existem poucos trabalhos e descrições que se debruçam sobre diversidade dos microssimbiontes da região dos Campos Gerais, dos seus aspectos genéticos, morfofisiológicos, evolutivos, ecológicos e de suas associações com plantas do gênero *Desmodium* bem como com componentes abióticos do solo.

Muitas áreas dos Campos Gerais do Paraná têm sofrido elevado impacto e destruição nos últimos anos. O Parque Nacional dos Campos Gerais (Ponta Grossa-

PR) sofre os impactos pela expansão da atividade agrícola, pecuária, silvicultura e visitação turística desordenada, e esses fatores tem influenciado diretamente na riqueza das espécies vegetais ocorrentes na região (DALZOANA, 2010).

A degradação ambiental no Estado do Paraná tem atingido níveis alarmantes em muitas áreas que abrigam espécies endêmicas e desconhecidas (CERVI, 2007). Os estudos sobre a microbiota, o solo, flora e os demais processos que envolvem a dinâmica dessas comunidades ainda são escassos, embora de impreterível importância para manutenção e conservação das espécies. Tais estudos podem auxiliar no delineamento de estratégias de conservação e recuperação de áreas degradadas, como já vem ocorrendo em áreas de mineração (MELLONI, et al., 2006). De acordo com o Sistema Nacional de Unidade de Conservação (SNUC), a pesquisa é um dos objetivos das unidades de conservação federais, sendo esta de grande importância para subsidiar a conservação e uso sustentável dos recursos naturais.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade de rizóbios isolados de nódulos radiculares de espécies do gênero *Desmodium* nativas de três unidades de conservação dos Campos Gerais, avaliar as relações de especificidade rizóbio-hospedeiro bem como examinar possíveis efeitos de variáveis abióticas e geográficas nas comunidades de rizóbios.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

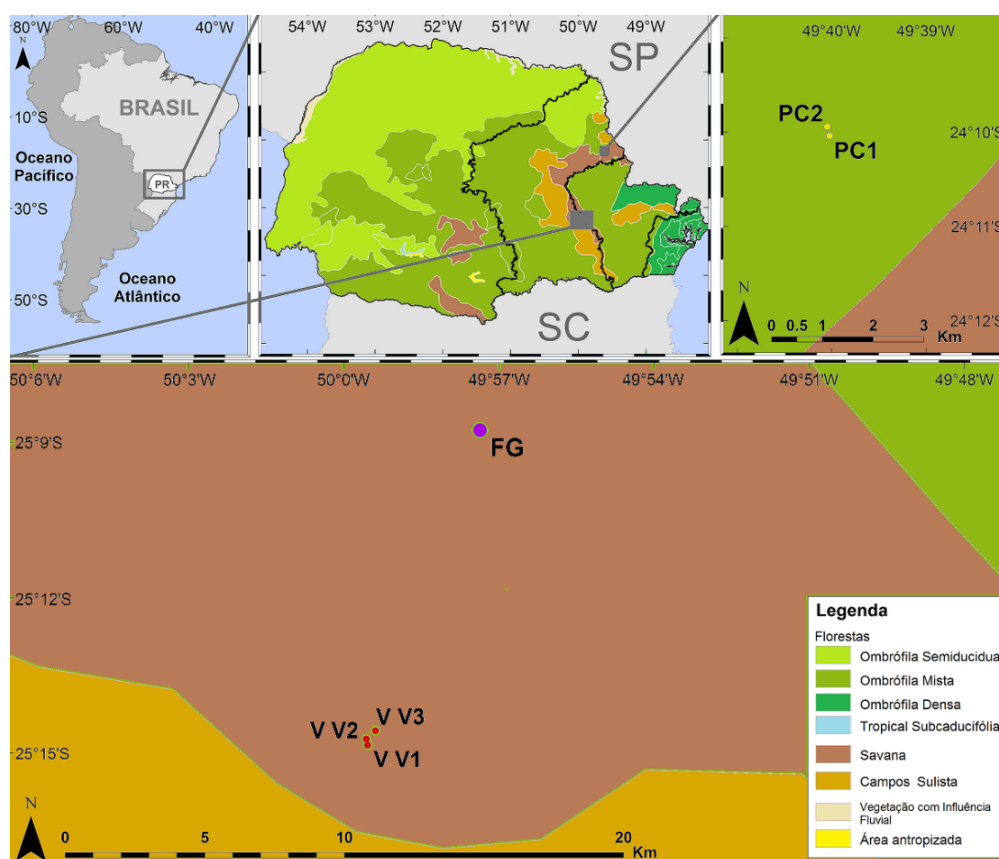
- Coletar plantas nodulíferas do gênero *Desmodium* e amostras de solo do Parque Estadual do Cerrado (Jaguariaíva-PR), Parque Estadual do Vila Velha (Ponta Grossa-PR) e Parque Nacional dos Campos Gerais (Ponta Grossa-PR);
- Avaliar os parâmetros físico-químicos dos solos das áreas de amostragem;
- Caracterizar genética e fenotipicamente os rizóbios isolados;
- Relacionar a diversidade de rizóbios isolados com localidades geográficas e características edáficas dos solos das áreas de amostragem.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAIS DE COLETA

Os espécimes do gênero *Desmodium* foram coletados em cinco pontos, sendo três deles localizados no Parque Estadual de Vila Velha (VV), um pertencente ao Parque Nacional dos Campos Gerais, na região das Furnas Gêmeas (FG) e outros dois no Parque Estadual do Cerrado (PC) (Figura 4).

Figura 3 - Localização dos pontos de coleta Parque Estadual do Cerrado (PC1 e PC2); Parque Nacional dos Campos Gerais-Furnas Gêmeas (FG) e Parque Estadual de Vila Velha (VV1 e VV2).



Fonte: a autora

Foram realizadas coletas dos espécimes de *Desmodium* spp. em seis pontos, sendo um ponto no Parque Nacional dos Campos Gerais, especificamente no local de Furnas Gêmeas, três pontos no Parque Estadual de Vila Velha (VV) e dois pontos no Parque Estadual do Cerrado (PC) (Tabela 1). As plantas coletadas foram identificadas

através de bibliografia e comparação com o material depositado no acervo do HUPG (Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa).

Tabela 1: Coordenadas dos pontos de amostragem de *Desmodium* spp. Nodulíferas

Localidade	Ponto de coleta	Coordenadas geográficas	Espécies Vegetais amostradas	Elevação topográfica	Observações
Parque Nacional dos Campos Gerais	FG	S 24°10.050' W 049°40.014'	<i>D. barbatum</i> <i>D. incanum</i>	1023 m	Região das Furnas Gêmeas.
Parque Estadual de Vila Velha	VV1	S 25°14.827' W 049°59.545'	<i>D. barbatum</i> <i>D. incanum</i>	881 m	Área não turística, destinada a pesquisa
	VV2	S 25°14.826' W 049°59.545'	<i>D. barbatum</i>	881 m	Área não turística, destinada a pesquisa
	VV3	S 25°14.736' W 049°59.553'	<i>D. discolor</i>	951 m	Área não turística, destinada a pesquisa
Parque Estadual do Cerrado	PC1	S 24°10.050' W 049°40.014'	<i>D. barbatum</i>	835 m	Área interna do parque, acesso controlado
	PC2	S 24°09.947' W 049°40.035'	<i>D. barbatum</i>	819 m	Região bastante antropizada, próxima a um estacionamento

5.2 COLETA E ANÁLISE DE SOLO

As amostras de solo foram coletadas nos pontos de amostragem das plantas nodulíferas e demarcadas segundo suas coordenadas geográficas (Tabela 1). As subamostras foram obtidas da profundidade de 0 a 20 cm e homogeneizadas para composição da amostra, com aproximadamente 400 gramas de solo. Em seguida, foram submetidas a análises químicas e físicas nos laboratórios de Fertilidade do solo e de Matéria Orgânica, ambos da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Com os espécimes do gênero *Desmodium* foram realizadas exsicatas e foram identificadas com auxílio do grupo de Botânica da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

5.3 ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS

Inicialmente, foram realizados procedimentos de desinfestação dos nódulos com o objetivo de eliminar os microrganismos presentes na superfície. Para tanto, cada nódulo permaneceu 30 segundos na solução de álcool 70%, 3 minutos na solução hipoclorito de sódio 3% e por último, 10 lavagens consecutivas em água destilada

estéril. Em seguida, os nódulos foram macerados com bastão de vidro flambado em 10µl de água estéril. A solução gerada foi inoculada em placas de Petri contendo meio sólido seletivo *Yeast Mannitol Agar* (YMA), para isolamento de colônias de rizóbios (VINCENT, 1970).

5.4 ESTOCAGEM DE LINHAGENS BACTERIANAS

As culturas de reserva encontram-se mantidas em meio YMA a 4 °C e a preservação a longo prazo feita por criopreservação com 50% de glicerol no Laboratório de Biodiversidade da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Ponta Grossa-PR). As estirpes também foram depositadas na “Coleção de culturas de microrganismos multifuncionais” da Embrapa Soja (Londrina-PR).

5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE RIZÓBIOS EM MEIO YM

Os isolados obtidos foram cultivados em meio sólido seletivo YMA com vermelho congo a 28 °C por 2-7 dias. Confirmada a pureza dos isolados, estes foram descritos de acordo com características morfofisiológicas das colônias: tempo de crescimento, diâmetro da colônia, forma da colônia, elevação, bordas, superfície, consistência, produção de muco, cromatogênese da colônia em meio YM com vermelho congo e com indicador de pH Azul de Bromotimol.

5.6 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

Os isolados foram cultivados em meio líquido YM até a fase exponencial para a extração do DNA total, utilizando o *DNeasy Blood ; Tissue Kit*(Qiagen) de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante. A integridade e concentração do DNA total foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 1% em TBE.

5.7 AMPLIFICAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL 16S DNAR

O DNA total de cada estirpe foi utilizado como molde para amplificação do gene 16S DNAr, utilizando os iniciadores universais fD1 e rD1 (Weisburg et al., 1991). A reação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos

de desnaturação a 94°C por 15 segundos, 93°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; um ciclo final de extensão por 5 minutos.

A reação foi realizada em um volume final de 50 uL, contendo 36,3 uL de água destilada estéril; 3,0 de dNTPs (1,5mmol/L de cada nucleotídeo), 5 uL de tampão 10x (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCL, pH 8,4); 1,5 uL de MgCl (50 mmol/L); 1,5 uL de cada iniciador (10 pmol/uL), 2,0 µL de DNA (50 ng/uL) e 0,2 µL de Taq (5 U/µL).

Os produtos de PCR, de aproximadamente 1500pb, foram purificados utilizando o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

5.8 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE *RECa*

A filogenia do gene *recA*, que codifica a proteína de recombinação RecA, foi utilizada para maior definição taxonômica dos alfa-rizóbios. A reação de PCR foi conduzida em um volume final de 50 µL, contendo 35,3 µL de água ultrapura estéril; 3,0 µL de dNTPs (1,5 mmol/L de cada nucleotídeo); 5,0 µL de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,5 µL de MgCl (50 mmol/L); 1,5 µL de cada iniciador (10pmol µL); 1,0 µL de DNA (50 ng/µL) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL).

Baseando-se na filogenia do gene 16S DNAr, foram selecionados os iniciadores *recA6F*

(CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA)/*recA555R*(CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT) (GAUNT et al., 2001) para as bactérias classificadas como *Rhizobium* sp. A amplificação das sequências consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5min; 32 ciclos de desnaturação (45s a 94°C), anelamento (1min a 55°C) e extensão (1min30s a 72°C); um ciclo de extensão final a 72°C por 5min (GAUNT et al., 2001). As temperaturas de anelamento foram reduzidas para 53°C, 52°C e 50°C para as estirpes Cnpso3483, Cnpso3482e Cnpso3586, respectivamente.

Já para os rizóbios pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, foram utilizados os iniciadores TS*recAf* (CAACTGCMYTGCGTATCGTCAAGG)/TS*recAr*(CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG) (STEPKOWSKI et al., 2005). A amplificação das sequências consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2min; 35 ciclos de desnaturação (45s a 95°C), anelamento (30s a 58°C) e extensão (1min30s a 72°C); um ciclo de extensão final a 72°C por 7min (STEPKOWSKI et al.,

2005). A temperatura de anelamento foi reduzida para 55°C para a estirpe Cnpso3513.

Os produtos de PCR foram purificados, utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification kit* (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante.

5.9 SEQUENCIAMENTO DOS GENES 16S DNAR E *RECa*

Para o sequenciamento, os produtos de PCR purificados foram submetidos a uma nova amplificação, a qual consistiu na adição de 3 µL de DNA (15µgmL⁻¹), 1,3 µL de Big Dye (compatível com o sequenciador ABI3500XL, Applied Biosystems), 1 µL de iniciador (3,2 pmol/µl), 2,0 µL de tampão 5x (500 mM KCl; 200mM Tris–HCl, pH 8,4) e H₂O ultrapura estéril suficiente para um volume final de 20 µL por reação. Para sequenciamento do gene 16S DNAr, foram utilizados os iniciadores 27f e 1492f, seguindo parâmetros descritos por Menna et al. (2006), enquanto para o gene *recA* foram utilizados os mesmos iniciadores da amplificação.

As amostras amplificadas foram precipitadas de acordo com o método descrito por Menna et al. (2006), alterando o tempo de centrifugação de 10 minutos para 20 a sequenciamento (ABI 3500xl Genetic Analyser, Applied Biosystems). Foram adicionados 2 µL de acetato de amônio estéril 7,5 M e 65 µL de etanol absoluto em temperatura ambiente a todos os poços da placa. Em seguida, a placa foi selada, homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos. Descartou-se o sobrenadante e a placa foi invertida em papel absorvente. Em seguida, foi adicionado 150 µL de etanol 70% recém-preparado a cada poço da placa, e a mesma foi novamente selada, homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e a placa foi invertida em papel absorvente. Realizou-se uma nova centrifugação com rotação de 300 rpm por aproximadamente 25 segundos para realizar a remoção de possíveis resíduos. Por fim, a placa foi deixada em estufa a 37°C por cerca de 30 minutos para secar. Logo após a secagem, os precipitados foram ressuspensos em 10 µL de formamida, aquecidos no termociclador à 95°C durante 5 minutos e resfriados por mais 2 minutos em gelo e submetidos ao sequenciamento em ABI 3500XL (Applied Biosystems).

5.10 ANÁLISE DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO

As sequências dos genes 16S DNAr *recA* foram corrigidas utilizando os *softwares* Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 7.6) e Geneious v.7.1 (Biomatters).

O programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, v. 7.026) foi utilizado para alinhamento e construção de árvores filogenéticas, com o algoritmo de Máxima Verossimilhança e modelo Tamura-3-parametros (TAMURA, 1992), distribuição G+I (TAMURA et al., 2013) para o gene 16S DNAr. Para o gene *recA* utilizou-se modelo de distância Tamura Nei (TAMURA; NEI, 1993).

Os dados de identidade nucleotídica foram gerados com as sequencias alinhadas no programa Bioedit (v.7.2.5).

As sequências dos genes 16S DNAr foram depositadas no banco de dados Genbank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5.11 AMPLIFICAÇÃO DO DNA PARA A REAÇÃO DE BOX-PCR

Para análise de diversidade por DNA *fingerprinting*, utilizou-se o iniciador BOX-A1R ('CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC *et al.*, 1994; KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995), seguindo as modificações de Kaschuk *et al.* (2006) e Batista et al. (2007). A reação foi conduzida em um volume final de 25 µL, contendo 13,8 µL de água Milli-Q estéril; 5,0 µL de dNTPs, (estoque com 1,5 mmol/L de cada base); 2,5 µL de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,5 µL de MgCl (50 mmol/L); 1,0 µL de *primer* (50 pmol/µL); 1,0 µL de DNA (50 ng/µL) e 0,2 µL de Taq (5 U/µL).

A amplificação das sequências consistiu em: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 7 min; 30 a 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 53°C) e extensão (8 min a 65°C); 1 ciclo de extensão final a 65°C por 16 min; manutenção a 4°C (Batista et al., 2007).

Os amplicons foram separados por meio de gel de agarose 1,5% utilizando 1kb *Plus Ladder* da Invitrogen como peso molecular. Os perfis obtidos foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Bélgica, v.7.6) para construção de um dendrograma utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted*

Pair-Group Method with Arithmetic mean; SNEATH, SOKAL; 1973) e o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912) com 2% de tolerância.

6 ALFA E BETA-RIZÓBIOS SÃO SIMBIONTES DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE *Desmodium* Spp. NATIVAS DO BRASIL

Resumo

A região dos Campos Gerais destaca-se por uma rica flora endêmica, a qual abriga uma elevada diversidade de Fabaceae, destacando o gênero *Desmodium* sp, como uma espécie pioneira dos ambientes, que se desenvolve mesmo em solos ácidos e com baixa fertilidade. Nesse estudo foram isolados 29 rizóbios de espécimes do gênero *Desmodium* em três unidades de conservação: no Parque Estadual do Vila Velha, Parque Nacional dos Campos Gerais, ambos no município de Ponta Grossa - PR e também no Parque Estadual do Cerrado, no município de Jaguariaíva-PR. Os isolados foram classificados como pertencentes as Classes Alfa-Proteobacteria; compondo os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* e também da Classe Beta-Proteobacteria, com o gênero *Paraburkholderia*, sendo esse o primeiro relato de beta-rizóbios nodulando *Desmodium* spp. Os isolados foram caracterizados conforme suas características morfofisiológicas e por meio da técnica de BOX-PCR verificou-se que nenhum isolado foi encontrados em mais de um local de coleta, indicando um alto nível de diversidade rizóbios associado a *Desmodium* nos solos dos Campos Gerais. As estirpes de *Paraburkholderia* exibiram especificidade em função de sua localidade de coleta, enquanto que as estirpes de alfa-rizóbios demonstraram-se mais generalistas.

Palavras-chaves: leguminosa, microsimbiontes, ambientes nativos, fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

The Campos Gerais region has a rich endemic flora, which harbors a diversity of Fabaceae species, such as the genus *Desmodium* sp, which is a pioneer species of environments and develops even in acidic soils with low fertility. In this study, 29 rhizobia were isolated from specimens of the *Desmodium* genus in three conservation units: in the Vila Velha State Park, Campos Gerais National Park, both in the municipality of Ponta Grossa-PR and in the Cerrado State Park, in the municipality of Jaguariaíva- PR. The isolates were classified as belonging to the Alpha-Proteobacteria Classes; composing the genera *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* and the Class Beta-Proteobacteria, with the genus *Paraburkholderia*, this being the first report of beta-rhizobia nodulating *Desmodium* spp. The isolates were characterized according to their morphophysiological characteristics and using the BOX-PCR technique it was found that none of the isolates were found in more than one collection site, indicating a high level of rhizobia diversity associated with *Desmodium* in Campos Gerais soils. The *Paraburkholderia* strains showed specificity as a function of their collection location, while the alpha-rhizobia strains were more generalist.

Keywords: legume, microsymbiotes, native environments, biological nitrogen fixation

6.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Desmodium* (família Fabaceae, subfamília *Papilionoideae*) apresenta aproximadamente 275 espécies distribuídas nos trópicos, subtropicos e nas regiões temperadas, sendo pouco documentado no continente europeu (LEWIS et al., 2005). Os principais centros de diversidade do gênero são África-Madagascar, sudeste e leste da Ásia, América do Norte, México, América Central, zonas tropicais e subtropicais da América do Sul e Austrália (AZEVEDO, 1981; OHASHI, 2005).

Espécies do gênero possuem ampla distribuição no Brasil e são particularmente diversas e abundantes na região dos Campos Gerais do Paraná (região Sul do país), onde são consideradas ervas daninhas em cultivos agrícolas e também reconhecidas por sua importância forrageira além de pioneiras na colonização de novos ambientes (CORADIN et al., 2011). Sua presença em diferentes biomas e sua capacidade pioneira devem-se à sua habilidade de desenvolvimento em ambientes hostis à grande parte das espécies vegetais, como solos com baixa fertilidade, condições xerotérmicas e em amplas faixas de pH (SKERMAN et al., 1991, LAVIN et al., 2004; MEDEIROS et al., 2006; QUEIROZ, 2009; TONIUTTI et al., 2017).

Além disso, assim como demais espécies de plantas leguminosas, *Desmodium* spp. são capazes de estabelecer simbiose com bactérias diazotróficas denominadas rizóbios. A interação entre os simbiossiontes inicia-se com uma coordenada e específica sinalização molecular, seguida pela infecção via pelos radiculares e culmina na morfogênese dos nódulos radiculares, órgãos especializados na fixação biológica de nitrogênio (DROZDOWICZ, 1997; HUNGRIA et al., 2001; OLDROYD; DOWNIE, 2004). Essa interação permite suplementar o crescimento vegetal e, em contrapartida, o microssimbionte recebe os fotoassimilados da planta (XU et al., 2016).

Estudos sobre diversidade de bactérias isoladas de nódulos radiculares de diferentes espécies do gênero *Desmodium* relatam sua especificidade simbiótica com alfa-rizóbios, em especial pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (GU et al., 2007; GRANADA et al., 2014; XU et al., 2015, TONIUTTI et al., 2017). No presente estudo, relatamos a ocorrência de alfa e beta-rizóbios isolados de nódulos

radiculares de três espécies do gênero *Desmodium* nativas de três unidades de conservação dos Campos Gerais do Paraná (região Sul do Brasil).

6.2 MATERIAL E MÉTODO

6.2.1 Locais De Amostragem De *Desmodium* Spp. Nodulíferas E Solos

Os espécimes do gênero *Desmodium* foram coletados manualmente ou com auxílio de pás para jardinagem e acondicionados em sacos plásticos em seis pontos: três localizados no Parque Estadual do Vila Velha (Ponta Grossa-PR), um ponto no Parque Nacional dos Campos Gerais, na região de Furnas Gêmeas (Ponta Grossa-PR) e dois pontos no Parque Estadual do Cerrado (Jaguariaíva-PR) (Figura 4). As coordenadas dos pontos de amostragem, características gerais dos locais e espécies amostradas encontram-se descritas na Tabela 1.

Todo o material botânico coletado foi identificado por comparação com exsicatas de herbários e por consulta à bibliografia especializada no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Além disso, foram coletadas amostras de solo de cada ponto a uma profundidade 0-20 cm para análises físico-químicas.

6.2.2 Isolamento De Rizóbios E Preservação

As raízes das plantas foram lavadas e os nódulos foram desinfestados em álcool 70%, hipoclorito de sódio 3% seguido de lavagens sucessivas em água destilada estéril (VICENT, 1970).

Os nódulos foram macerados em solução salina estéril e a suspensão foi inoculada em meio *Yeast Mannitol Agar* (YMA) acrescido de vermelho congo (0,25%). Os cultivos foram incubados a 28°C, por 2-7 dias e, então, caracterizados quanto aos parâmetros morfofisiológicos das colônias.

As estirpes foram depositadas na “Coleção de microrganismos multifuncionais” na Embrapa Soja (Londrina-PR) e estocadas no Laboratório de Biodiversidade da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

6.2.3 Extração do DNA Total e análises moleculares

O DNA total das estirpes foi extraído utilizando o Kit *D Neasy Blood ; Tissue Kit* (Qiagen). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e o mesmo foi utilizado como molde para amplificação e sequenciamento dos genes 16S DNAr e *recAe* análise de tipagem molecular por BOX-PCR.

6.2.4 Amplificação dos Genes 16s Dnar E Reca

Para a identificação taxonômica e análise filogenética foi escolhido o gene ribossomal 16S DNAr. A para amplificação por PCR e sequenciamento parcial: o gene 16S DNAr com os iniciadores 362f (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-3') e 786f (5'-CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3') (MENNA *et al.*, 2006).

Com o uso de iniciadores universais fD1 e rD1 (WEISBURG *et al.*, 1991) realizou-se a amplificação do 16S DNAr.

A filogenia do gene *recA*, que codifica a proteína de recombinação *RecA*, foi utilizada para maior definição taxonômica dos alfa-rizóbios.

Baseando-se na filogenia do gene 16S DNAr, foram selecionados os iniciadores *recA6F*

(CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA)*recA555R*(CGRATCTGGTTGATGAAGAT CACCAT) (GAUNT *et al.*, 2001) para as bactérias classificadas como *Rhizobium* sp. As temperaturas de anelamento foram reduzidas para 53°C, 52°C e 50°C para as estirpes Cnpso 3483, Cnpso 3482 e Cnpso3586, respectivamente.

Já para os rizóbios pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, foram utilizados os iniciadores TS*recAf* (CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG)/TS*recAr* (CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG) (STEPKOWSKI *et al.*, 2005). A temperatura de anelamento foi reduzida para 55°C para a estirpe *Cnpso 3513*.

Os produtos de PCR foram purificados, utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification kit* (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante.

6.2.5 DNA-Fingerprint Por BOX-PCR

Para análise de diversidade por DNA *fingerprinting*, utilizou-se o iniciador BOX-AIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC *et al.*, 1994; KOEUTH;

VERSALOVIC; LUPSKI, 1995), seguindo as modificações de Kaschuk *et al.* (2006) e Batista *et al.* (2007). Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

6.2.6 Análise Dos Dados Moleculares

As sequências dos genes 16S DNAr e *recA* foram corrigidas utilizando os *softwares* Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 7.6) e Geneious v.7.1 (Biomatters).

O programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, v. 6.1) foi utilizado para alinhamento e construção de árvores filogenéticas, com o algoritmo de Máxima Verossimilhança e modelo Tamura-3-parametros (TAMURA, 1992), distribuição G+I (TAMURA *et al.*, 2013) para o gene 16S DNAr. Para o gene *recA* utilizou-se modelo de distância Tamura Nei (TAMURA; NEI, 1993).

Os dados de identidade nucleotídica foram gerados com as sequencias alinhadas no programa Bioedit (v.7.2.5).

Os perfis de BOX-PCR foram analisados no *software* Bionumerics (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Bélgica, v.4.6) para construção de um dendrograma utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*; SNEATH, SOKAL; 1973) e o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912) com 2% de tolerância.

7 RESULTADOS

7.1 AMOSTRAGEM DE PLANTAS NODULÍFERAS DE *Desmodium spp.* E CARACTERÍSTICAS DOS PONTOS DE COLETA

O levantamento apontou a ocorrência de três espécies nodulíferas do gênero *Desmodium* nas áreas de estudo. No Parque Estadual de Vila Velha foram encontradas as espécies *D. barbatum*, *D. descolore* *D. incanum*. Já no Parque Nacional dos Campos Gerais, relatou-se a ocorrência de *D. barbatum* e *D. incanum* e no Parque Estadual do Cerrado foram coletadas plantas nodulíferas apenas da espécie *D. barbatum* (Tabela 1).

Os resultados das análises físico-químicas dos solos estão apresentados na Tabela 2. Os resultados apontaram que os solos são caracterizados como ácido sem todos os pontos de amostragem (pH 4,0-5,5).

Tabela 2: Análises químicas e físicas dos solos das áreas de amostragem de *Desmodium sp.* nodulíferas.

Parâmetro	Unidade	Pontos de amostragem					
		FG1	VV1	VV2	VV3	PC1	PC2
Parâmetros químicos							
pH em CaCl2	cmolc/dm³	4,5	4,1	4	4,1	4,5	5,5
H+Al	cmolc/dm³	6,69	9,01	9,7	10,45	6,21	3,97
Al trocável	cmolc/dm³	1	1,4	1,8	1,2	0,8	0
Ca trocável	cmolc/dm³	0,9	0,8	0,3	0,8	1,2	18,2
Mg trocável	cmolc/dm³	0,8	0,4	H0,1	0,5	0,6	3,2
K trocável	cmolc/dm³	0,1	0,12	0,11	0,21	0,08	0,21
P	cmolc/dm³	2,7	27,4	4,3	4,7	14	285,9
C-orgânico	g/dm³	25	22	32	27	10	15
CTC Ph 7,0	cmolc/dm³	8,49	10,33	10,21	11,96	8,09	25,58
CTC efetiva	cmolc/dm³	2,8	2,72	2,31	2,71	2,68	21,61
Sat. Por bases (V)	%	21,2	12,8	5	12,6	23,2	84,5
Sat.por Al (m)	%	35,7	51,5	77,9	44,3	29,9	0
Sat.por Ca	%	10,6	7,7	2,9	6,7	14,8	71,1
Sat.por Mg	%	9,4	3,9	1	4,2	7,4	12,5
Sat. Por K	%	1,2	1,2	1,1	1,8	1	0,8
Relação Ca/Mg		1,1	2	3	1,6	2	5,7
Relação Ca+ MG/K		17	10	3,6	6,2	22,5	101,9
Parâmetros físicos							
Areia	g KG -1	100	862	880	872	846	310
Silte	g KG -1	580	58	60	28	34	550
Argila	g KG -1	320	80	60	100	120	140

Houve grande variação dentre parâmetros relacionados com fertilidade do solo, como Ca ($0,3-18,2 \text{ cmolc/dm}^3$), Mg ($0,1-3,2 \text{ cmolc/dm}^3$) e C orgânico ($10-32 \text{ cmolc/dm}^3$). Todos os pontos apresentaram valores baixos referentes à fertilidade natural do solo, com exceção de PC2. Esse ponto apresentou o maior valor de pH (5,5) e também se destaca por parâmetros bastante destoantes comparados aos demais pontos, como elevada saturação por base, elevada capacidade de troca de cátions e baixa concentração de alumínio, mostrando uma elevada fertilidade natural desse solo.

Os solos dos pontos VV1, VV2, VV3 e PC1 (Figura 5) foram classificados como arenosos (areia superior a 80%), enquanto os solos de FG1 e PC2 podem ser classificados como siltosos (Tabela 2).

7.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DOS SIMBIONTES

Foram obtidos vinte e nove isolados de quinze plantas hospedeiras que foram caracterizados de acordo com seus aspectos morfofisiológicos (Tabela suplementar 1). Quanto ao crescimento, 51,72% das bactérias apresentaram crescimento rápido (até 3 dias), 42,37% crescimento intermediário (4 a 6 dias) e 6,89% crescimento lento (6 a 9 dias).

As características dos três isolados da espécie *D. discolor* foram homogêneas, visto que todos apresentaram crescimento intermediário, com colônia puntiforme e elevação lenticular, pouca produção de muco e apresentaram reação alcalina em meio YM.

D. barbatum apresentou dezesseis microsimbiontes que acidificaram o meio de cultivo e nove que alcalinizaram das três áreas de estudo e apresentaram grande variação quanto aos caracteres morfofisiológicos analisados.

7.3 FILOGENIA MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Desmodium* spp.

Das vinte e nove estirpes isoladas de *Desmodium* spp., onze estirpes foram classificadas na classe Beta-proteobacteria (gênero *Paraburkholderia*) e dezoito estirpes pertencentes a Alfa-proteobacteria (gêneros *Rhizobium*, *Allorhizobium* e *Bradyrhizobium*).

Os resultados referentes à filogenia desses grupos serão apresentados

separadamente.

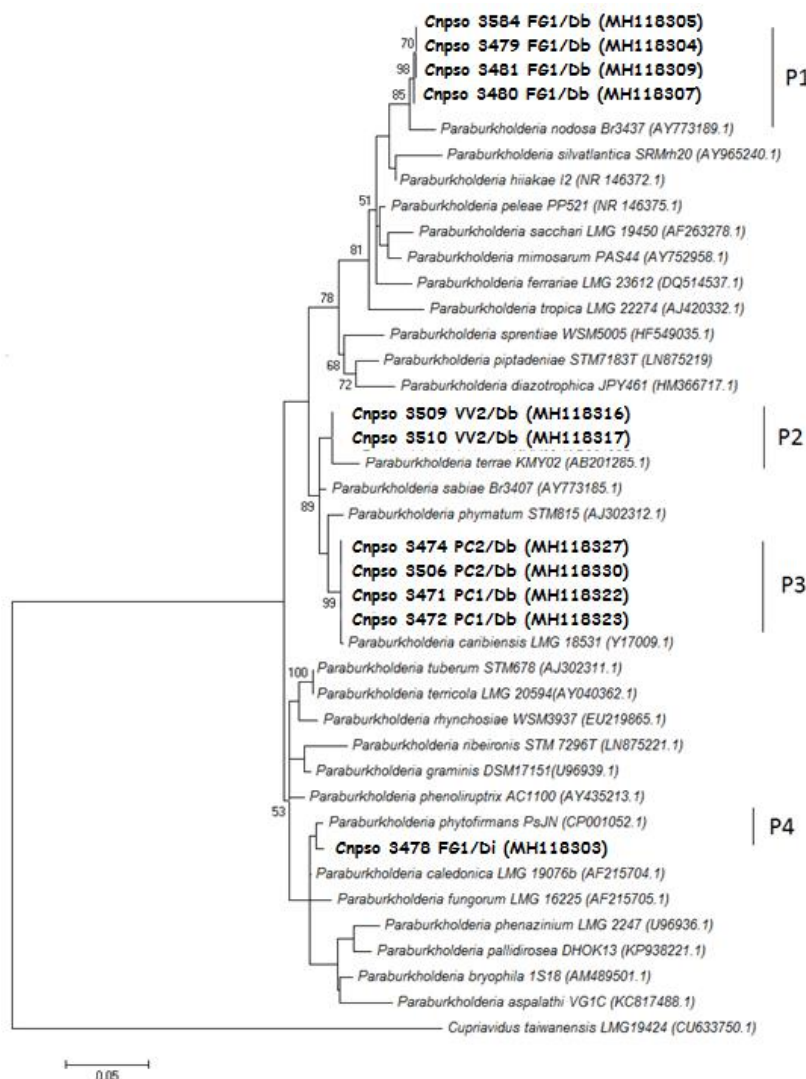
7.3.1 Beta-Rizóbios

As onze estirpes de beta-rizóbios foram classificadas como pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* sp isoladas de nódulos de *D. barbatum* (dez estirpes) e *D. incanum* (uma estirpe), as quais foram amostradas nos três Parques considerados no estudo (Figura 5).

A árvore filogenética construída com sequências parciais (1241 pb) do gene 16S apresenta uma elevada relação entre os clados formados e as localidades dos pontos de coleta (Figura 5). Os clados P1, P2 e P3 integraram apenas rizóbios isolados de *D. barbatum*. O clado P1 é composto por estirpes amostradas no Parque Nacional dos Campos Gerais e a estirpe tipo da espécie *P. nodosa*; o clado P2 foi formado por *P. terrae* além de duas estirpes oriundas do Parque Estadual de Vila Velha e quatro estirpes isoladas do Parque Estadual do Cerrado que apresentaram elevada identidade com *P. caribiensis* compondo o clado P3.

A estirpe *Cnpso 3408* foi o único beta-rizóbio isolado de *D. incanum* e integrou o grupo P4, juntamente à *P. phytotfirmans* com um baixo valor de suporte estatístico.

Figura 4 - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S rDNA de rizóbios classificados como *Paraburkholderia* spp. isolados de nódulos radiculares de *Desmodium* spp. utilizando o software Mega 6.06 (Máxima Verossimelhança, modelo Tamura-3-parâmetro).



7.3.2 Alfa-Rizóbios

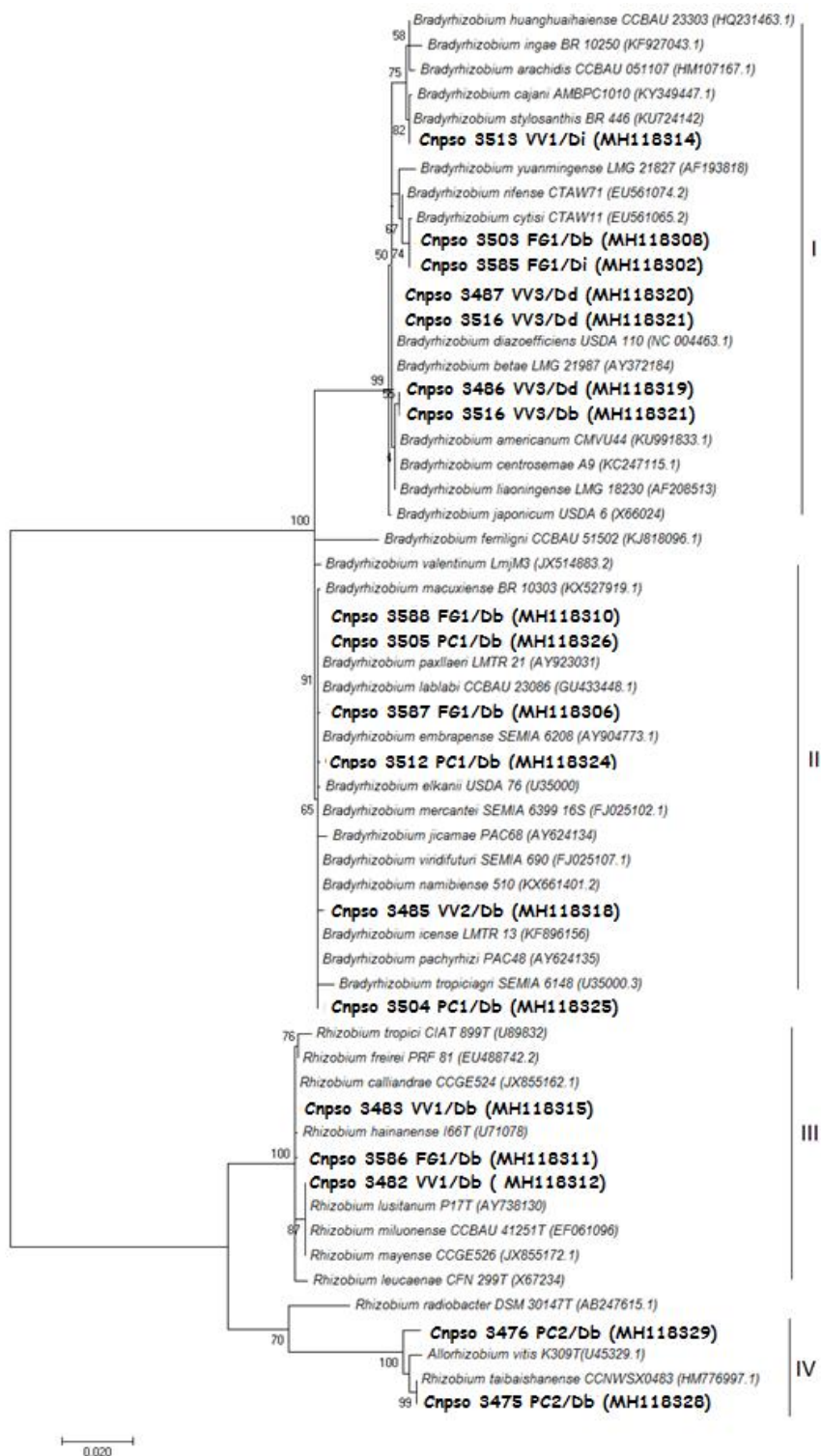
Foi construída uma árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene ribossomal 16s DNAr (1108 pb) contendo as dezoito estirpes classificadas como alfa-rizóbios, sendo quatorze isoladas de *D. barbatum*, três de *D. discolor* e uma de *D. incanum* (Figura 6). A árvore filogenética apresentou a formação de dois superclados (I e II) correspondentes a estirpes de *Bradyrhizobium* spp e dois clados agrupando espécies de *Rhizobium/Allorhizobium* (III e IV).

No superclado I ocorreu a formação de subgrupos onde as estirpes estão relacionadas principalmente com as espécies *B. stylosanthise* *B. cajani* (Cnpso 3513) e *B. cytisi* (Cnpso 3503 e Cnpso 3585); o superclado ainda conta com outros três isolados amostrados no ponto VV3 e um no ponto VV1, que apresentaram elevada identidade nucleotídica com *B. americanum*, *B. diazoefficiens* e *B. japonicum* (CNPSO 3487, CNPSO 3516, CNPSO 3486 e CNPSO 3507) (Tabela suplementar 2). O superclado II incluiu seis isolados, todos simbiossiontes de *D. barbatum* provenientes das três unidades de conservação estudadas, cujo estado filogenético apresentou baixa resolução.

Os clados III e IV integraram apenas isolados de *D. barbatum*. O clado III incluiu três dos isolados e estirpes tipo das espécies *R. calliandrae*, *R. lusitanum*, *R. miluonense*, *R. mayense* dentre outras. Já o clado IV incluiu dois isolados, além das espécies *R. radiobacter*, *R. taibaishanense* e *Azorhizobium vitis*.

Considerando que a análise filogenética do gene 16s DNAr não permitiu um claro delineamento acerca da posição taxonômica de alguns isolados, a filogenia de sequências parciais (326 pb) do gene *recA* também foi utilizada.

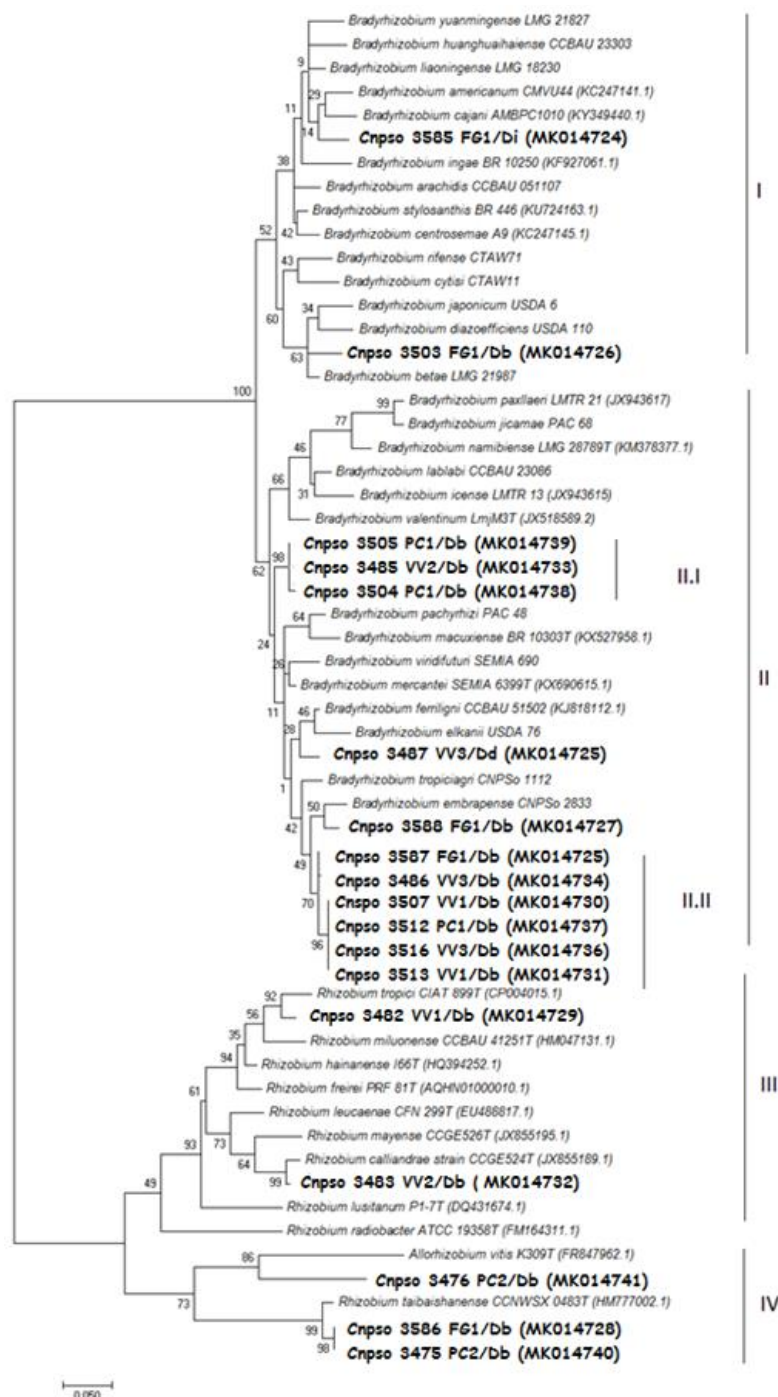
Figura 5 - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S rDNA de alfa-rizóbios isolados de nódulos radiculares de *Desmodium* spp., juntamente a estirpes tipo dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Allorhizobium*. A árvore foi construída no software



A árvore filogenética do gene *recA* permitiu maior resolução taxonômica, especialmente dos superclados de *Bradyrhizobium* spp. (Figura 7). Foi verificada a mesma formação de clados observada na árvore do gene 16S DNAr (Figura 6), com congruência elevada entre os componentes de todos os clados. Observou-se ainda a formação de dois subgrupos (II.I e II.II) no superclado II, com elevado suporte estatístico, que não integraram nenhuma espécie conhecida de *Bradyrhizobium*. Enquanto o subgrupo II.I integrou apenas isolados de *D. barbatum* pertencentes ao superclado II da árvore filogenética do gene 16S DNAr (Figura 6), o subgrupo II.II foi mais heterogêneo, incluindo isolados das três espécies de *Desmodium* e pertencentes aos superclados I e II da árvore do gene 16S DNAr (Figura 6).

A filogenia do *recA* foi especialmente eficiente para definição taxonômica dos gêneros *Rhizobium* e *Allorhizobium* (Figura 7). A análise permitiu a inferência taxonômica dos isolados de *D. barbatum* nominados *Cnpso* 3482, *Cnpso* 3483, *Cnpso* 3475, *Cnpso* 3486 e *Cnpso* 3476 nas espécies *R. tropici*, *R. calliandrae*, *R. taibaishanense* e *A. vitis*, respectivamente.

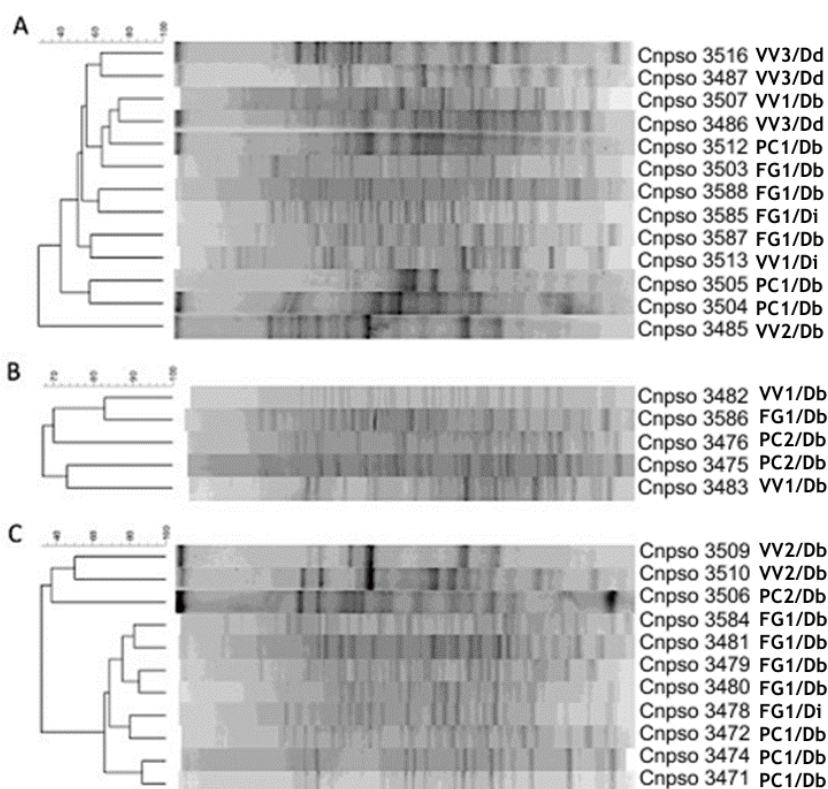
Figura 7 - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene *recA* de alfa-rizóbios isolados de nódulos radiculares de *Desmodium* spp., juntamente a estirpes tipo dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Allorhizobium*. A árvore foi construída no software Mega.



7.4 DNA-FINGERPRINT POR BOX-PCR

Os perfis de BOX-PCR revelam um elevado grau de polimorfismo entre os microssimbiontes de *Desmodium*, visto que foi possível verificar a ocorrência de perfis únicos para todas as estirpes. Considerando que o BOX-PCR é uma análise de variabilidade intraespecífica utilizada para identificação clonal, os dendrogramas foram construídos com estirpes pertencentes ao mesmo gênero (Figura 8).

Figura 8 - Dendrograma baseado nos perfis de BOX-PCR de rizóbios isolados de nódulos de *Desmodium* sp., utilizando o algoritmo UPGMA, coeficiente de Jaccard e 2% de tolerância, utilizando o software Bionumerics 7.6 (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium) A-gênero.



Mesmo sendo isolados de um mesmo ponto de coleta e mesma espécie hospedeira, os isolados representam genótipos únicos. Uma elevada heterogeneidade foi observada entre os isolados de *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia*, os quais foram agrupados com coeficientes de similaridade de 27,5% e 31,8%, respectivamente. Menos representativas em abundância, as estirpes

de *Rhizobium/ Allorhizobium* apresentaram 67,3% de similaridade segundo os perfis de BOX-PCR.

Foi observada correlação entre os agrupamentos formados na análise por BOX-PCR e origem dos isolados apenas para o gênero *Paraburkholderia* (Figura 8C).

8 DISCUSSÃO

A região dos Campos Gerais caracteriza-se por sua elevada riqueza de espécies da família Fabaceae e nesse contexto destaca-se o gênero *Desmodium*. Espécies do gênero são reputadas como pioneiras para o reflorestamento, inclusive com potencial utilização na recuperação de áreas degradadas, apresentam elevado valor forrageiro e compõem pastagens naturais especialmente na região Sul do Brasil (NERI et al., 2011).

Foram encontradas plantas nativas nodulíferas das espécies *D. barbatum*, *D. discolor* e *D. incanum*, em três unidades de conservação dos Campos Gerais (Tabela suplementar 1). Tais espécies apresentam ampla distribuição em clima temperado e regiões subtropicais, provavelmente por sua capacidade de germinação em uma ampla faixa de temperatura (MALDANER et al., 2014). As espécies *D. barbatum* e *D. incanum* são abundantes em diferentes domínios fitogeográficos enquanto que *D. discolor* apresenta espectro de distribuição mais estrito, ocorrendo na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (REFLORA, 2018). Espécimes nodulíferos de *D. barbatum* foram amostrados em todos os pontos de coleta, com exceção de VV3, enquanto *D. incanum* foi encontrado em FG1 e VV1 e a espécie *D. discolor* foi amostrada exclusivamente em VV3 (Tabela suplementar S1).

Os solos dos cinco pontos de amostragem foram caracterizados como ácidos (pH 4-5,5) e com baixa concentração de nutrientes, condições que não são impeditivas ao desenvolvimento de *Desmodium* spp (SILVA et al., 2001) e nodulação por rizóbios compatíveis.

Os levantamentos acerca da diversidade de rizóbios simbiotes de *Desmodium* são escassos, mas apontam sua afinidade simbiótica com bactérias pertencentes à Classe Alphaproteobacteria (GU et al., 2007; GRANADA et al., 2014). GU et al. (2006) relataram que a maioria dos rizóbios nodulando *Desmodium*, na China, foram pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, taxonomicamente relacionados com *B. elkanii*, *B. japonicum* e *B. yuanmingense*; em menor proporção, foram isoladas estirpes dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*.

Toniutti et al. (2017), utilizando *D. incanum* como planta isca, isolaram sessenta e quatro rizóbios de amostras de solos da Argentina, todos pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. Esses isolados exibiram diferentes níveis de tolerância a parâmetros de estresse abiótico, tais como pH, salinidade e temperaturas elevadas.

No presente estudo, confirmamos a promiscuidade simbiótica bem como a prevalência de *Bradyrhizobium* como simbiontes preferenciais de *Desmodium* spp. (Figuras 6 e 7). Relatamos que as espécies *D. incanum* e *D. barbatum* foram noduladas por mais de um gênero de rizóbio, corroborando com dados prévios que apontam promiscuidade simbiótica entre *Desmodium*-rizóbios (TONIUTTI et al, 2017; GRANADA et al., 2014; XU et al, 2015). Já *D. discolor* foi nodulada apenas por rizóbios do gênero *Bradyrhizobium* (Figura 6 e 7).

A promiscuidade simbiótica pode ser vista como favorável para a planta, por ampliar suas possibilidades de obtenção do N via FBN auxiliando a planta a ocupar novos habitats. Isso pode estar associado a presença de diferentes genes de nodulação nos genomas bacterianos, gerando reconhecimento entre a planta hospedeira e o microssimbionte, permitindo a infecção por diferentes espécies de rizóbios em uma mesma leguminosa (PIRES et al., 2017).

Por outro lado, mesmo que várias espécies de rizóbios se associem a uma mesma espécie de leguminosa, sabe-se que estes exibem diferentes taxas de eficiência de fixação de nitrogênio (MIRANDA et al., 2003). Nesse contexto, um alto grau de especificidade entre o microssimbionte e seu hospedeiro pode propiciar maior eficiência de fixação biológica em termos quantitativos, sobretudo favorecer o desenvolvimento vegetal em condições ambientais bastante específicas (ANDREWS, 2016).

Segundo análises filogenéticas do gene 16S DNAr os isolados do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* apresentam-se filogeneticamente relacionados com as espécies *B. elkanii*, *B. icense*, *B. japonicum*, *B. yuanmingense*, *R. tropici*, *R. freirei* (Figura 6), de forma congruente ao que foi previamente relatado por outros autores que isolaram nódulos de *Desmodium* spp. (Gu et al., 2006; Xu et al., 2015; Toniutti et al., 2017).

Foi realizado o sequenciamento do gene ribossomal 16S DNAr das estirpes em estudo, o qual é considerado o principal marcador molecular utilizado para procariotos. No entanto, em muitos casos essa ferramenta apresenta baixa resolução filogenética e poder discriminatório a nível de espécie, principalmente no que se refere a espécies que são estritamente relacionadas (JANDA; ABBOTT, 2007). Alguns estudos apontaram como essa ferramenta mostra-se limitante para distinção de espécies dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, (QIAN et al., 2003; YOUNG et al., 2006). O

mesmo foi observado no presente estudo, visto que a inferência taxonômica dos alfa-rizóbios foi inconclusiva.

Dessa forma, associou-se a análise filogenética de outro gene *housekeeping*, o gene *recA*, o qual atua no reparo e recombinação do DNA e tem se mostrado eficiente como marcador filogenético na classificação de estirpes de rizóbios (PAYNE et al., 2005). Tal combinação permitiu um melhor delineamento acerca da filogenia dos microsimbiontes, apresentando estirpes estreitamente relacionadas a espécies que já foram descritas como nodulíferas do gênero *Desmodium*, como *B. embrapense* (DELAMUTA et al., 2015).

Através do *recA* também foi constatada a ocorrência de um isolado do gênero *Allorhizobium* spp, possivelmente pertencente à espécie *A. vitis*, a qual era pertencente ao gênero *Agrobacterium* e passou por diversas reclassificações (MOUSAVI et al., 2014, 2015; RAMIREZ-BAHENA et al, 2014). Além disso, também verificou-se a formação de dois subgrupos (II.I e II.II) (Figura 7) com elevado suporte estatístico que não integraram nenhuma estirpe de referência.

Diferente de descrições prévias, o presente estudo ainda relata a presença de beta-rizóbios pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* como simbiontes de *D. barbatum* e *D. incanum* (Figura 5). Muito embora a maioria dos relatos de rizóbios do gênero *Paraburkholderia* sp. tenham sido relacionados a leguminosas do gênero *Mimosa* (CHEN et al., 2005; MOULIN et al., 2002; REIS JR., 2010; VANDAMME et al., 2002), outros estudos demonstram a ocorrência desse grupo em simbiose com outras espécies de leguminosas em regiões tropicais como *Cyclopia* sp. (ELLIOT et al., 2007), *Rhynchosia ferulifolia* (DE MEYER et al, 2013a), *Lebeckia ambigua* (DE MEYER et al., 2013b), *Podalyria calyptata* (LEMAIRE et al., 2016).

A filogenia do gene 16S DNAr das estirpes pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* revelou uma relação com localidade geográfica (Figura 6). Por meio da técnica do BOX-PCR, foi constatado que os isolados não se tratavam de clones, por apresentarem perfis únicos (Figura 7). Desta forma, observou-se que os beta-rizóbios variaram em distribuição e diversidade de espécies de acordo com sua localidade geográfica.

De acordo com Lemaire et al. (2016), em um estudo filogenético que investigou parâmetros biogeográficos na distribuição de rizóbios do gênero *Paraburkholderia*, foi observado que os genes de fixação de nitrogênio e de nodulação estão diretamente relacionados fatores geográficos e à planta hospedeira. Portanto, possivelmente

exista uma relação de especificidade entre o gênero *Paraburkholderia*, a planta hospedeira, os parâmetros edáficos que caracterizam cada área de estudo. Isso sugere que diferentes populações microbianas de *Paraburkholderia* que nodulam leguminosas do gênero *Desmodium* nas diferentes áreas de estudo co-evoluíram isoladamente ao longo dos anos, resultando em maior especificidade leguminosa-microssimbionte (PIRES et al., 2017).

Um dos principais fatores relatados como crucial na diversidade e estrutura de comunidades bacterianas no solo do gênero *Paraburkholderia* é o pH ácido, que permite inclusive certa vantagem competitiva desses microssimbiontes em relação aos alfa-rizóbios, esse gênero é considerado ácido tolerante, e assim apresenta adaptação para sobreviver em solos com características hostis (CHAGASJUNIOR et al., 2012).

O isolamento de rizóbios de *D. multiflorum* no Taiwan em regiões com solos alcalinos revelou a ocorrência apenas de alfa-rizóbios, com destaque para as espécies *Agrobacterium tumefaciens* e *R. galegae* (HUNG et al., 2005).

Osrizóbios isolados de *D. triflorum* e *D. heterophyllum*, nativos de uma região de solo arenoso onde ocorrem frequentes inundações, foram predominantemente pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (HUANG et al., 2018). Sabe-se que solos que sofrem inundações tendem a ser mais alcalinos devido a redução dos compostos de ferro, essa diminuição é causada pela ausência de oxigênio, gerando o aumento de hidroxila no solo (MATTAR et al., 2002).

O presente relato de isolamento de *Paraburkholderia* spp. simbioses de *Desmodium* do presente estudo ocorreu a partir de nódulos de plantas nativas, que se encontravam em Unidades de conservação. Usualmente, os estudos conduzidos com esse enfoque foram realizados próximo de ou em áreas agrícolas, em que práticas como correção dos parâmetros do solo e fertilização são bastante usuais (SILVA et al., 2015). Fatores como baixa concentração de nitrogênio, baixa fertilidade natural do solo e pH ácido favorecem o predomínio e eficiência simbiótica de *Paraburkholderia* em relação a outros gêneros de rizóbios (SUÁREZ-MORENO, et al. 2012; PIRES et al., 2017).

Os dados apresentados reinteram que estudos em áreas conservadas e com plantas nativas possuem relevância na compreensão da interação plantas-rizóbios, por permitir a descrição de novos taxons e revelar novos modelos de simbiose. Além disso, a constatação de nodulação de *Desmodium* por *Paraburkholderia* pode

representar uma nova alternativa para seleção e recomendação de bactérias do gênero como inoculantes.

9 CONCLUSÃO

Bactérias fixadoras de nitrogênio desempenham um valioso papel nos ambientes naturais, visto que contribuem significativamente na incorporação de nutrientes. Porém, tal papel depende de uma específica interação com a planta hospedeira.

Foi verificada a ocorrência de nodulação de espécimes de *Desmodium* spp. nativos de unidades de conservação dos Campos Gerais por rizóbios pertencentes aos gêneros *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Paraburkholderia*, revelando a elevada promiscuidade simbiótica especialmente da espécie *D. barbatum*. Observou-se uma correlação entre espécies de *Paraburkholderia* e a sua localidade geográfica, o que não foi observado dentre os alfa-rizóbios.

Relatos prévios já apontam que espécies de *Desmodium* são noduladas por alfa-rizóbios; a ocorrência de uma elevada parcela de beta-rizóbios associados a *Desmodium* spp. dos Campos Gerais pode ser decorrente das características edáficas dos solos das áreas de amostragem, em especial o pH.

Os resultados obtidos contribuirão para o conhecimento acerca da biodiversidade microbiana dos Campos Gerais e também poderão auxiliar futuramente no delineamento de estratégias de conservação desses remanescentes bem como na seleção de rizóbios eficientes em nodulação e fixação de nitrogênio.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T. H. DE. Relatório Final: Estudo de Campo - **Florística do Parque Estadual do Cerrado em Jaguariaíva** - Paraná: Atualização da Lista de Espécies, Londrina, PR, p.189, 2010.
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Growth promotion and protection of lentil (*Lensesculenta*) against herbicide stress by *Rhizobium* species. **Annals of Microbiology**, 60: 735-745, 2010.
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Insecticide-tolerant and plant-growth-promoting *Rhizobium* improves the growth of lentil (*Lensesculentus*) in insecticide-stressed soils. **Pest Management Science**, 67(4): 423-429, 2011.
- ALMEIDA, C. G.; MORO, R. S. **Análise da cobertura florestal no Parque Nacional dos Campos Gerais**, Paraná, como subsídio ao seu plano de manejo. *Terra Plural*, 1:115-122, 2007.
- ANDREWS, M; ANDREWS, M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Internacional Journal of molecular Science*.18:705, 2017
- AZEVEDO, A.M.G. de 1981. **O gênero *Desmodium* Desv. no Brasil: Considerações Taxonômicas**. 315f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- BARRETT, C.F; PARKER, M. A. "Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. Nodule Bacteria on Two *Mimosa* spp. in Costa Rica". **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 72, Nº. 2, p. 1198-1206. February, 2006.
- BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M; BARCELLOS, F. G.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* Seven Years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. **Microbial Ecology**, 53: 270-284, 2007.
- BONTEMPS, C.; ROGEL, M. A.; WIECHMANN, A.; MUSSABEKOVA, A., MOODY; SIMON, M. F.,MOULIN, L.; ELLIOTT, G. N., LACERCAT-DIDIER, L.,DASILVA, C., GREYER, R., CAMARGO-RICALDE, S. L., CHEN, W.,SPRENT, J. I., MARTÍNEZ-ROMERO, E.,YOUNG, J. P. W., AND JAMES, E. K. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **New Phytol.** 209:319-333, 2016.
- BOUSSAU, B.; KARLBERG, E. O.; FRANK, A. C.; LEGAULT, B.; ANDERSSON, S. G. E. *Computational inference of scenarios for α -proteobacterial genome evolution*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101 (26): 9722-9727, 2004.
- BROUGHTON, William J. et al. Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 129-137, 2003.

CARMO, M. R. B. do. **Caracterização fitofisionômica do Parque Estadual do Guartelá, Município de Tibagi, Estado do Paraná.** 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - UNESP, Rio Claro, 2006.

CASTANHEIRA, N.; DOURADO, A.C.; ALVES, P.I.; CORTÉSPALLERO, A.M.; DELGADORODRÍGUEZ, A.I.; PRAZERES, Â.; BORGES, N.; SÁNCHEZ, C.; BARRETO CRESPO, M.T.; FARELEIRA, P. Annual ryegrass-associated bacteria with potential for plant growth promotion. **Microbiol. Res.** 2014, 169, 768–779

CERVI, A.C., VON LINSINGEN, L., HATSCHBACH, G.; RIBAS, O.S. 2007. **A vegetação do Parque Estadual de Vila Velha, município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil.** Bol. Mus. Bot. Mun. 69:1-52.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de.; OLIVEIRA, A. N. de. Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 467-470, 2009.

CHAHBOUNE, R.; BARRIJAL, S.; MORENO, S., BEDMAR E. J. (2011). Characterization of *Bradyrhizobium* species isolated from root nodules of *Cytisus villosus* grown in Morocco. **Syst. Applied Microbiol.** 34:440–445
10.1016/j.syapm.2011.04.008

COENYE, T., VANLAERE, E., SAMYN, E., FALSEN, E., LARSSON, P.; VANDAMME, P. *Advenella incenata* gen. nov., sp. nov., a novel member of the Alcaligenaceae, isolated from various clinical samples. **Int J Syst Evol Microbiol**, 55, 251–256, 2005.

COLWELL, R.R. **Polyphasic taxonomy of bacteria**, In: IIZUKA H. ; HASEGAWA T. (eds). Culture Collections of Microorganisms, Tóquio: University of Tokyo Press, 1970, p; 421-436.

CORADIN, L; SIMINSKI, A; REIS, A. 2011. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro, região sul.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 934p

CREWS, T.E. *The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations.* **Biogeochemistry** 46(1–3): 233–46, 1999.

DALAZOANA, K. **Espacialização dos campos nativos na Escarpa Devoniana do Parque Nacional dos Campos Gerais, Paraná.** Ponta Grossa, 2010. Dissertação (Mestrado em Gestão do Território) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. 2010.

DE MEYER, S. E., CNOCKAERT, M., ARDLEY, J. K., MAKER, G., YATES, R., HOWIESON, J. G.; VANDAMME, P. (2013b). *Burkholderiasprentiae* sp. nov., isolated from *Lebeckiaambigua* root nodules. **Int J Syst Evol Microbiol.** 63, 3950–3957.

DE MEYER, S. E., CNOCKAERT, M., ARDLEY, J. K., TRENGOVE, R. D., GARAU, G., HOWIESON, J. G. ; VANDAMME, P. (2013a). *Burkholderia rhynchosiae* sp. nov.,

isolated from *Rhynchosia ferulifolia* root nodules. **Int J Syst Evol Microbiol.** 63, 3944–3949.

DELAMUTA, J.R.; RIBEIRO, R.A; GOMES, D.F.; SOUZA, R.C; CHUEIRE, L. M.; HUNGRIA, M. Genome Sequence of *Bradyrhizobium stylosanthis* Strain BR 446T, a Nitrogen-Fixing Symbiont of the Legume Pasture *Stylosanthes guianensis*. **Genome Announc.**, 2016.

DENISON, R.F.; KIERS, E.T. Lifestyle alternatives for rhizobia: Mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. **FEMS Microbiology Letters** 237:187–193, 2004.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature**, v. 02, p. 621-631, 2004.

DOBRITSA, A.P.; SAMADPOUR, M. Transfer of eleven *Burkholderia* species to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov., a new genus to accommodate twelve species of *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. **I J Syst Evol Micr**, 2016.

DOYLE, J. J. Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 11, p. 1289-1295, 2011.

DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo. In: VARGAS, M.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrado**. Planaltina: Embrapa—CPAC, 1997. p. 43-44.

ELLIOTT, G. N. *et al.* Nodulation of *Cyclopia* spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. **Annals of Botany**, v. 100, n. 7, p. 1403-1411, 2007.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; VINUESA, P., MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; HIRSCH, A. M.; ; CABALLERO-MELLADO, J. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. **Current microbiology**, v. 67, n. 1, p. 51-60, 2013.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, 8, 186-194, 1998a.

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

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 897-903, 1997.

GAUNT, M. W., TURNER, S. L., RIGOTTIER-GOIS, L., LLOYD-MACGILP, S. A.; YOUNG, J. P. W. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **Int J Syst Evol Microbiol**, 51, 2037–2048, 2001.

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

- GRANADA, C. E.; STROCHEIN, M.; VARGAS, L. K.; BRUXEL, M.; SÁ, E. L. S.; PASSAGLIA, L. M. P. Genetic diversity and symbiotic compatibility among rhizobial strains and *Desmodium incanum* and *Lotus* spp. **Plants. Genet Mol Biol** 37(2):396-405, 2014.
- GU, J.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. **Applied Microbiology**, 44:286-292, 2007.
- HUANG, T.C; LIU, C.T.; KAO, W.Y. **Rhizobia symbiosis of seven leguminous species growing along Xindian riverbank of Northern Taiwan.** *Taiwania*, 63(1): 7-15, 2018.
- HUNG, M.H.; BHAGWATH, A.A.; SHEN, F.T; DEVASYA, R.P; YOUNG, C.C. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. **Pedobiology**, 49(6): 577-584, 2005.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. **Inoculantes microbianos: situação no Brasil.** In: BIOFAG, org. *Uso y perspectivas de los biofertilizantes en iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial.* Montevideo: BIOFAG p.1-16, 2007.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2001 48 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13).
- JANDA, J. M. ; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007.
- JONES K. M., KOBAYASHI H., DAVIES B. W., TAGA M. E., WALKER G. C. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: - *Sinorhizobium-Medicago*-model. **Nature Review. Microbiology**.5, 619–33. Agosto, 2007.
- JORDAN, D.C., 1984. Family III Rhizobiaceae, In: Krieg, N.R., Holt, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, ninth ed., Vol. 1, 1984, Williams ; Wilkins, Baltimore, pp. 235–244.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Appl. Soil Ecol.**, 32:210-220, 2006.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; SANTOS, J.C.P. ; BERTON-JUNIOR, J.F. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil Till. Res.**, 87:205-217, 2006.
- KLEPA, M. S.; PAULITSCH, F.; CARMO, M. R. B.; DA SILVA, A. R.; BATISTA, J. S. S. Levantamento **de espécies de Fabaceae nodulíferas nativas dos Campos Gerais (Paraná – Brasil).** In: XXVII RELAR - Reunião Latinoamericana de Rizobiologia, 2016, Londrina. XXVII RELAR - Reunião Latinoamericana de Rizobiologia: fortalecendo as parcerias Sul-Sul. Curitiba: NEPAR, p.160, 2016.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A Conservação do Cerrado Brasileiro. Belo Horizonte, **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, jul. 2005, p. 148-155, 2005.

LAVIN, M. et al. **Metacommunity process rather than continental tectonic history better explains geographically structured phylogenies in legumes.** *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, v.359, 2004.

LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B., and LOCK, M. 2005. **Legumes of the World.** *Royal Botanic Gardens*, Kew, UK.

LIMA, L. C. P. **Estudos Filogenéticos em *Desmodium* Desv. (Leguminosae-Papilionoideae) na América do Sul e Revisão Taxonômica das Espécies Brasileiras.** Feira de Santana, 2011. 348 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana.

LINDSTRÖM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: The case of rhizobia. *Res. Microbiol.* 2010, 161, 453–463.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro.** Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF, 2004.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas.** São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. pp.126-192.

MALDANER, L. J.; HORING, K.; SCHNEIDER, J. F.; FRIGO, J. P.; AZEVEDO, K. D.; GRZESIUCK, A. E. **Exigência agroclimática da cultura do milho (*Zea mays* L.).** *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v.3, p.13-23, 2014.

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

MARTINS, A. F. **Rizóbios, para *Lotus* spp., resistentes à acidez e à salinidade do solo.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

MCCORMACK, G. 2007. ***Desmodium incanum*.** Disponível em: <http://cookislands.bishopmuseum.org/showImage.asp?file=MM/MX14/4P181_Desm-inca-RR_GMmix_MXa.jp;title=Desmodium+incanum++%28Spanish+Clover%29;height=400;width=600> Acesso em 10 de mar. de 2018.

MEDEIROS, R. B.; FAVRETO, R.; FERREIRA, O. G. L. et al. **Persistência de *Desmodium incanum* DC. ("pega-pega") em meio a cultivos agrícolas estabelecidos sobre campo nativo.** *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v.12, n.1-2. 2006. No prelo.

- MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NOBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, vol.30, n.2, p. 235-246, 2006.
- MELO, M.S.; MEDEIROS, C.V.; GIANNINI, P.C.F.; GARCIA, M.J.; PESSENDA, L.C.R. 2003. **Sedimentação quaternária no espaço urbano de Ponta Grossa, PR**. São Paulo, UNESP, Geociências, v.22, n.1, p.33-42.
- MENEGUZZO, I. S.; ALBUQUERQUE, E. S. **A política ambiental para a região dos Campos Gerais do Paraná**. *RA'E GA*, Curitiba, n. 18. p. 51-58, 2009.
- MENNA, P., HUNGRIA, M., BARCELLOS, F.G., BANGEL, E.V., HESS, P.N., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, 29 (4), 315-332, 2006.
- MIRANDA, C. H. B.; VIEIRA, A.; CADISCH, G. Determinação da fixação biológica de nitrogênio no amendoim forrageiro (*Arachis* spp.) por intermédio da abundância natural de ^{15}N . **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, supl. 2, p. 1859-1865, 2003.
- MORGANTE, P. G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/61713685/3319817-Fixacao-Biologica-e-Assimilacao-de-Nitrogenio-02>> Acesso em: 26 jul, 2016.
- MOULIN, L.; JAMES, E. K.; KLONOWSKA, A.; FARIA, S. M.; ; SIMON, M. F. Phylogeny, **Diversity, Geographical Distribution, and Host Range of Legume-Nodulating Betaproteobacteria**: What Is the Role of Plant Taxonomy? *Biological nitrogen fixation*, John Wiley ; Sons, Hoboken, p. 177-190, 2015.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950, 2001.
- MOUSAVI, S.M.; et al. *Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud identification in raw ground meat commercially sold in Iran*. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.40, p.47–51, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/222815549_Fraud_identification_in_industrial_meat_products_by_multiplex_PCR_assay>. Acesso em: 25 jan. 2018. doi: 10.1016/j.jfca.2014.12.009.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, 858 ARANTES, A. A., PRADO, J. ; RANAL, M. A. RODRIGUÉSIA 59 (4): 845-858. 2008 C. G.; FONSECA, G. A. B. ; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**.403: 853-858, 2000.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M.T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v.54, p.655-670, 2003.

NERI, A. V.; SOARES, GgM. P.; MEIRA-NETO, J. A.; DIAS, L. E. Espécies de cerrado com potencial para recuperação de áreas degradadas por mineração de ouro, Paracatu-MG. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.4, p.907-918, 2011.

NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (Eds.) *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Dordrecht: Kluwer, p. 3-8, 2000.

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

OHASHI, H. Tribe Desmodieae. In: Lewis, G.P.; Schrire, B.; Mackinder, B. ; Lock, M. (Eds.). *Legumes of the World*. Kew: **Royal Botanic Gardens**, pp. 433-453, 2005.

PARKER, M.A; JANKOWIAK, J.G; LANDRIGAN, G.K.; Diversifying selection by Desmodiinae legume species on Bradyrhizobium symbionts. **FEMS Microbiol Ecol** .91(7). pii: fiv075. doi: 10.1093/femsec/fiv075. Epub, 2015.

PEREIRA, P. M. **Taxonomia e diversidade genética de rizóbios microssimbiontes de distintas leguminosas com base na análise polifásica (BOX-PCR e 16S RNAr) e na metodologia de MLSA**. 2008. 100f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

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

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana. *Royal Botanic Gardens, Kew*, Associação Plantas do Nordeste, 2009.

RAVEN, P. H ; EVERT, R. F. ; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Tradução de Antônio Salatino et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 31-36 p, 2001.

REIS JUNIOR, F. B. dos; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOT, G. N.; ELIAS NETO, N.; LOUREIRO, M. de F.; QUEIROZ, L. P. de; CHEN, W-M.; NORÉM, A.; FARIA, S. M. de; BONTEMPS, C.; GOI, S. R. de; YOUNG, P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the cerrado and caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**.186, 4, 934–946, 2010.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, KR dos S. **Fixação biológica de nitrogênio-estado da arte**: Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília, DF: *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, p. 151-80, 2005.

REMIGI, P.; ZHU, J.; YOUNG, J.P.W.; MASSON -BOIVIN, C. Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen -Fixing Legume Symbionts. **Trends in Microbiology**, 24, 63 -75, 2016.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 429, 2014.

SCHLEIFER, K.H. Microbial diversity: facts, problems and prospects. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p.3-9, 2004.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review of Genetics**, 32: 33-57, 1998.

SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 701, 2009.

SILVA JÚNIOR, E.B.; FERREIRA, A.; BODDEY, M.R.; ZILLI, J.E. ; XAVIER, G.R. **Ontogenia da nodulação de feijão-caupi em vaso com solo da área de produção do Centro-Oeste**. In: III Congresso Nacional de feijão-caupi. Recife. *Anais...* Recife: IPA, 2013.

SILVA, A. R. **Florística, fitossociologia e fenologia de três fitofisionomias campestres no Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná**. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2014.

SILVA, N.C.; FRANKE, L.B.; NABINGER C. et al. **Produção e partição da biomassa de *Desmodium intanum* em resposta à aplicação de fósforo**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36,n.3, p.541-548, 2001.

SKERMAN, P. 1.; CAMERON, D. G; RIVEROS, F. **Leguminosas Forrajeiras Tropicales Roma**: FAO, 707 p., 1991.

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

STACKEBRANDT, E., FREDERIKSEN, W., GARRITY, G. M., GRIMONT, P. A. D., KAMPFER, P., MAIDEN, M. C. J., NESME, X., ROSSELLO´-MORA, R., SWINGS Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. **Int J Syst Evol Microbiol** 52, 1043–1047, 2002.

STETS, M. I. et al. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell. MALDI-TOF MS analysis. **Journal of biotechnology**, v. 165, n. 3, p. 167-174, 2013.

SUÁREZ-MORENO, Z.R., CABALLERO-MELLADO, J., COUTINHO, B.G., MENDONÇA-PREVIATO, L., JAMES, E.K., AND VENTURI, V. Common features of

- environmental and potentially beneficial plant-associated Burkholderia. **Microb Ecol** 63: 249– 266, 2012.
- SY, A; GIRAUD E, JOURAND P, et al. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**. 183:214–220, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p.449-484, 2014.
- TATE, R. L. **Soil Microbiology**. Wiley, 398, 1995.
- TONIUTTI, M.A.;FORNASERO, L.V.; ALBICORO, F.J.;MARTINI, M.C.;DRAGHI, W., ALVAREZ, F.; LAGARES, A.; PENSIERO, J.F.;DEL PAPA, M.F; Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from *Desmodium incanum* DC in Argentina: Phylogeny, biodiversity and symbiotic ability. **Syst Appl Microbiol**. 40(5):297-307, 2017.
- UHLMANN, A., GALVÃO, F.; SILVA, S.M. Análise da estrutura de duas unidades fitofisionômicas de savana (cerrado) no sul do Brasil. **Acta. Bot. Bras.**12(3):231-247, 1998
- VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **Int J Syst Evol Microbiol**. 54, 2285–2289, 2004.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. London: International Biological Programme, 190. 164 p. (IBP Handbook, 15), 1972.
- WANG, F.; WANG, E.T.; WU, L.J.; SUI, X.H.; LI, Y. JR; CHEN, W.X.- *Rhizobiumvallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. *International.Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 6, n. 11, p. 2582–2588, 2011.
- WEISBURG, M.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, 173, 697-703, 1991.
- XU, K. W.; ZOU, L.; PENTTINEN, P; ZENG, X. ; LIU, M.; ZHAO, K.; CHEN, C.; CHEN, Y. X.. Diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Desmodium* spp. in Panxi, Sichuan, China. **Applied Microbiology**, 39 (1), 33-40, 2016.
- YANG, K.Y; HAYNES, C.A.; SPATZAL, T.; REES, D.C. Howard JB. Turnover-dependent inactivation of the nitrogenase. MoFe-protein at high pH. **Biochemistry**. 53(2): 333-43, 2014.
- YESSICA, G. P.; ALEJANDRO, A.; RONALD, F. C.; JOSÉ, A. J.; ESPERANZA, M. R.; SAMUEL, C. S. J.; REMEDIOS, M. M.; ORMEÑO-ORRILLO, E. Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzopyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. **Applied Soil Ecology**, 63: 105-111, 2013.
- YOUNG, J. P. W.; CROSSMAN, L. C.; JOHNSTON, A. W. B.; THOMSON, N. R.; GHAZOU, Z. F.; HULL, K. H. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. **Genome Biology**, 7 (4): R34, 2006.

ZAHARAN, H. H. **Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology**. Botany Department, Faculty of Science, Beni-Suef 62511, 2001.

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

ZHANG, X.-X., TURNE, S. L., GUO, X.-W., YANG, H.-J., Debellé, F., YANG, G.-P. The Common Nodulation Genes of *Astragalus sinicus* Rhizobia Are Conserved despite Chromosomal Diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(7), 2988–2995, 2000.

ZIEGLER, D. et al. Ribosomal protein biomarkers provide root nodule bacterial identification by MALDI-TOF MS. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5547-5562, 2015.

ZILLER, S. R. 2000. **A estepe gramíneo-lenhosa no segundo planalto do Paraná: diagnóstico ambiental com enfoque à contaminação biológica**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 268 p.

APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar 1 – Características morfofisiológicas das colônias de rizóbios isolados de *Desmodium* sp suplementar 1 – Características morfofisiológicas das colônias de rizóbios isolados de *Desmodium* spp.

Estirpes	Área de coleta	Crescimento ¹	Diâmetro das colônias (mm)	pH BTB ²	Forma	Elevação	Borda	Superfície	Produção de muco	Consistência	Detalhes ópticos	Cromogênese da colônia BTB ²	Cromogênese da Colônia VC ³
Cnpso 3585	FG1	Lento	1,2	Alcalino	Circular	Lenticular	Denteada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaco	Creme	Rosa
Cnpso 3478	FG1	Rápido	2,3	Ácido	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Moderada	Viscosa	Opaco	Amarelo	Levemente rosado
Cnpso 3479	FG1	Intermediário	1	Ácido	Puntiforme	Lenticular	Ondulada	Lisa	Pouca	Viscosa	Translúcido	Amarelo	Levemente rosado
Cnpso 3584	FG1	Rápido	1	Ácido	Puntiforme	Convexo	Inteira	Rugosa	Pouca	Viscosa	Translúcido	Amarelo	Creme
Cnpso 3587	FG1	Intermediário	1	Alcalino	Circular	Convexo	Lobada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaca	Branco	Levemente rosado
Cnpso 3480	FG1	Rápido	3	Ácido	Circular	Convexo	Ondulada	Lisa	Moderada	Gomosa	Opaco	Amarelo	Creme
Cnpso 3503	FG1	Rápido	2	Alcalino	Irregular	Convexo	Ondulada	Lisa	Moderada	Butírica	Opaco	Branco	Rosa
Cnpso 3481	FG1	Rápido	2	Ácido	Circular	Lenticular	Ondulada	Rugosa	Pouca	Gomosa	Opaco	Amarelo	Levemente rosado
Cnpso 3588	FG1	Rápido	2	Alcalino	Circular	Lenticular	Lobada	Rugosa	Moderada	Gomosa	Opaca	Branco	Creme
Cnpso 3586	FG1	Intermediário	1	Ácido	Irregular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Pouca	Gomosa	Translúcido	Amarelo	Levemente rosado
Cnpso 3482	VV1	Rápido	2	Ácido	Circular	Lenticular	Lenticular	Rugosa	Muita	Viscosa	Opaco	Amarelo	Rosa
Cnpso 3507	VV1	Intermediário	2,5	Alcalino	Circular	Lenticular	Convexa	Rugosa	Moderada	Gomosa	Opaco	Creme	Creme

Cnpso 3513	VV1	Lento	1,6	Alcalino	Circular	Lenticular	Denteada	Lisa	Pouca	Butírica	Opaco	Creme	Levemente rosado
Cnpso 3483	VV2	Rápido	2	Ácido	Circular	Lenticular	Convexa	Rugosa	Muita	Gomosa	Opaco	Amarelo	Rosa
Cnpso 3509	VV2	Rápido	2	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Lisa	Moderada	Gomosa	Opaco	Amarelo	Rosa
Cnpso 3510	VV2	Rápido	1,8	Ácido	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Moderada	Gomosa	Opaco	Amarelo	Rosa
Cnpso 3485	VV2	Intermediária	1,5	Alcalino	Circular	Lenticular	Inteira	Rugosa	Pouca	Butírica	Opaco	Creme	Creme
Cnpso 3486	VV3	Intermediária	1	Alcalino	Puntiforme	Lenticular	Ondulada	Rugosa	Pouca	Gomosa	Opaco	Branco	Creme
Cnpso 3487	VV3	Intermediário	1	Alcalino	Puntiforme	Lenticular	Plana	Rugosa	Pouca	Viscosa	Opaco	Creme	Levemente rosado
Cnpso 3516	VV3	Intermediário	2	Alcalino	Irregular	Lenticular	Convexa	Rugosa	Pouca	Gomosa	Opaco	Creme	Rosa
Cnpso 3471	PC1	Rápido	2	Ácido	Circular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Moderada	Gomosa	Opaco	Amarelo	Creme
Cnpso 3472	PC1	Rápido	2,5	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Rugosa	Moderada	Gomosa	Translúcido	Amarelo	Levemente rosado
Cnpso 3512	PC1	Intermediário	1	Alcalino	Puntiforme	Plana	Denteada	Rugosa	Pouca	Butírica	Translúcido	-Branco	Creme
Cnpso 3504	PC1	Intermediário	1,3	Alcalino	Circular	Plana	Denteada	Lisa	Pouca	Butírica	Opaco	-Branco	Levemente rosado
Cnpso 3505	PC1	Intermediário	2	Alcalino	Circular	Plana	Denteada	Lisa	Pouca	Butírica	Opaco	-Creme	Creme
Cnpso 3474	PC2	Intermediário	1,5	Ácido	Circular	Plana	Ondulada	Rugosa	Moderada	Gomosa	Translúcido	-Amarelo	Levemente rosado
Cnpso 3475	PC2	Rápido	1	Ácido	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Moderada	Gomosa	Opaco	-Amarelo	Levemente rosado
Cnpso 3476	PC2	Rápido	2	Ácido	Circular	Plana	Ondulada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaco	-Amarelo	Levemente rosado
Cnpso 3506	PC2	Rápido	1,5	Ácido	Irregular	Lenicular	Ondulada	Rugosa	Moderada	Viscosa	Opaco	Amarelo	Creme

Material suplementar 2- Identidade nucleotídica das estirpes isoladas de *Desmodium* spp. com as espécies de referências das *CNPSo 3487*, *CNPSo 3516*, *CNPSo 3486* e *CNPSo 350*.

Espécies de Bradyrhizobium	Estirpes			
	<i>Cnpso 3507</i>	<i>Cnpso 3516</i>	<i>Cnpso 3586</i>	<i>Cnpso 3587</i>
B. americanum	0,999	0,999	0,999	0,999
B. cajani	0,993	0,994	0,994	0,993
B. cytisi	0,994	0,994	0,993	0,95
B. diazoefficiens	0,998	1,0	1,0	0,997
B. ingae	0,989	0,991	0,998	0,991
B. japonicum	0,998	0,998	0,997	0,998
B. liaoningense	1,00	0,94	0,998	0,999