

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

FABIANE PAULITSCH

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE NÓDULOS DE *Mimosa gymnas*
Barneby NATIVAS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ (BRASIL)**

PONTA GROSSA
2017

FABIANE PAULITSCH

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE NÓDULOS DE *Mimosa gymnas*
Barneby NATIVAS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ (BRASIL)**

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-orientadora: Profa. Dra. Marta Regina B. do Carmo

Ponta Grossa

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Paulitsch, Fabiane

P328 Diversidade de rizóbios isolados de
nódulos de Mimosa gymnas Barneby nativas
dos Campos Gerais do Paraná (Brasil)/
Fabiane Paulitsch. Ponta Grossa, 2017.
86f.

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

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

Coorientadora: Prof^a Dr^a Marta Regina
B. do Carmo.

1.Filogenética. 2.Betaproteobacteria.
3.Burkholderia. 4.Paraburkholderia.
5.Plantas endêmicas. I.Batista, Jesiane S.
da Silva. II. Carmo, Marta Regina B. do.
III. Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Mestrado em Ciências Biológicas.
IV. T.

CDD: 574.87

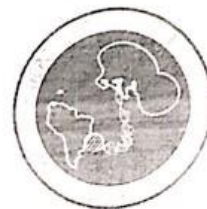


Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

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. 05/2017

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 **Fabiane Paulitsch**.

Aos vinte e dois dias do mês de fevereiro de dois mil e dezessete, no auditório do Programa, 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) **Fabiane Paulitsch**, 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^a Jakeline Renada Marçon Delamuta (UEL) e Dr. Rafael Mazer Etto (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 de rizóbios isolados de nódulos de *Mimosa gymnas Barneby* nativas do Parque Estadual do Guartelá (Tibagi), 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)

Alterações e sugestões encaminhadas pela banca.

Alteração de Título: sim ☒ não ☐

Novo título: *Diversidade de rizóbios isolados de nódulos de Mimosa gymnas Barneby nativas dos Campos Gerais do Paraná (Brasil)*

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de dois mil e dezessete.

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

Prof^a Dr^a Jakeline Renada Marçon Delamuta (UEL)

Prof. Dr. Rafael Mazer Etto (UEPG)

Agradecimentos

À Deus, por me dar forças quando pensei que já não tivesse. Sei que sem Ti nada sou, sinto seu amor e seu cuidado sobre mim todos os dias. Gratidão meu Deus, por mais essa conquista. Que este trabalho também seja para tua honra e glória!

À minha amada família, decido este mestrado. Pai, Mãe, Pedro, Flavia e Elivan, sem vocês nunca teria conseguido. Cada abraço, cada puxão de orelha, cada conversa, frase de apoio e demonstrações de carinho foram essenciais. Obrigada por me ajudarem em mais essa etapa e por me mostrarem que com amor, honestidade e fé posso ir mais longe do que imagino. Eu amo muito cada um de vocês!

À minha querida orientadora, exemplo de profissional e pessoa, “mãe” e amiga Dra. Jesiane S. S. Batista. Me faltam palavras para te agradecer por tudo aquilo que recebi de você. Obrigada por ter acreditado em mim e ter me dado condições de desenvolver um trabalho tão incrível. Se estou aqui hoje é devido aos seus ensinamentos, não apenas em relação à nossa área de estudo, mas aos valores transmitidos por você! Agradeço por ter lutado por mim, por me abrir portas, por ter me auxiliado em momentos pessoais com palavras tão sábias, por sua paciência, por criar um ambiente de trabalho tão bom e por todo seu esforço dedicado neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório e grandes amigos. Pablo, por seu companheirismo e amizade durante todos esses anos juntos. Leandro, por ser meu grande e querido amigo e me estender a mão em todos os momentos, tanto profissionais quanto pessoais. Vanessa, por nossa jornada e amizade de longa data juntas, por todas as dificuldades e conquistas que já compartilhamos. Ana Paolla, por sua amizade e ajuda. Brenda, por ser esse anjo de pessoa que entrou no meu coração e sempre me apoiar. Em especial gostaria de demonstrar minha eterna gratidão à Milena, que foi meu braço direito durante esses dois anos, em todas as áreas da minha vida. Sem sua amizade, sua determinação, sua paixão pela ciência, sua inteligência e seu grande coração esse trabalho não seria metade do que é hoje!

Aos meus colegas de mestrado por todos os momentos que passamos juntos. Especialmente à Caroline, por ser minha colega à anos e ter me ajudado muito no início dessa jornada.

As minhas amigas de longa data, Caroline, Maria Luiza e Maryanne. Obrigada pela amizade, estímulo e apoio.

As minhas colegas de profissão e amigas: Thamiris por ser uma benção em minha vida, por sua amizade e carinho. Gessica por seu companheirismo e amizade.

Agradeço ao meu querido e amado Leonardo, por ser meu porto seguro, meu melhor amigo, meu confidente e namorado mais paciente e atencioso do universo. Obrigada por todo incentivo! Sou grata também à toda Família Burgath e Vó Mira por todas as orações e amor recebido.

Às minhas queridas Bruna e Marciah Carletto, que por tantas vezes me socorreram, me abraçaram, me apoiaram, me entenderam, estiveram ao meu lado e são uma segunda família. Obrigada por tudo!

À Tielly Kirian, meu anjo da guarda que agora está junto à Deus, por tantos ensinamentos que levarei pro resto da vida no meu coração.

Ao meu querido irmão José Ricardo, por seu carinho e por sempre estar ao meu lado durante todos esses anos.

À Carolina Figueroa, por essa amizade e apoio que ultrapassa cordilheiras.

À Embrapa soja, pela estrutura concedida e a todos do laboratório de Biotecnologia de solos que me receberam de braços abertos. Especialmente agradeço à Dr^a Mariangela Hungria, Dr^a Rebeca Fuzinato Dall'Agnol e Dr^a Jakeline Delamuta por todo carinho, apoio e ajuda que me deram durante esse período.

Aos professores Dr^a Carolina Galvão e Dr. Rafael Etto, por todo auxílio, ensinamentos e carinho que tiveram comigo durante estes dois anos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vicari por suas contribuições.

Ao Prof. Dr. Mateus Henrique Santos, que me apoiou desde sempre, me ajudou inúmeras vezes e se tornou um querido colega, assim como um exemplo de profissional.

Ao Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira por todo apoio concedido.

Ao grupo da botânica, à minha coorientadora Dr^a Marta, ao Jorge, Talita, Solange, Ethieny, Lili e Drica. Em especial à minha querida Drica, a quem eu admiro e devo muito. Gratidão por tantos momentos lindos compartilhados no nosso querido Parque Estadual do Guartelá, por todas as identificações e ajuda nesse processo!

Ao PPG em Biologia Evolutiva da UEPG por essa grande oportunidade, especialmente à Dr^a Mara e Zoli, por todo apoio prestado e todo o carinho com o qual tratam os pós graduandos.

À Banca examinadora, por aceitar esse convite e por suas contribuições que irão enriquecer nosso trabalho.

À Capes, CNPq e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Levantamentos florísticos realizados nos “Campos Gerais” (Paraná, Brasil) indicam que Fabaceae é uma das famílias com maior riqueza e abundância da região. Esses estudos também apontam a elevada diversidade e endemismo de *Mimosa* spp. Nosso estudo relata a diversidade de rizóbios isolados de nódulos radiculares de plantas nativas de *Mimosa gymnas* Barneby. Vinte e nove estirpes foram obtidas de *M. gymnast* nodulíferas em três áreas do Parque Estadual do Guartelá, uma das mais importantes unidades de conservação dos Campos Gerais; os solos dessas áreas foram caracterizados como arenosos, ácidos, pobre em nutrientes e matéria orgânica e com elevados teores de alumínio. A árvore filogenética construída com sequências parciais do gene 16S rDNA agrupou as estirpes em um grande clado sendo que algumas estirpes foram mais relacionados com a espécie *Paraburkholderia nodosa* enquanto outras foram mais relacionadas com *P. bannensi*. A análise de perfil genômico baseada em BOX-PCR revelou um elevado grau de variabilidade intraespecífica entre os isolados. Resultados baseados na filogenia de sequências concatenadas dos genes *recA-gyrB* dividiram os isolados em dois grandes grupos. O clado II não agrupou nenhuma estirpe tipo e os isolados apresentaram uma identidade nucleotídica de no máximo 97% com *P. nodosa*. A filogenia do gene *nodC* agrupou todos os isolados em um grupo único com elevado suporte estatístico, não agrupando com a sequência correspondente de nenhuma estirpe tipo do gênero *Paraburkholderia*. Nossos resultados reforçam a constatação de que rizóbios do gênero *Paraburkholderia* são os preferenciais simbiotes de *Mimosa* na América do Sul e a associação de estirpes nodulíferas do gênero com condições edáficas particulares. Ainda, os resultados das análises filogenéticas sugerem que os isolados agrupados no clado II na árvore filogenética dos genes *recA-gyrB* podem representar uma nova espécie de *Paraburkholderia*, reinterando a importância de estudos de diversidade com plantas leguminosas nativas e endêmicas.

Palavras-chave: filogenética; betaproteobacteria; *Burkholderia*; *Paraburkholderia*; plantas endêmicas.

ABSTRACT

Floristic surveys performed in the “Campos Gerais” (Paraná, Brazil) indicate that Fabaceae is one of the most species-rich and abundant families. These studies also pointed out the high diversity and endemism of *Mimosa* spp.

Our study report the diversity of rhizobia isolated from root nodules of native *Mimosa gymnas* Barneby. Twenty-nine strains were obtained from nodulating *M. gymnas* in three areas of Guartelá State Park, one of the most important conservation unities of the “Campos Gerais”; soils of these areas were characterized as sandy, acid, poor in nutrients and organic matter and with high aluminum contents. The phylogenetic tree constructed with partial 16S rDNA sequences grouped the strains in a larger cluster and some strains were more related with *Paraburkholderia nodosa*, although some strains were more related to *P. bannensi*. The analysis of the genomic profile by BOX-PCR revealed a high degree of intraspecific variability among the isolates. Results based on phylogeny of concatenated genes *recA-gyrB* divided the strains in two large clusters. The cluster II didn't grouped with any type strain and the isolates showed a nucleotide identity of 16S rDNA of at most 97% with *P. nodosa*. The *nodC* phylogeny grouped all the strains into a well-supported clade, not grouping with any known strain of *Paraburkholderia* genus. Our results support that *Paraburkholderia* are the main symbionts of *Mimosa* in South America and the association of nodulating strains of this genera with particular edaphic conditions. Also, the results of the phylogenetic analysis suggest that the isolates grouped in cluster II in the *recA-gyrB* phylogenetic tree may represent a new species of *Paraburkholderia*, highlighting the importance of diversity studies with native and endemic leguminous plants.

Key words: Phylogeny; Betaproteobacteria; *Burkholderia*; *Paraburkholderia*; Endemic Plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organogênese de nódulos radiculares em plantas da família Fabaceae	12
Figura 2 - Localização da zona de amostragem no Estado do Paraná-Brasil (A), Parque Estadual do Guartelá - Tibagi (B). <i>M. gymnas</i> nativa do Parque Estadual do Guartelá (C).....	22
Figura 3 - Dendrograma baseado nos perfis de BOX-PCR de rizóbios isolados de nódulos de <i>M. gymnas</i> , utilizando o algoritmo UPGMA, coeficiente de Jaccard e 2% de tolerância, utilizando o <i>software</i> Bionumerics 7.0 (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium).....	37
Figura 4 - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S DNAr de rizóbios isolados de nódulos radiculares de <i>M. gymnas</i> (Máxima Verossemelhança, modelo <i>Tamura 3-parameter</i>) utilizando o <i>software</i> Mega 6.06. O suporte de <i>bootstrap</i> foi baseado em 1000 repetições e valores são apresentados quando superiores a 70%.....	39
Figura 5 - Árvore filogenética baseada na concatenação de sequências parciais dos genes <i>recA</i> e <i>gyrB</i> de isolados de nódulos de <i>M. gymnas</i> (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura-Nei) utilizando o <i>software</i> Mega 6.06. O suporte de <i>bootstrap</i> foi baseado em 1000 repetições e valores são apresentados quando superiores a 70%.....	41
Figura 6 - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene de nodulação <i>nodC</i> de isolados de nódulos de <i>M. gymnas</i> (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura-Nei com 1000 repetições) utilizando o <i>software</i> Mega 6.06.....	42

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2.1. Os Campos Gerais e o Parque Estadual do Guartelá.....	8
2.2. A família Fabaceae	9
2.3. Fixação biológica de nitrogênio	10
2.4. Interação simbiótica entre rizóbios e plantas da família Fabaceae	12
2.5 Taxonomia Polifásica de Rizóbios	14
2.6. Aspectos taxonômicos dos rizóbios.....	18
2.7. Justificativa.....	19
3. Objetivo.....	21
3.1. Objetivos específicos.....	21
4. . Material e métodos	22
4.1. Características do local de coleta e amostragem de <i>Mimosa gymnas</i> nodulíferas e solos	22
4.2. Isolamento de rizóbios a partir de nódulos de <i>M. gymnas</i> nativas	23
4.3. Caracterização morfológica de rizóbios em meio YMA	23
4.4. Extração do DNA total.....	23
4.5. Amplificação do DNA para a reação de BOX-PCR	24
4.6. Amplificação do gene ribossomal 16S DNAr	24
4.7. Amplificação do gene <i>nodC</i>	25
4.8. Amplificação do gene <i>recA</i>	25
4.9. Amplificação do gene <i>gyrB</i>	26
4.10. Sequenciamento parcial dos genes 16S DNAr, <i>nodC</i> , <i>gyrB</i> e <i>recA</i>	26
4.11. Análise dos dados de sequenciamento	28
5. Capítulo 1: <i>Paraburkholderia</i> sp. isoladas de <i>Mimosa gymnas</i> nativas de área de transição entre Mata Atlântica e Cerrado no Sul do Brasil.....	29
5.1 Introdução	30
5.2 Material e Métodos.....	32

5.2.1	Locais de amostragem de <i>Mimosa gymnas</i> nodulíferas e de solos	32
5.2.2	Isolamento e caracterização morfofisiológica dos isolados	33
5.2.3	BOX-PCR “DNA fingerprinting”	34
5.2.4	Sequenciamento dos genes 16S DNAr, <i>recA</i> , <i>gyrB</i> e <i>nodC</i>	34
5.2.5	Análise dos dados moleculares	35
5.3	Resultados	35
5.3.1	Características físico-químicas dos solos das áreas de amostragem de <i>M. gymnas</i> nodulíferas	35
5.3.2	Isolamento e caracterização morfofisiológica de rizóbios isolados de nódulos radiculares de <i>M. gymnas</i>	36
5.3.3	BOX-PCR fingerprinting	37
5.3.4	Análise filogenética do gene 16S DNAr	38
5.3.5	Filogenia dos genes housekeeping <i>recA</i> e <i>gyrB</i>	40
5.3.6	Análise filogenética do gene de nodulação <i>nodC</i>	41
5.4	Discussão	43
5.5	Considerações finais	48
6	Conclusão:	50
7	Referências Bibliográficas	51
8	Material suplementar	80
	Material suplementar S1 - Análises químicas e físicas dos solos das áreas de amostragem de <i>M. gymnas</i> nodulíferas. As coordenadas geográficas das áreas de coleta 1, 2 e 3 encontram-se descritas no item 5.1.	80
	Material Suplementar S2 – Características morfofisiológicas das colônias de rizóbios isolados de <i>M. gymnas</i> . As coordenadas geográficas das áreas de coleta 1, 2 e 3 encontram-se descritas no item 5.1.	81
	Material suplementar S3 –Identidade nucleotídica (em percentual) entre as sequências parciais do gene 16S DNAr de <i>P. nodosa</i> Br3437 ^T e do gene de nodulação <i>nodC</i> de <i>P. nodosa</i> Br3470* com os rizóbios isolados de nódulos radiculares de <i>M. gymnas</i> .	83
	Material suplementar S4 - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene <i>recA</i> de isolados de nódulos de <i>M. gymnas</i> (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura-Nei com 1000 repetições) utilizando o software Mega 6.06.	84

Material suplementar S5 - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene *gyrB* de isolados de nódulos de *M. gymnas* (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura-Nei com 1000 repetições) utilizando o software Mega 6.06..... 85

Material suplementar S6 - Identidade nucleotídica em percentual dos genes *recA*, *gyrB* e sequências concatenadas *recA-gyrB* entre a estirpe *P. nodosa* Br3437^T e rizóbios isolados de nódulos de *M. gymnas*. 86

1. Introdução

O desenvolvimento de espécies vegetais depende de vários fatores, tanto bióticos como abióticos. O nitrogênio (N) é o principal componente da atmosfera em sua forma molecular (N₂) e é um constituinte essencial de várias biomoléculas. Apesar de tal abundância, as plantas requerem uma fonte de N biologicamente assimilável, em geral nas formas de nitrato e amônia (TATE, 1995), que são limitadas no solo e podem restringir o crescimento vegetal (CHAPIN, 1980; ALFAIA, 2006).

Algumas espécies vegetais estabelecem uma interação com procariotos capazes de realizar a conversão enzimática do N₂ em amônia, em um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN) (DIXON & KAHN, 2004).

Esses procariotos são bactérias e arqueias coletivamente denominados diazotróficos e são os únicos organismos capazes de realizar a FBN. Dentre os diazotróficos, os rizóbios possuem a singular capacidade de estabelecer simbiose usualmente com plantas da família Fabaceae(=Leguminosae) levando à formação de estruturas radiculares denominadas nódulos, especializadas no processo de FBN (OLDROYD, 2013). Esse processo depende de uma elevada compatibilidade entre genótipos do hospedeiro e do microssimbionte (BARRET & PARKER, 2006; MASSON-BOIVIN *et al.*, 2009).

A interação rizóbio-leguminosa possui o maior potencial de incorporação de N via FBN aos ecossistemas terrestres (LINDSTRÖM *et al.*, 2010), exercendo um papel ecológico essencial na manutenção desses ambientes.

Levantamentos florísticos realizados na região dos Campos Gerais do Paraná destacam a riqueza e abundância de leguminosas nodulíferas nativas, muitas endêmicas, com ocorrência documentada especialmente em unidades de conservação da região. Paradoxalmente, a ocorrência de nodulação e diversidade de rizóbios associados a tais plantas permanece desconhecida. Esse estudo visa aprimorar o conhecimento sobre a interação rizóbio-leguminosa pela análise da diversidade de rizóbios isolados de nódulos radiculares de *Mimosa gymnas* nativas.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Os Campos Gerais e o Parque Estadual do Guartelá

Em 1948, MAACK definiu os “Campos Gerais do Paraná” como uma zona fitogeográfica natural, composta por campos limpos, matas de galeria, capões de mata com araucária e refúgios de cerrado. Situada na porção centro-leste do estado do Paraná-Brasil, na borda do Segundo Planalto, essa região fitogeográfica representa uma zona limítrofe, devido às características climáticas e topográficas, as quais determinam suas formações vegetais distintas (CARMO, 2006). Alguns dos sítios naturais são objeto de unidades de conservação já implementadas, como os Parques Estaduais de Vila Velha em Ponta Grossa e do Guartelá em Tibagi, contando também com reservas, hortos florestais e RPPNs (Reserva Particular do Patrimônio Natural). Em tais localidades, é possível encontrar remanescentes de rica flora endêmica, inclusive de plantas da família Fabaceae (UEPG, 2003; CARMO, 2006; ANDRADE *et al.*, 2009).

O Parque Estadual do Guartelá (PEG) (24°39'10"S e 50°15'25"W), localizado na Borda da Escarpa Devoniana, possui uma área de 789,97 hectares e tem como limite Norte e Leste o rio Iapó, ao Sudeste o riacho do Pedregulho e ao Noroeste, propriedades particulares (CARMO, 2006). A fisionomia dentro do Parque é representada primordialmente por formações campestres associadas a florestas (floresta ombrófila mista) e uma área restrita de cerrado (savana arborizada), sendo assim caracterizada como mosaico. As formações campestres e afloramentos rochosos são abundantes e correspondem à 60,55% da área do Parque e os relictos de cerrado correspondem apenas a 1,42% do Parque (CARMO, 2006).

Segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, a área apresenta clima do tipo Cfa (subtropical úmido quente), com influência indireta do clima Cfb (temperado sempre úmido). De acordo com o sistema brasileiro de classificação dos solos, o Parque apresenta solos poucos profundos, predominando os Cambissolos e os Litossolos (Neossolos Litólicos) (CARMO, 2006). Além disso, o Parque é uma das importantes Unidades de Conservação da região dos Campos Gerais, estando inserido na Área de Preservação Ambiental (APA) da Escarpa Devoniana.

CARMO (2006) realizou um levantamento florístico no Parque Estadual do Guartelá (PEG) descrevendo a ocorrência de 634 táxons distribuídos em 321 gêneros e 104 famílias. Desta listagem, 612 táxons são de angiospermas, duas de gimnospermas e 20 de pteridófitas. A família com maior riqueza florística foi Asteraceae (79 espécies), seguida de Myrtaceae (42) e Fabaceae (42).

2.2. A família Fabaceae

A família Fabaceae constitui uma das maiores famílias de angiospermas, depois de Orchidaceae e Asteraceae. Com 800 gêneros e cerca de 20.000 espécies, distribuem-se em três subfamílias: Faboideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae (LEWIS *et al.*, 2005). A família apresenta uma distribuição ampla ao redor do globo e está presente tanto nas florestas tropicais quanto nos desertos, nas planícies e nas regiões alpinas. Abrange uma ampla gama de formas de vida, desde ervas alpinas árticas e arbustos perenes temperados ou tropicais até xerófitas anuais e árvores gigantes equatoriais (BARROSO *et al.*, 1991; LEWIS *et al.*, 2005). Os membros da família Fabaceae são caracterizados por possuir fruto distinto, denominado legume, que dá à família seu nome original (Leguminosae) e aos seus membros o nome usual de leguminosas.

Sua presença é particularmente representativa em regiões neotropicais, sendo o Brasil considerado um dos centros de radiação da família Fabaceae, apresentando uma notável diversidade de espécies nativas de leguminosas e um elevado grau de endemismo (LEWIS *et al.*, 2005). Segundo levantamento realizado por LEWIS (2016) no “Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil” encontram-se listadas 2694 espécies distribuídas em 210 gêneros de leguminosas de importância econômica, ecológica e filogenética. Destas, 1458 espécies (54% do total) são endêmicas do Brasil.

Dentro da subfamília Mimosoideae, encontra-se o gênero *Mimosa* L. (Leguminosae: Mimosoideae) que foi estabelecido por Linneaus em 1753, contendo inicialmente 53 espécies (LINNEAUS, 1753). Após estudos taxonômicos mais abrangentes, novas informações sobre o gênero foram levadas em consideração. Barneby em 1991 realizou uma ampla revisão do gênero incluindo 479 espécies no “Novo Mundo” (BARNEBY, 1991). *Mimosa* L.

é o segundo maior gênero de Mimosoideae, possui mais de 540 espécies, distribuídas essencialmente em regiões neotropicais. Tem como principais centros de diversidade Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina e México. Em relação ao Brasil, 300 delas são nativas ou endêmicas do Brasil e um quarto estão associadas ao bioma Cerrado (SIMON *et al.*, 2011).

Uma das espécies mais representativas da região dos Campos Gerais, em especial do Parque Estadual do Guartelá, é *Mimosa gymnas* Barneby. Caracteriza-se por ser um subarbusto terrícola nativo e endêmico do Brasil, com ocorrência basicamente restrita ao Estado do Paraná, normalmente associada a afloramentos areníticos (REFLORA, 2016; TAMASHIRO & ESCOBAR, 2016). Plantas da família Fabaceae possuem um importante papel na incorporação de nitrogênio (N) nos ecossistemas por sua interação em um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN).

2.3. Fixação biológica de nitrogênio

O N é um nutriente essencial para qualquer ecossistema. Sabe-se que o N é um dos elementos mais requisitados pelas plantas, fazendo com que o desenvolvimento das mesmas seja produtivo ou limitado, de acordo com sua disponibilidade no solo (CHAPIN, 1980; ALFAIA, 2006).

Apesar de 80% da atmosfera ser composta por nitrogênio na forma molecular (N_2), este é inerte para grande parte dos organismos, devido à elevada estabilidade da tripla ligação existente entre os dois átomos de N. Para tais organismos, o N deve ser disponibilizado em formas passíveis de assimilação, como nitrato, amônia e N orgânico (TATE, 1995; CREWS, 1999).

Nos solos pouco férteis das regiões tropicais o N é o elemento que mais limita o desenvolvimento das plantas. Suas fontes constituem: (I) o solo, essencialmente na forma orgânica (98%), mas também nas formas inorgânicas amônia (NH_3 , convertida em NH_4^+), nitratos (NO_3^-) e nitritos (NO_2^-) (MORGANTE, 2003; ALFAIA, 2006), resultantes da decomposição da matéria orgânica; (II) os fertilizantes nitrogenados; (III) a fixação não-biológica, decorrente de descargas elétricas (promovem a oxidação do N_2 em NO_3), combustão e vulcanismo (liberação de NH_3) e (IV) o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) (MALAVOLTA, 2006).

A FBN constitui a principal via de incorporação do N à biosfera e, junto à fotossíntese, são considerados os mais importantes processos biológicos da biosfera. Consiste na redução enzimática do N₂ a amônia, posteriormente incorporada em compostos nitrogenados, processo realizado exclusivamente por um grupo de bactérias e arqueias denominadas diazotróficas (DIXON & KAHN, 2004).

A enzima chave para o processo de FBN chama-se nitrogenase, a qual possui subunidades proteicas capazes de transportar elétrons para que a redução do N₂ ocorra. Essas subunidades correspondem à Proteína-ferro (Proteína-Fe) e à Proteína-Molibdênio-ferro (Proteína-MoFe). Esse é o subtipo mais estudado, também denominado nitrogenase molibdênio-dependente (Mo-dependente) ou Nif e tem seus componentes estruturais codificados pelos genes *nifH*, *nifD* e *nifK*. Alguns organismos possuem nitrogenases alternativas, onde o molibdênio é substituído pelo Ferro (nitrogenase Anf) ou pelo Vanádio (nitrogenase Vnf) (KENNEDY & DEAN, 1992; ZEHR, *et al.*, 2003; RAYMOND *et al.*, 2004; SEEFELDT, *et al.*, 2009; DOS SANTOS, *et al.*, 2012).

Independente do subtipo de nitrogenase, a redução do N₂ ocorre mediante várias transferências de elétrons e requer o consumo de uma elevada quantidade de ATP. No caso da nitrogenase Nif, a subunidade proteína-Fe recebe elétrons de uma terceira molécula, a ferredoxina. Após recebê-lo, a proteína-Fe doa elétrons para a proteína-MoFe, que os acumula até concentrar oito elétrons. Somente com os oito elétrons é que a redução completa do N₂ a NH₃ ocorre, resultando na reação: $N_2 + 16 ATP + 8e^- + 8H^+ \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$ (RAYMOND *et al.*, 2004; MALAVOLTA, 2006).

A enzima nitrogenase possui uma alta sensibilidade ao oxigênio e pode ser irreversivelmente inativada pelo mesmo (EADY, 1980). Portanto, para que a FBN ocorra, devem existir mecanismos eficientes para manter a tensão de oxigênio a um baixo nível. Um dos mais eficientes mecanismos de manutenção de condições de microaerofilia consiste na interação com hospedeiros vegetais.

Os diazotróficos estabelecem associações com espécies vegetais com diferentes graus de intimidade e interdependência e são, portanto, classificados em diazotróficos de vida livre; associativos ou endofíticos intercelulares; e os simbioses/endossimbiontes (MUS *et al.*, 2016). Os diazotróficos simbióticos

são coletivamente denominados rizóbios em referência ao primeiro gênero descrito, *Rhizobium*. (WILLEMS, 2006).

2.4. Interação simbiótica entre rizóbios e plantas da família Fabaceae

Dentre as formas de associação planta-diazotróficos, a associação simbiótica entre rizóbios e determinadas espécies da família Fabaceae (=Leguminosae) é a que fornece o maior aporte de N para a planta hospedeira, contribuindo de forma significativa para a incorporação de N em diferentes ecossistemas terrestres (LINDSTRÖM *et al.*, 2010). O sucesso de tal associação deve-se à formação de estruturas radiculares especializadas, denominadas nódulos, no interior dos quais é mantido um constante suprimento de carbono e regulação da baixa pressão de oxigênio, permitindo que os rizóbios realizem a FBN e disponibilizem a amônia produzida diretamente aos tecidos vegetais (SCHULTZE & KONDOROSI, 1998; OLDROYD & DOWNIE, 2004). (Figura 1).

A interação inicia-se com a liberação de exsudatos radiculares pela planta hospedeira, contendo uma específica variedade de moléculas, dentre as quais os compostos flavonoides. Os flavonoides são metabólitos secundários que atuam como sinais moleculares, e são detectados por determinados rizóbios presentes no solo; dentre suas atividades estão: a atuação como substâncias quimiotáticas, estimulação da multiplicação dos rizóbios e indução dos genes bacterianos (genes *nod*) responsáveis pela síntese dos fatores de nodulação (fatores Nod), oligossacarídeos lipoquitínicos secretados pelos rizóbios (OLDROYD *et al.*, 2011) (Figura 1).

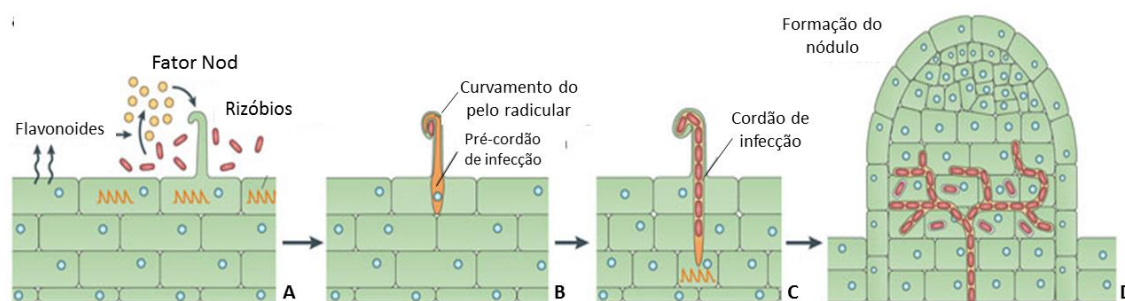


Figura 1: Formação de nódulos radiculares em plantas da família Fabaceae.

Modificado de OLDROYD, 2013

Os fatores Nod, mediante reconhecimento pela planta, induzem a modificações significativas nas células vegetais, como o curvamento dos pelos

radiculares, invaginação da parede celular e formação de um cordão de infecção no interior do pelo radicular. O cordão de infecção prolonga-se até atingir o primórdio do nódulo, que é desenvolvido devido à reativação da divisão de células diferenciadas do córtex da raiz (OLDROYD *et al.*, 2011). Os rizóbios são liberados na extremidade interna do cordão de infecção por endocitose em uma célula cortical, circundados por uma membrana, no interior da qual serão diferenciados em bacteroides, formas capazes de fixar N₂ (SCHULTZE & KONDOROSI, 1998; JONES *et al.*, 2007; MASSON-BOIVIN *et al.*, 2009).

A manutenção da microaerofilia nos nódulos deve-se à síntese pelas células corticais de leghemoglobina, uma proteína que possui alta afinidade com o oxigênio cuja síntese é também regulada pelos Fatores Nod (OTT *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2005; DOWNIE, 2005).

Três genes são os principais responsáveis por codificar o fator Nod. Os genes *nodABC* são chamados de genes *nod* comuns por estarem presentes na grande maioria dos rizóbios (ZHANG, 2000; GIRAUD *et al.*, 2007). Esses genes são necessários para a formação do nódulo, sendo que a mutação em algum deles inibe a capacidade de produção de fatores Nod e, portanto, a nodulação (ZHANG, 2000). Por um grande período de tempo, acreditou-se que tal sinalização molecular era um paradigma universal em todas as interações planta-rizóbio, porém sabe-se que existem exceções. Em 2007 foi demonstrado que algumas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. fotossintéticas (BTai1 e ORS278) não possuem o gene *nodA* e *nodB*, porém são capazes de nodular por um mecanismo diferenciado (GIRAUD *et al.*, 2007).

O centro (do inglês *backbone*) do fator Nod é sintetizado por uma N-acetilglucosaminiltransferase, produto do gene *nodC* (VAN RHIJN & VANDERLEYDEN, 1995). Dessa forma, o gene *nodC* é crucial na determinação do tamanho da cadeia oligossacarídica do Fator Nod e, conseqüentemente, possui grande influência na especificidade hospedeira (KAMST *et al.*, 1997). Inclusive, a filogenia do gene *nodC* é usualmente adotada na determinação de simbiovares (ROGEL *et al.*, 2011; PEIX *et al.*, 2015; GNAT *et al.*, 2015), pois o gene *nodC* é geralmente conservado entre estirpes que nodulam a mesma planta, o que demonstra uma seleção em

relação à planta hospedeira (LAGUERRE *et al.*, 2001, PEIX *et al.*, 2015, GNAT *et al.*, 2015).

O fator Nod é também sintetizado por uma deacetilase (que remove o grupo N-acetil em uma terminação não redutora), produto do gene *nodB*, e uma aciltransferase (que liga a cadeia acil no oligossacarídeo deacetilado), codificada pelo gene *nodA* (BROUGHTON *et al.*, 2003). A ocorrência e diversidade dos demais genes de nodulação (genes *nod*, *nol* e *noe*) é altamente variável entre espécies de rizóbios e determinam alterações químicas específicas na estrutura molecular central do Fator Nod (PERRET *et al.*, 2000).

Portanto, a interação simbiótica requer um alto grau de compatibilidade entre rizóbio e planta hospedeira, pois a sinalização molecular entre os simbiontes é altamente específica e coordenada (MASSON-BOIVIN *et al.*, 2009; BARRET & PARKER, 2006).

2.5 Taxonomia Polifásica de Rizóbios

A taxonomia bacteriana tem como função classificar, identificar e nomear os microrganismos de acordo com as regras internacionais estabelecidas pelo “*International Code of Nomenclature of Bacteria*” (SNEATH, 1992; VANDAMME *et al.*, 1996). Essas regras já sofreram muitas modificações desde que foram implementadas e são continuamente revistas. Na primeira metade do século passado a taxonomia bacteriana baseava-se em características fenotípicas, como morfologia da colônia e aspectos fisiológicos, o que muitas vezes acarretou em uma definição errônea de novas espécies (THOMPSON *et al.*, 2013).

Atualmente, a taxonomia polifásica é a mais aceita. Nessa abordagem são empregados dados de relações evolutivas através da utilização de sequências genéticas para a determinação da posição filogenética do isolado, juntamente com a análise das propriedades fenotípicas e genotípicas (KONSTANTINIDIS, 2013; THOMPSON *et al.*, 2013), tem como objetivo levar a taxonomia bacteriana a um consenso (VANDAMME *et al.*, 1996). Ou seja, torna-se necessária a integração de dados de diversas técnicas para que se possa chegar a uma conclusão mais precisa em relação à verdadeira posição taxonômica do microrganismo estudado. Duas técnicas são consideradas

padrão em bacteriologia: a hibridação DNA-DNA (HDD) e sequenciamento do gene 16S DNAr (STACKEBRANDT & EBERS, 2006).

Para determinar um espécie bacteriana (unidade básica da taxonomia) é determinado que a estirpe em análise apresente 70% ou mais de homologia com a estirpe-tipo na HDD e 5°C ou menos na ΔT_m (diferença na temperatura de *melting* = temperatura de desnaturação da dupla fita entre os híbridos e os homólogos, em condições padronizadas) (WAYNE *et al.*, 1987), além de 97% de similaridade nucleotídica no gene 16S DNAr (VANDAMME *et al.*, 1996). A técnica de HDD, apesar de bastante realizada para a descrição de novas espécies, é bastante laboriosa, cara e pouco acessível e vem sendo substituída pelo sequenciamento do genoma completo (com baixa ou média cobertura) e comparação da identidade média dos nucleotídeos (*average nucleotide identity*- ANI) com estirpes-tipo (DELAMUTA *et al.*, 2013).

Por outro lado, pesquisas filogenéticas e taxonômicas de procariotos normalmente iniciam-se com a obtenção das sequências nucleotídicas do gene 16S DNAr, que codifica um RNA ribossomal componente da subunidade menor (WOESE & FOX, 1977). O gene 16S DNAr é considerado um excelente marcador filogenético pois é onipresente em procariotos, geralmente em cópia única por genoma; apresentam um papel metabólico-chave; seu tamanho (1500 pares de bases) é ideal para aplicação em diversas técnicas moleculares; e sua sequência é considerada conservada, permitindo a utilização de iniciadores universais, porém com sítios variáveis o suficiente para revelar relações filogenéticas. (WEISBURG *et al.*, 1991; OLSEN & WOESE, 1993; MOREIRA, 2010).

2.5.1. Filogenia do gene 16S DNAr

As análises filogenéticas baseadas em genes ribossomais foram inicialmente propostas por Carl Woese e impactaram os estudos de Filogenia e Evolução pela proposta de classificação dos seres vivos em três domínios (Archaea, Bacteria e Eukarya); esse sistema foi aceito pela comunidade científica internacional e é atualmente vigente (WOESE *et al.*, 1990). Mais recentemente, uma nova proposta de classificação foi feita por HUG *et al.* (2016), baseada em 16 sequências alinhadas e concatenadas de genes ribossomais de vários organismos, propondo a existência de novos domínios e

demonstrando a importância da utilização de tais sequências para fins taxonômicos.

No entanto, análises comparativas vêm demonstrando o restrito poder de resolução do 16S DNAr acima do nível de espécie e sua limitação em análises filogenéticas de organismos relacionados; a conservação do 16S DNAr pode inclusive resultar em elevadas porcentagens de identidade nucleotídica entre espécies diferentes que sejam evolutivamente relacionadas (RIBEIRO *et al.*, 2009). Por esses motivos, STACKEBRANDT & EBERS (2006) sugerem que o valor de similaridade para a determinação de espécie não seja de apenas 97% como proposto por VANDAMME *et al.* (1996) e sim de 98,7% a 99% de similaridade para o gene em questão. Devido às discordâncias apresentadas acima, a inferência de uma espécie bacteriana exige a adoção de metodologias adicionais (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001; LANGILLE *et al.*, 2013;).

2.5.2. Análise por Sequências Multilocus (MLSA)

Dentro da abordagem polifásica, passou a ser utilizada outra metodologia baseada na análise de múltiplos genes para chegar a níveis mais específicos de informação taxonômica, possibilitando diferenciar gêneros, espécies e até mesmo linhagens dentro de uma mesma espécie (THOMPSON *et al.* 2005; HANAGE *et al.*, 2006). A *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) ou Análise por Sequência Multilocus propõe uma análise conjunta de múltiplos genes *housekeeping* que possuem uma taxa de evolução maior do que o gene 16S DNAr e as variações que se acumulam nesses genes são consideradas seletivamente neutras (HANAGE *et al.*, 2006).

A referida técnica baseia-se na concatenação das sequências de genes *housekeeping* escolhidos para um conjunto de estirpes e o alinhamento e construção de uma árvore filogenética (GEVERS *et al.*, 2005; STACKEBRANDT *et al.*, 2002; HANAGE *et al.*, 2006). A utilização de múltiplas sequências confere um efeito tampão contra distorções que seriam ocasionadas por recombinação envolvendo um único *locus*, como em casos de transferência lateral de genes (GEVERS *et al.*, 2005). Usualmente, a técnica envolve a concatenação de cinco a sete genes; no entanto, variações da técnica com a utilização de menos sequências e a concatenação de genes *housekeeping* específicos de MLSA com sequências de 16S DNAr são

atualmente utilizadas e apresentam poder de resolução equivalente (DALL'AGNOL *et al.*, 2016; ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2013; LV *et al.*, 2016).

DELAMUTA *et al.* (2012) utilizaram a metodologia de MLSA para diferenciar estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de 2 subfamílias de leguminosas provenientes de localidades diferentes (Brasil, Austrália, Zimbábue e Malásia). Baseando-se no gene ribossomal 16S DNAr e nos genes *housekeeping recA*, *atpD*, *glnII*, *gyrB* e *rpoB*, encontrou-se uma elevada diversidade genética entre as estirpes do estudo. Além disso, a utilização da técnica de MLSA foi crucial na indicação de novas espécies.

As análises baseadas em sequenciamento de determinados *loci* não conferem informações quanto às relações genômicas entre os indivíduos. Dentro de uma mesma espécie bacteriana podem ser encontrados diferentes padrões de organização genômica e tal variabilidade intraespecífica pode não ser detectada por análises dos genes 16S DNAr ou MLSA, que são baseadas em sequenciamento.

2.5.3. BOX-PCR *Fingerprinting*

Algumas ferramentas taxonômicas baseiam-se em técnicas que permitem a caracterização do perfil genômico através da amplificação de sequências repetitivas (*rep-elements*) do genoma, onde o produto de PCR origina uma “impressão digital” do genoma bacteriano e por isso são chamadas de *DNA fingerprinting*. Para tanto, uma das técnicas mais utilizadas em Microbiologia denomina-se BOX-PCR que visa a obtenção de *amplicons* representativos de regiões que intercalam pequenos elementos repetitivos palindrômicos conservados e dispersos pelos genomas de procariotos e eucariotos (TACÃO *et al.*, 2005).

Os elementos repetitivos BOX são os mais utilizados para obtenção de *DNA fingerprintings* de microrganismos ambientais (DALL'AGNOL *et al.*, 2016; BATISTA *et al.*, 2007; ABDOLLAHZADEH & ZOLFAGHARI, 2014) e são compostos por várias combinações de 3 subunidades, *boxA*, *boxB* e *boxC* (KOEUTH *et al.*, 1995). Utiliza-se a subunidade *boxA* por ser a mais conservada, além do seu tamanho (57 pb) e frequência por genoma (aproximadamente 25 cópias no genoma) serem ideais para uma análise

representativa (VERSALOVIC *et al.*, 1994). Diferente da PCR tradicional, a técnica é realizada com a utilização de apenas um iniciador, pois as sequências desse elemento encontram-se com orientação invertida no genoma (LUPSKI & WEINSTOCK, 1992; VERSALOVIC *et al.*, 1994). Para a constatação dos resultados, os fragmentos resultantes do BOX-PCR são submetidos à eletroforese no qual cada indivíduo gera um padrão específico de *amplicons*.

2.6. Aspectos taxonômicos dos rizóbios

Os rizóbios foram classificados em um único gênero (*Rhizobium*), até 1984 quando foi proposta a reclassificação das espécies do gênero em *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Phyllobacterium* e *Agrobacterium* (JORDAN, 1984). A partir de então, com o desenvolvimento e refinamento de técnicas de taxonomia molecular, em especial o sequenciamento do 16S DNAr e hibridização DNA-DNA (HDD), a introdução da taxonomia polifásica e o estudo de várias espécies diferenciadas de plantas leguminosas, houve um aumento significativo no número de novos gêneros e espécies descritos de rizóbios (WILLEMS, 2006).

Atualmente, os rizóbios, encontram-se classificados taxonomicamente como pertencentes a: Domínio: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Classe: Alphaproteobacteria; Ordem: Rhizobiales; distribuídos nas Famílias Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Methylobacteriaceae e Hiphomicrobiaceae; e compreendendo onze gêneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Microvirga*, *Blastobacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (MOULIN, *et al.*, 2001; NCBI, 2015;). 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). Os beta-rizóbios foram inicialmente classificados como pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia* (MOULIN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2001) e possuem uma grande afinidade 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).

O gênero *Burkholderia* é bastante cosmopolita, as espécies podem ser encontradas em ambientes bastante diversos como a água, o solo, plantas, fungos, animais e inclusive em humanos (COENYE, et al.2003). O gênero conta com cerca de 90 espécies (LPSN, 2017) dentre elas patógenos e espécies ambientais.

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 ambientais (inclusive os beta-rizóbios) para os novos gêneros *Paraburkholderia* e *Caballeronia*, enquanto as espécies reconhecidas como patógenos de plantas e animais permaneceriam como pertencentes ao gênero *Burkholderia*. A taxonomia polifásica foi a base para tal reclassificação.

Espécies do gênero *Paraburkholderia* podem realizar simbiose com leguminosas e promover a formação de nódulos radiculares. Algumas das espécies conhecidas até o momento são: *P. tuberum*, *P. phymatum* (VANDAMME *et al.*, 2002), *P. phenoliruptrix* (COENYE *et al.*, 2004), *P. mimosarum* (CHEN *et al.*, 2006), *P. nodosa* (CHEN *et al.*, 2007), *P. sabiae* (CHEN *et al.*, 2008) e *P. dilworthii* (de MEYER *et al.*, 2014)

2.7. Justificativa

Apesar da Família Fabaceae possuir mais de 700 gêneros e aproximadamente 20.000 espécies, apenas uma pequena fração da associação entre rizóbios e essas leguminosas tem sido caracterizada e estudada e usualmente são adotadas leguminosas de importância agrônômica em tais estudos (DOYLE, 2011; ZIEGLER, 2015). Nos Campos Gerais, encontram-se diversos representantes dessas leguminosas, em especial da subfamília Mimosoidae (CARMO, 2006; KLEPA *et al.*, 2016) e o primeiro

levantamento sobre ocorrência de espécimes nodulíferas nativas na região foi realizado apenas recentemente (KLEPA *et al.*, 2016).

O conhecimento da diversidade genética de rizóbios associados a espécies de plantas leguminosas nativas pode contribuir para a recuperação da flora nativa em ambientes onde o solo não se encontra em condições favoráveis e, portanto, auxiliar na manutenção biológica destas regiões. A simbiose com rizóbios permitiu às plantas leguminosas a colonização de solos nutricionalmente pobres e muitas são inclusive espécies pioneiras, essenciais na manutenção de ecossistemas terrestres (SPRENT, 2009; SMÝKAL, 2015). REIS JR *et al.* (2010) realizaram uma extensa análise de diversidade de rizóbios simbiotes de plantas do gênero *Mimosa* provenientes de campos ruprestes de dois importantes biomas nacionais: a Caatinga e o Cerrado sulmatogrossense. Contando com muitas espécies endêmicas, os autores demonstraram a importância da FBN na incorporação de N em áreas consideradas frágeis.

Além disso, esses estudos são essenciais na caracterização das complexas interações ecológicas e evolutivas envolvendo macro e microsimbiotes, bem como de padrões biogeográficos de composição de populações simbióticas. Considerando o elevado grau de endemismo de leguminosas no Brasil, em especial do gênero *Mimosa*, pode-se sugerir que o país também representa um dos principais centros de diversidade de beta-rizóbios, que são seus preferenciais simbiotes (MOULIN *et al.*, 2015).

Ainda, a maioria dos estudos que se referem a beta-rizóbios adotaram a metodologia de isolamento de bactérias do solo em condições controladas (casa de vegetação) e utilizando leguminosas conhecidas e muitas vezes de importância agrônômica como “isca”. Como já relatado por MOULIN *et al.* (2015), existem várias evidências e teorias quanto à evolução da nodulação; porém, segundo o autor, estudos de diversidade de rizóbios isolados de nódulos de leguminosas endêmicas e nativas são escassos e cruciais na investigação e resolução das relações evolutivas entre os simbiotes.

3. Objetivo

Caracterizar a diversidade de rizóbios isolados de nódulos radiculares de plantas da espécie *Mimosa gymnas* Barneby, nativas do Parque Estadual do Guartelá (Tibagi – PR).

3.1. Objetivos específicos

- Coletar e caracterizar exemplares nodulíferos de *Mimosa gymnas* Barneby do Parque Estadual do Guartelá (Tibagi – PR);
- Avaliar os parâmetros físico-químicos dos solos das áreas de amostragem das plantas nodulíferas;
- Isolar rizóbios a partir de nódulos das leguminosas nativas coletadas;
- Realizar a caracterização fisiológica e fenotípicas dos isolados;
- Avaliar a diversidade e filogenia dos rizóbios isolados.

4. . Material e métodos

4.1. Características do local de coleta e amostragem de *Mimosa gymnas* nodulíferas e solos

Os espécimes de *M. gymnas* nodulíferas (Figura 2C) foram coletados no Parque Estadual do Guartelá (PEG), uma importante unidade de conservação da região, localizada no município de Tibagi (Paraná), no Segundo Planalto do Estado do Paraná, coordenadas 24°39'10"S e 50°15'25"W (Figura 2A). Limita-se a leste pela Escapa Devoniana, em altitudes de 800 a 1200m acima do nível do mar, e a oeste com o Terceiro Planalto do Estado do Paraná, através da Serra da Esperança ou Serra Geral.

As coletas foram realizadas nos meses de julho de 2015 a maio de 2016, mediante registro e autorização via Sistema de Autorização e Informação de Biodiversidade – SISBIO (ICMBio/MMA) (no. 49603). O material botânico foi removido manualmente ou com auxílio de pás para jardinagem e acondicionado em sacos plásticos. Os espécimes encontram-se tombados (nº de tombo 21700 – 21715) no acervo do Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Todo o material botânico foi identificado por comparação com exsicatas de herbários e por consulta à bibliografia especializada.

Dos locais de ocorrência de *M. gymnas* nodulíferas (Figura 2B) foram coletadas amostras de solo para análises físicos-químicas. A amostra de cada área (1,2 e 3) foi composta de 10 subamostras, coletadas em ziguezague com trado a uma profundidade de 0-10 cm.

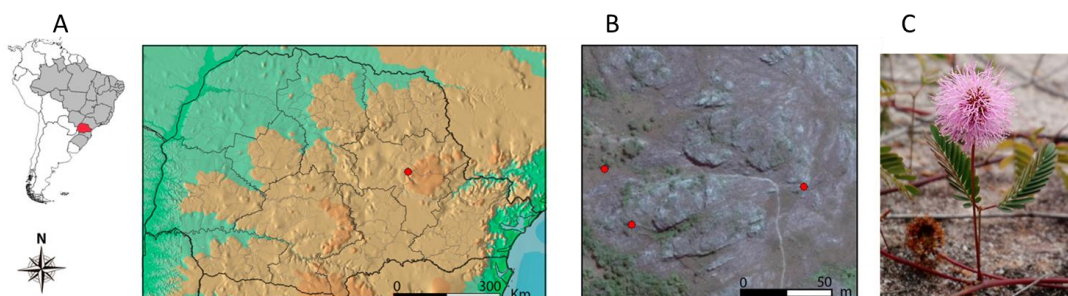


Figura 2. Localização da zona de amostragem no Estado do Paraná-Brasil (A), Locais de amostragem no Parque Estadual do Guartelá - Tibagi (B). *M. gymnas* nativa do Parque Estadual do Guartelá (C). Fonte: o autor

4.2. Isolamento de rizóbios a partir de nódulos de *M. gymnas* nativas

As raízes das plantas coletadas foram lavadas e os nódulos foram desinfestados, para a eliminação de microrganismos da superfície. Para tanto, cada nódulo permaneceu 30 segundos em uma solução de álcool 70%, 3 minutos em solução de hipoclorito de sódio 3% seguido de 10 lavagens consecutivas em água destilada estéril. Os nódulos desinfestados foram macerados com bastão de vidro estéril em 10µl de água destilada estéril.

Inoculou-se a solução gerada em placas de Petri contendo meio sólido seletivo *Yeast Mannitol Agar* (YMA) acrescido de vermelho congo (0,25%). (VINCENT, 1970). Os cultivos foram incubados a 28 °C, por 2 a 7 dias, seguindo o “Manual de Curadores de Germoplasma da Embrapa Soja” (HUNGRIA & SILVA, 2011).

Os isolados foram armazenados em meio ágar inclinado e criopreservados em glicerol 50% a -4°C. Além disso, os mesmos foram depositados na “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” (<http://www.bmrc.Incc.br/>).

4.3. Caracterização morfológica de rizóbios em meio YMA

Os isolados bacterianos obtidos foram selecionados e descritos de acordo com aspectos morfofisiológicos das colônias em meio YMA com vermelho congo, foram analisados: o tempo de crescimento, diâmetro da colônia, forma, elevação, borda, superfície e produção de muco. As bactérias foram ainda cultivadas em meio YMA acrescido com o indicador de pH Azul de Bromotimol, visando verificar a cromogênese da colônia em meio YM e reação ácida/alcalina no meio. Todas as avaliações seguiram o “Manual de Curadores de Germoplasma da Embrapa Soja” (HUNGRIA & SILVA, 2011).

4.4. Extração do DNA total

Células crescidas em meio de cultivo líquido YM até a fase exponencial foram utilizadas para extração do DNA total, utilizando o kit

AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep (Axygen Biosciences), conforme instruções do fabricante. A integridade e concentração do DNA total foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 1%.

4.5. Amplificação do DNA para a reação de BOX-PCR

Para análise da variabilidade genotípica dos isolados, foi utilizado o iniciador BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC *et al.*, 1994; KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995), seguindo as modificações propostas por 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, (1,5 mmol/L de cada nucleotídeo); 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 iniciador (50 pmol/µL); 1,0 µL de DNA (50 ng/µL) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (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.

Os *amplicons* foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se o *1kb Plus Ladder* (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

Os géis foram digitalizados e os perfis obtidos foram analisados para construção de um dendrograma, utilizando o programa Bionumerics (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Bélgica, v.7.6), utilizando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) (SNEATH & SOKAL; 1973) para a análise do agrupamento e o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912), com 2% de tolerância.

4.6. 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 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG *et al.*, 1991). A reação 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), 2,0 µL de DNA (50 ng/µL) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL).

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

4.7. Amplificação do gene *nodC*

O gene *nodC* das estirpes foi amplificado utilizando-se os iniciadores *nodCBurkF* (5'-TRATYGAYATGGAATACTGGC-3') e *nodCBurkR* (5'-CAGCGGAYATMGTCATTGA-3') (BOURNAUD *et al.*, 2013). A reação foi conduzida em um volume final de 50 µL, contendo 34,3 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); 2,0 µL de cada iniciador (10pmol µL); 2,0 µL de DNA (50 ng/µL) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL).

A amplificação das sequências consistiu em 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min; 35 ciclos de desnaturação (30 seg a 95°C), anelamento (30 seg a 55°C) e extensão (45 seg a 72°C); 1 ciclo de extensão final a 72°C por 7 min (BOURNAUD *et al.*, 2013).

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

4.8. Amplificação do gene *recA*

O gene *recA*, que codifica a proteína de recombinação *RecA*, foi amplificado utilizando-se os iniciadores *recA-BurkF* (5'-AGGACGATTCATGGAAGAWAGC-3') e *recA-BurkR* (5'-GACGCACYGAYGMRTAGAACTT-3') (SPILKER *et al.*, 2009).

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); 2,0 μL de DNA (50 ng/ μL) e 0,2 μL de Taq DNA polimerase (5 U/ μL).

A amplificação das sequências consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação (30 seg a 94°C), anelamento (30 seg a 58°C) e extensão (45 seg a 72°C); um ciclo de extensão final a 72°C por 5 min (SPILKER *et al.*, 2009).

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

4.9. Amplificação do gene *gyrB*

O gene *gyrB*, que codifica a subunidade beta da DNA girase, foi amplificado utilizando-se os iniciadores *gyrB-BurkF* (5'-ACCGGTCTGCAYCACCTCGT-3') e *gyrB-BurkR* (5'-YTCGTTGWARCTGTCGTTCCACTGC-3') (SPILKER *et al.*, 2009).

A reação 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); 2,0 μL de DNA (50 ng/ μL) e 0,2 μL de Taq DNA polimerase (5 U/ μL).

A amplificação das sequências consistiu em 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação (30 seg a 94°C), anelamento (30 seg a 58°C) e extensão (45 seg a 72°C); 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 min (SPILKER *et al.*, 2009).

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

4.10. Sequenciamento parcial dos genes 16S DNAr, *nodC*, *gyrB* e *recA*

Para o sequenciamento, os produtos de PCR dos genes 16S DNAr, *nodC*, *gyrB* e *recA* obtidos após purificação foram submetidos a uma nova amplificação, a qual consistiu na adição de 3 µL de DNA (15µg/mL-1), 1,3 µL de BigDye (compatível com o sequenciador ABI3500XL, Applied Biosystems), 1 µL de iniciador (3,2 pmol), 2,5 µL de tampão 10x (500 mM KCl; 200mM Tris-HCl, pH 8,4) e 12,2 µL de H₂O ultrapura estéril, totalizando um volume de 20µL por reação.

Os iniciadores utilizados para sequenciamento dos genes *nodC*, *gyrB* e *recA* foram os mesmos utilizados para amplificação e apresentados anteriormente nos itens 4.7, 4.8 e 4.9, respectivamente. Para sequenciamento do gene 16S DNAr, foram utilizados os iniciadores 362f e 786f (MENNA *et al.*, 2006).

As mesmas condições de PCR foram utilizadas para todos os genes: As amostras foram submetidas a um ciclo inicial de 96° C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 96° C por 15 s, 50° C por 15 s e 60° C por 4 min em termociclador (MJ Research Inc. PTC200). Depois de amplificadas, as amostras foram precipitadas de acordo com o método descrito por MENNA *et al.*(2006), modificando-se o tempo de centrifugação para 20 minutos. Em todos os poços da placa foram adicionados 2 µL de acetato de amônio estéril 7,5 M e 65 µL de etanol absoluto (temperatura ambiente) Após a adição dos reagentes, a placa foi selada, homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 45 min.

Descartou-se o sobrenadante e a placa foi invertida e colocada em papel absorvente. Posteriormente, preparou-se etanol 70% e 150 µL foi adicionado em a cada poço da placa e a mesma foi novamente selada, homogeneizada e centrifugada a 4000 rpm por 20 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a placa foi invertida e colocada em papel absorvente. Uma nova centrifugação foi realizada a um rotação mais baixa (300 rpm) por cerca de 25 s, para remoção de resíduos do sobrenadante. Colocou-se a placa em estufa a 37° C por cerca de 30 min para secagem. Após a secagem total, ressuspendeu-se os precipitados em 10 µL de formamida, aquecidos em termociclador à 95° C durante 5 min e resfriados por mais 2 min em gelo e por fim submetidos ao sequenciamento em ABI 3500XL (Applied Biosystems).

4.11. Análise dos dados de sequenciamento

As sequências de bases nitrogenadas obtidas no sequenciamento foram inicialmente analisadas com o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.7.0).

O programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, v. 6.1) foi utilizado para alinhamento e construção de árvores filogenéticas.

Para o gene 16S DNAr utilizou-se o algoritmo de Máxima Verossimilhança e modelo Tamura 3-parametros (TAMURA, 1992) com distribuição G+I (TAMURA et al., 2013).

Para os genes *nodC*, *recA* e *gyrB* utilizou-se modelo de distância Tamura Nei (TAMURA; NEI, 1993). Foram analisadas as sequências individuais e concatenadas dos genes *recA* e *gyrB*.

O suporte estatístico para as árvores foi avaliado por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições (HEDGES, 1992).

Os dados de identidade nucleotídica foram gerados mediante alinhamento no programa Bioedit (v.7.2.5).

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

5. Capítulo 1: *Paraburkholderia* sp. isoladas de *Mimosa gymnas* nativas de área de transição entre Mata Atlântica e Cerrado no Sul do Brasil.

RESUMO

Levantamentos florísticos realizados na região dos Campos Gerais do Paraná (Sul do Brasil) apontam que Fabaceae está entre as famílias de maior diversidade florística, evidenciando a sua grande expressividade na flora regional. O gênero *Mimosa* possui mais de 500 espécies e é o segundo maior gênero da subfamília Mimosoideae. Neste sentido, foi realizado um estudo com a espécie *Mimosa gymnas*, um subarbusto endêmico do Brasil abundante na região dos Campos Gerais do Paraná, apresentando a primeira descrição de ocorrência de nódulos radiculares na espécie, bem como o isolamento e análise da diversidade de seus microssimbiontes pela filogenia dos genes 16S DNAr, genes *housekeeping recA* e *gyrB*, gene de nodulação *nodC* e por rep-PCR. Vinte e nove isolados foram obtidos de plantas nativas nodulíferas em três áreas do Parque Estadual do Guartelá (Tibagi, PR), cujos solos foram caracterizados como ácidos, pobres em elementos nutritivos e matéria orgânica, arenosos e com elevados índices de alumínio. A árvore filogenética construída com o gene 16S DNAr agrupou as estirpes em um grande clado, com alguns isolados mais relacionados a espécie *Paraburkholderia nodosa* enquanto outros apresentaram maior congruência com *P. bannensis*. A análise do perfil de BOX-PCR mostrou elevada diversidade intraespecífica, não congruente com o 16S DNAr. A concatenação e filogenia dos genes *recA* e *gyrB* resultou na formação de dois grandes grupos. Os isolados do segundo grupo além de não agruparem com nenhuma estirpe tipo, apresentam identidade nucleotídica do gene 16S DNAr de no máximo 97%, com *P. nodosa*^T, o que pode indicar uma possível nova espécie. A filogenia do gene *nodC* agrupou todos os isolados em um clado bem suportado e distinto das demais espécies do gênero. Este estudo corrobora com a constatação de que estirpes de *Paraburkholderia* são os principais simbiontes de *Mimosa* na América do Sul e revela que a diversidade desse gênero é pouco conhecida. Considerando os resultados do presente estudo e comparações com resultados de outros autores, podemos concluir que a especificidade entre *Mimosa* e beta-rizóbios do gênero *Paraburkholderia* é resultante do caráter monofilético do gene de nodulação *nodC*, diferente do que ocorre em alfa-rizóbios onde as espécies apresentam caráter polifilético.

Palavras-chave: filogenética; betaproteobacteria; *Burkholderia*; *Paraburkholderia*; bactérias simbióticas; leguminosas endêmicas.

5.1 Introdução

Os Campos Gerais do Paraná, região fitogeográfica localizada na região Sul do Brasil, compreende uma área de aproximadamente 11.761,41 Km² de extensão (UEPG, 2003; CARMO, 2006). Apesar de ser considerada uma área pertencente ao Bioma Mata Atlântica, apresenta zonas de transição com o Bioma Cerrado e ambos são considerados *hotspots* da biodiversidade mundial (MYERS, 2000; RITTER *et al.*, 2010). O Cerrado (“savana brasileira”) compreende cerca de 20% do território nacional, caracteriza-se pela presença de solos ácidos, com baixa fertilidade e elevados índices de alumínio, e vegetação diversificada em fitofisionomias, desde espécies arbustivas e arbóreas de pequeno porte, com galhos retorcidos, cascas espessas e raízes profundas (VARGAS; HUNGRIA, 1997; GALLI-TERASAWA *et al.*, 2003; BATISTA *et al.*, 2007; KASCHUK *et al.*, 2011; MIATTO *et al.*, 2016). A Mata Atlântica é o bioma mais antropizado do Brasil, remanescendo fragmentos de constituição heterogênea que representam cerca de 12% de sua área original, caracterizadas por elevada diversidade e endemismo de espécies (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Nesse sentido, os Campos Gerais possuem características de um ecotóno, ou seja, possui zonas de transição entre dois biomas onde os atributos das regiões adjacentes são combinados resultando em um perfil singular e, conseqüentemente, com uma biodiversidade potencialmente ainda mais rica do que em cada Bioma separadamente (RITTER *et al.*, 2010; CARMO *et al.*, 2012; WILLIAMS, 1996; BATISTA & BASTOS, 2014).

Apesar de suas singulares características, informações sobre a biodiversidade dos Campos Gerais ainda são escassas. Levantamentos florísticos realizados na região usualmente destacam a abundância e riqueza de plantas da família Fabaceae (CARMO, 2006; RITTER *et al.*, 2010; MORO & CARMO, 2007; CERVI & VON LINSINGEN, 2007); de fato, o Brasil é um dos principais centros de radiação de leguminosas do mundo, contando inclusive com várias espécies endêmicas (LEWIS *et al.*, 2005). A espécie *Mimosa gymnas* Barneby é um subarbusto terrícola nativo e

endêmico do Brasil e com ocorrência basicamente restrita ao Estado do Paraná e abundante na região dos Campos Gerais associada a afloramentos areníticos (REFLORA, 2016; TAMASHIRO & ESCOBAR, 2016).

Um grupo de microrganismos presentes no solo é capaz de estabelecer uma interação simbiótica com plantas da família Fabaceae e fixar o nitrogênio atmosférico (DIXON & KAHN, 2004). Essas bactérias são chamadas coletivamente de rizóbios e a simbiose com hospedeiros compatíveis leva à formação de nódulos radiculares, órgãos especializados na fixação biológica do nitrogênio (FBN), dentro dos quais os rizóbios se diferenciam em bacteroides e reduzem o nitrogênio molecular a amônia (OLDROYD, 2013).

A maioria dos rizóbios descritos até então pertencem à classe Alphaproteobacteria, distribuídos nos gêneros: *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Devosia*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* e *Microvirga* (BOURNAUD *et al.*, 2013). Rizóbios pertencentes à classe Betaproteobacteria foram inicialmente descritos por CHEN *et al.*, 2001; desde então, um crescente número de beta-rizóbios pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Cupriavidus* vêm sendo descritos, especialmente associados com mimosóideas e fabóideas (REIS *et al.*, 2010; BONTEMPS *et al.*, 2010; GYANESHWAR *et al.*, 2011).

Estudos filogenéticos baseados em 16S DNAr (BONTEMPS *et al.*, 2010; GYANESHWAR *et al.*, 2011) e sequenciamento de vários genes (*multilocus*) (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2013) apontaram a clusterização das espécies do gênero *Burkholderia* em dois grupos, que foram concordantes com características ecológicas e fenotípicas das espécies analisadas. SAWANA *et al.* (2014) e DOBRITSA & SAMADPOR (2016) propuseram a transferência de todas as espécies ambientais para os novos gêneros *Paraburkholderia* e *Caballeronia*, enquanto as espécies reconhecidas como patógenos de plantas e animais permaneceriam como pertencentes ao gênero *Burkholderia*. Análises filogenéticas e genômicas posteriores deram suporte à reclassificação proposta (GAO *et al.*, 2016; BOURNAUD *et al.*, 2016; LV *et al.*, 2016).

Apesar da elevada abundância, riqueza e endemismo do gênero *Mimosa* no Brasil, ainda são escassos os estudos com plantas nativas, sendo estes essenciais para a compreensão das questões evolutivas e ecológicas envolvidas na interação *Mimosa*-rizóbios. Os Campos do Sul do País são negligenciados em relação a conservação e proteção de sua biodiversidade apesar de apresentar ecótonos que são regiões ecologicamente frágeis (OVERBECK et al., 2007). A associação de plantas com bactérias capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio pode contribuir na recuperação da flora nativa e dessa forma, auxiliar na manutenção biológica destas regiões. Nesse contexto, o presente estudo apresenta a diversidade de microssimbiontes isolados de nódulos radiculares de plantas nativas da espécie *Mimosa gymnas* amostradas no Parque Estadual do Guartelá, uma importante unidade de conservação dos Campos Gerais do Paraná.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Locais de amostragem de *Mimosa gymnas* nodulíferas e de solos.

Os espécimes de *M. gymnas* nodulíferas foram coletados no Parque Estadual do Guartelá (PEG), uma importante unidade de conservação da região, localizada no município de Tibagi (Paraná), no Segundo Planalto do Estado do Paraná, coordenadas 24°39'10"S e 50°15'25"W (Figura 2). Limita-se a leste pela Escapa Devoniana, em altitudes de 800 a 1200m acima do nível do mar, e a oeste com o Terceiro Planalto do Estado do Paraná, através da Serra da Esperança ou Serra Geral.

As coletas foram realizadas de julho de 2015 a maio de 2016. O material botânico foi removido manualmente ou com auxílio de pás para jardinagem e acondicionado em sacos plásticos. Os espécimes encontram-se no acervo do Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Todo o material botânico foi identificado por comparação com exsicatas de herbários e por consulta à bibliografia especializada.

Dos locais de ocorrência de *M. gymnas* nodulíferas (Figura 2B) foram coletadas amostras de solo (profundidade 0-10 cm) para análises físico-químicas.

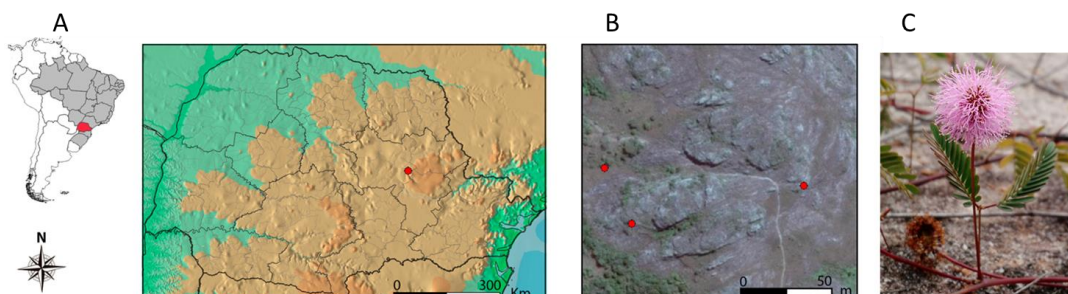


Figura 2. Localização da zona de amostragem no Estado do Paraná-Brasil (A), Locais de coleta no Parque Estadual do Guartelá - Tibagi (B). *M. gymnas* nativa do Parque Estadual do Guartelá (C)

Fonte: o autor

5.2.2 Isolamento e caracterização morfofisiológica dos isolados

As raízes das plantas coletadas foram lavadas e os nódulos foram desinfestados. Cada nódulo permaneceu 30 segundos na solução de álcool 70%, 3 minutos em solução de hipoclorito de sódio 3% e logo passaram por 10 lavagens consecutivas em água destilada estéril. Os nódulos foram inoculados em meio sólido seletivo *Yeast-Mannitol-Agar* (YMA) modificado (VINCENT, 1970). Os cultivos foram incubados a 28 °C, por 2 a 7 dias e caracterizados quanto a aspectos morfofisiológicos como morfologia da colônia (forma, elevação, borda, superfície, consistência, detalhes óticos e coloração), produção de muco e cromogênese da colônia em meio YMA com vermelho congo e em meio YMA modificado contendo indicador de pH Azul de bromotimol seguindo o “Manual de Curadores de Germoplasma da Embrapa Soja” (HUNGRIA & SILVA, 2011). Todas as estirpes estão depositadas na “Coleção de microrganismos multifuncionais da Embrapa Soja: bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas”.

5.2.3 BOX-PCR “DNA fingerprinting”

Para a obtenção dos perfis de rep-PCR utilizou-se o iniciador BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC *et al.*, 1994; KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995), seguindo as modificações propostas por KASCHUK (2006) e BATISTA (2007). Os *amplicons* foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se o *1kb Plus Ladder* (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

5.2.4 Sequenciamento dos genes 16S DNAr, *recA*, *gyrB* e *nodC*

Para a classificação taxonômica e análise filogenética foram escolhidos 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) e dois genes *housekeeping*. Para os genes *recA* e *gyrB* utilizou-se os iniciadores *recA*-BurkF (5'-AGGACGATTCATGGAAGAWAGC-3') e *recA*-BurkR (5'-GACGCACYGAYGMRTAGAACTT-3') (SPILKER *et al.*, 2009) e os iniciadores *gyrB*-BurkF (5'-ACCGGTCTGCAYCACCTCGT-3') e *gyrB*-BurkR (5'-YTCGTTGWARCTGTCGTTCCACTGC-3') (SPILKER *et al.*, 2009).

Para a filogenia dos genes de nodulação, um fragmento do gene *nodC* foi amplificado e sequenciado utilizando-se os iniciadores *nodC*BurkF (5'-TRATYGAYATGGAATACTGGC-3') e *nodC*BurkR (5'-CAGCGGAYATMGTCATTGA-3') (BOURNAUD *et al.*, 2013).

Todos os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification kit* (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante e submetidos à sequenciamento em ABI 3500XL (Applied Biosystems).

As sequências foram depositadas no Genbank (NCBI) e receberam os seguintes números de acesso: KY498126-KY498150 para sequências do gene 16S DNAr, KY498207-KY498222 para sequências do gene *recA*, KY498191-KY498206 para o gene *gyrB* e KY498166-KY498190 para o gene de nodulação *nodC*.

5.2.5 Análise dos dados moleculares

Um dendograma foi construído com os perfis BOX-PCR utilizando o programa Bionumerics (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Bélgica, v.7.0), aplicando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*; (SNEATH & SOKAL; 1973) e coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912), com 2% de tolerância.

As sequências de bases nitrogenadas obtidas no sequenciamento foram corrigidas com o programa Bionumerics (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Belgium, v. 7.6), alinhadas e analisadas no programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 6.1.

Os genes *recA* e *gyrB* foram analisados tanto individualmente quanto concatenados.

Para o gene 16S DNAr utilizou-se o algoritmo de Máxima Verossimilhança e modelo Tamura 3-parametros (TAMURA, 1992) com distribuição G+I (TAMURA et al., 2013).

Utilizou-se o modelo de distância Tamura Nei (TAMURA; NEI, 1993) para o gene *nodC* e para as sequências individuais e concatenadas dos genes *recA* e *gyrB*. O suporte estatístico para as árvores foi avaliado por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições (HEDGES, 1992).

Os dados de identidade nucleotídica foram gerados mediante alinhamento no programa Bioedit (v.7.2.5).

5.3 Resultados

5.3.1 Características físico-químicas dos solos das áreas de amostragem de *M. gymnas* nodulíferas

Foram coletadas 15 plantas nodulíferas da espécie *M. gymnas* em três áreas do Parque Estadual do Guartelá correspondentes às seguintes coordenadas geográficas: área 1 (Latitude 24°33'52.24"S Longitude 50°15'3.12"O), área 2 (Latitude 24°33'52.75"S e Longitude 50°15'10.27"O) e área 3 (Latitude 24°33'51.73"S e Longitude 50°15'10.79"O) (Figura 2B).

Os resultados das análises físico-químicas das áreas de amostragem de plantas nodulíferas revelam que o solo da região é arenoso (areia superior a 80%, silte entre 4 e 9,5% e argila entre 5,8 e 8%), altamente ácido (pH 3,6-3,8), com elevados níveis de alumínio ($1,7 - 2,4 \text{ cmolc/dm}^3$), baixo teor de nutrientes (Ca: $0,2 - 0,3 \text{ cmolc/dm}^3$, Mg: $0,1 - 0,2 \text{ cmolc/dm}^3$, K: $0,06 - 0,08 \text{ cmolc/dm}^3$, P: $0,5 - 1,8 \text{ mg/dm}^3$) e baixa fertilidade (C_{org} : $23 - 30 \text{ g/dm}^3$) (Material suplementar S1).

5.3.2 Isolamento e caracterização morfofisiológica de rizóbios isolados de nódulos radiculares de *M. gymnas*

Um total de 29 rizóbios isolados de nódulos de plantas nativas de *M. gymnas*. Informações detalhadas sobre as características morfofisiológicas dos isolados encontram-se no Material Suplementar S2.

Todos consistiram de bactérias Gram-negativas e produtoras de reação ácida em meio YM, com exceção da estirpe CNPSo 2995 que manteve o meio neutro. A forte acidificação do meio de cultivo foi inclusive observada em meio YM acrescido de vermelho congo, visto que muitas das bactérias modificaram a coloração do meio para roxo, uma ocorrência pouco relatada para rizóbios.

O tempo de crescimento variou de rápido (até 3 dias) a intermediário (6 a 9 dias), sendo que apenas 4 estirpes (CNPSO 3003, 3015, 3017 e 3021) apresentaram crescimento lento (6 a 9 dias). Todas as estirpes apresentaram forma da colônia circular, com exceção de CNPSO 2997 e CNPSO 3035 que possuíam forma puntiforme (até 1 mm).

A produção de muco foi considerada baixa dentre as estirpes e em alguns casos moderada. A consistência da massa de crescimento foi, em geral, viscosa e gomosa. A CNPSO 3017 apresentou consistência seca e a CNPSO 3016 a consistência butírica.

5.3.3 BOX-PCR fingerprinting

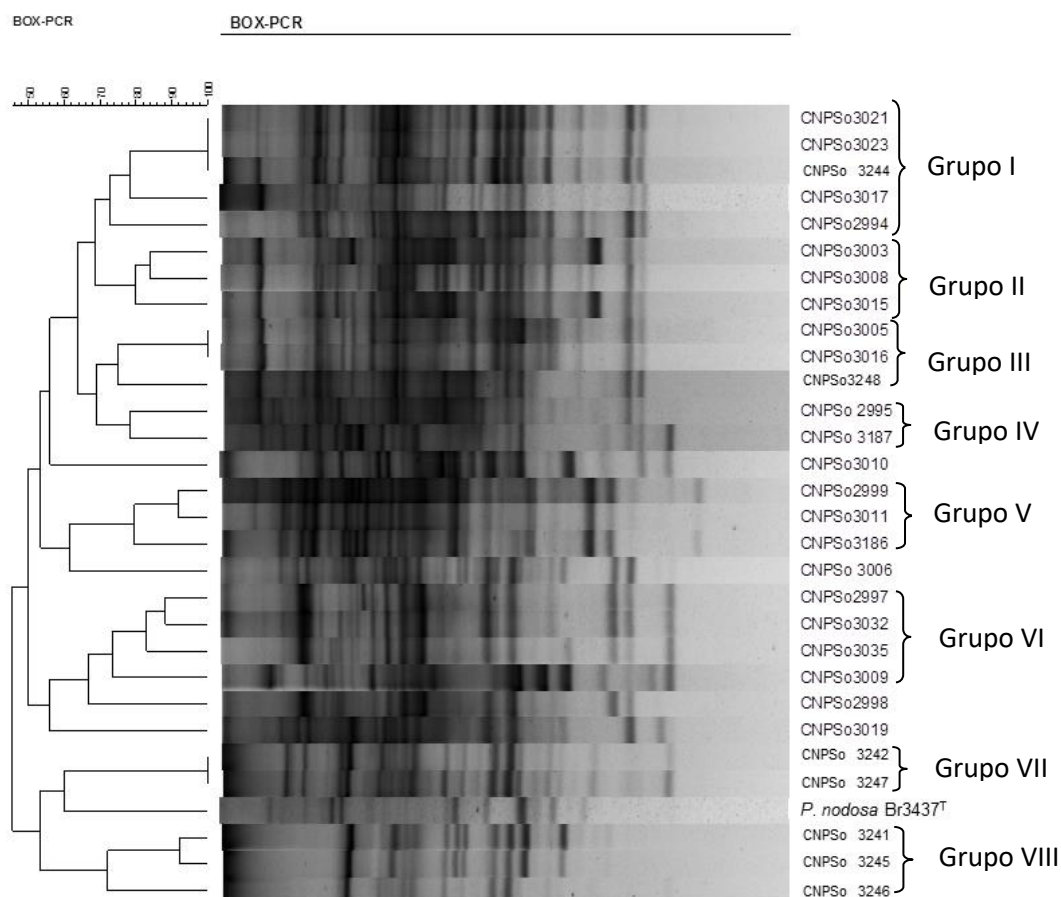


Figura 3. Dendrograma de similaridade baseado nos perfis de BOX-PCR de rizóbios isolados de nódulos de *M. gymnas*, utilizando o algoritmo UPGMA, coeficiente de Jaccard de 2% de tolerância, utilizando o *software* Bionumerics 7.6.

O valor de 70% de similaridade nos perfis de BOX-PCR, bem como em demais análises baseadas em rep-PCR, é sugerido para o delineamento de grupos por outros autores (DALL'AGNOL *et al.*, 2016; MENNA *et al.*, 2009; KASCHUK *et al.*, 2006). Nesse contexto, observou-se a formação de 8 grupos compartilhando mais de 70% de similaridade, considerando um valor de tolerância de 2% na construção do dendrograma.

As estirpes do Grupo I CNPSo3021, CNPSo 3023 e CNPSo 3244 apresentaram perfis idênticos, assim como as estirpes do Grupo III CNPSo 3005 e CNPSo 3016 e também as estirpes do Grupo VII. Por outro lado, as

estirpes CNPSO 3019 e CNPSO 3006, CNPSO 3010, CNPSO 2998 e *P. nodosa* Br3437^T apresentaram perfis únicos.

5.3.4 Análise filogenética do gene 16S DNAr

A Figura 4 apresenta a árvore gerada pela análise filogenética baseada em sequências parciais (~1150 pb) do gene 16S DNAr dos rizóbios isolados de *M. gymnas*. Estirpes tipos de diferentes espécies de *Paraburkholderia* foram incluídas na análise e utilizou-se *Cupriavidus* como *outgroup*. Todas as estirpes foram classificadas como pertencentes ao gênero *Paraburkholderia*, e exibiram elevada identidade nucleotídica com a estirpe tipo de *P. nodosa*, Br3437^T (Material suplementar S3).

As estirpes foram agrupadas em um grande *cluster*, sendo que as mais divergentes foram CNPSO 3006 (que foi agrupada com *P. bannensis* E25^T), e CNPSO 3010 e CNPSO 3011 (agrupadas com *P. nodosa* Br3437^T) (Figura 4).

A similaridade nucleotídica entre os isolados de *M. gymnas* e *P. nodosa* BR3437^T variou de 96,9% (CNPSO 2995, CNPSO 3005, CNPSO 3008, CNPSO 3017, CNPSO 3023, CNPSO 3187 e CNPSO3248) a 99,8% (CNPSO 3011) (Material suplementar S3).

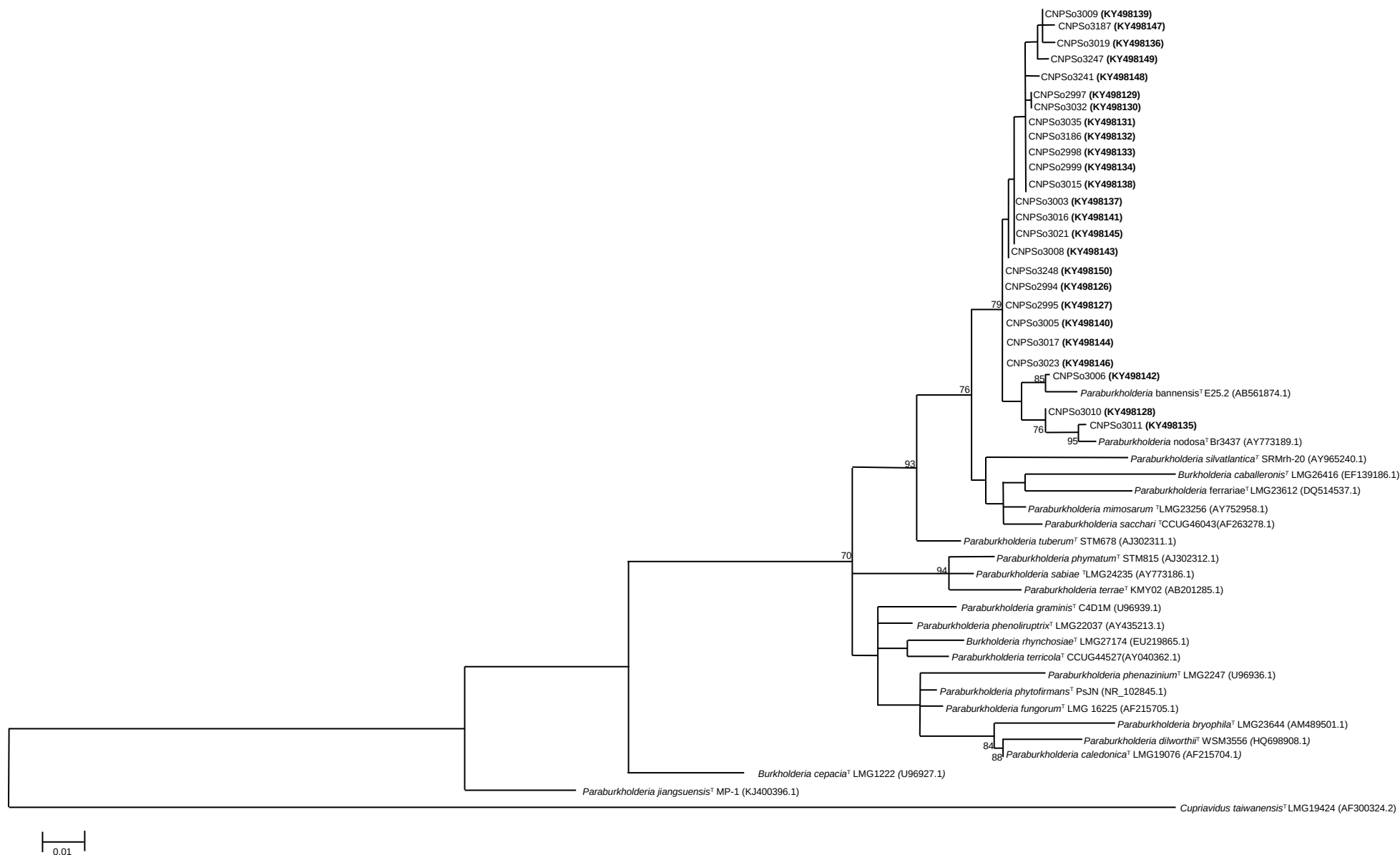


Figura 4. Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S DNAr de rizóbios isolados de nódulos radiculares de *M. gymnas* (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura 3-parametros com distribuição G+I, 1000 repetições Bootstrap) utilizando o software Mega 6.06. Valores de *Bootstrap* superiores a 70% são apresentados.

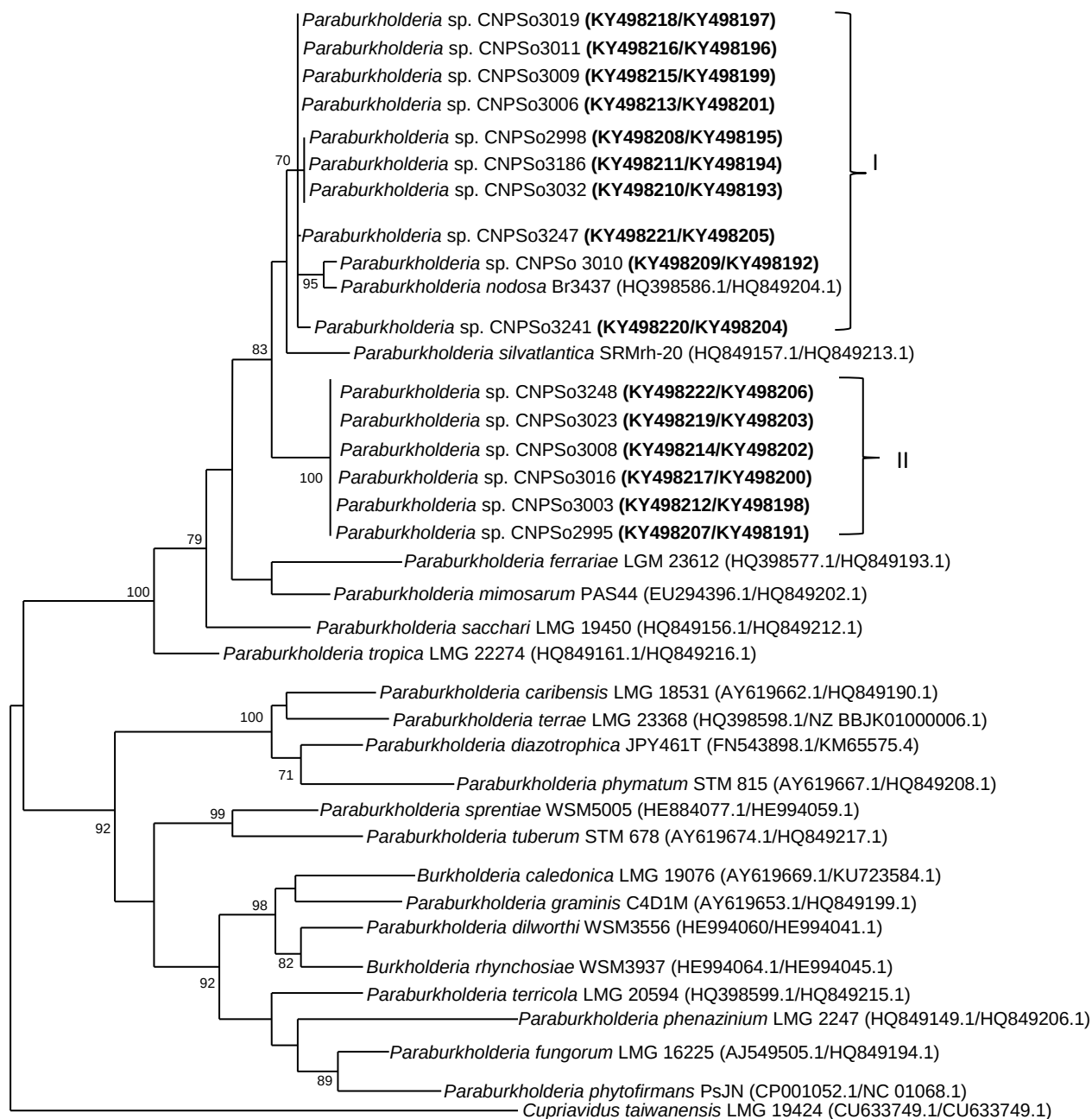
5.3.5 Filogenia dos genes *housekeeping recA* e *gyrB*

Com base nas características morfofisiológicas, filogenia do 16S DNAr e perfis de BOX-PCR, 16 isolados que apresentaram perfis diferenciados foram selecionados para uma maior definição taxonômica, baseada na filogenia de genes *housekeeping*.

O Material Suplementar S4 e S5 apresentam, respectivamente, as árvores filogenéticas construídas com as sequências individuais dos genes *recA* e *gyrB*. Além disso, foi construída uma árvore filogenética com as sequências concatenadas de ambos os genes (Figura 5).

As estirpes foram agrupadas em 2 grupos, ambos suportados por valores de *bootstrap* elevado. O grupo I (70% de valor de *bootstrap*) incluiu 10 estirpes e a estirpe tipo de *P. nodosa*. O grupo II (100% de valor de *bootstrap*) incluiu 6 estirpes, no entanto esse grupo não apresentou similaridade com nenhuma espécie de *Paraburkholderia* conhecida (Material suplementar S3). Nota-se que isolados pertencentes aos grupos I e II encontram-se no mesmo grupo na árvore filogenética do gene 16S DNAr (79% de valor de *bootstrap*). A estirpe CNPSo 3010 manteve sua elevada similaridade com *P. nodosa* Br3437^T (*bootstrap*=95%).

Os grupos também foram distintos dos grupos observados nas análises por BOX-PCR (Figura 3). Quanto à identidade nucleotídica, os isolados apresentaram de 97% a 99,1% de similaridade com a estirpe de *P. nodosa* Br3437^T (Material suplementar S6).



0.02

Figura 5: Árvore filogenética dos isolados de nódulos de *M. gymnas* baseada nas sequências parciais dos genes *recA* e *gyrB* concatenados (Máxima Verossimilhança, modelo Tamura-Nei) utilizando o software Mega 6.06. O suporte de *bootstrap* foi baseado em 1000 repetições e valores são apresentados quando superiores a 70%.

5.3.6 Análise filogenética do gene de nodulação *nodC*

As sequências parciais do gene *nodC* (~400 pb) apresentaram uma elevada similaridade entre as estirpes de *M. gymnas* (Figura 6) diferentemente dos resultados apresentados nas análises por BOX-PCR e

filogenia dos genes, *recA* e *gyrB*, apenas em congruência com a filogenia do 16S DNAr. Como a sequência parcial do *nodC* da estirpe tipo de *P. nodosa* não estava disponível nos bancos de dados, utilizou-se a sequência da estirpe Br3470, isolada originalmente de *M. bimocronata* no Brasil (CHEN *et al.*, 2005) e também utilizada na descrição da espécie de *P. nodosa* (CHEN *et al.*, 2007).

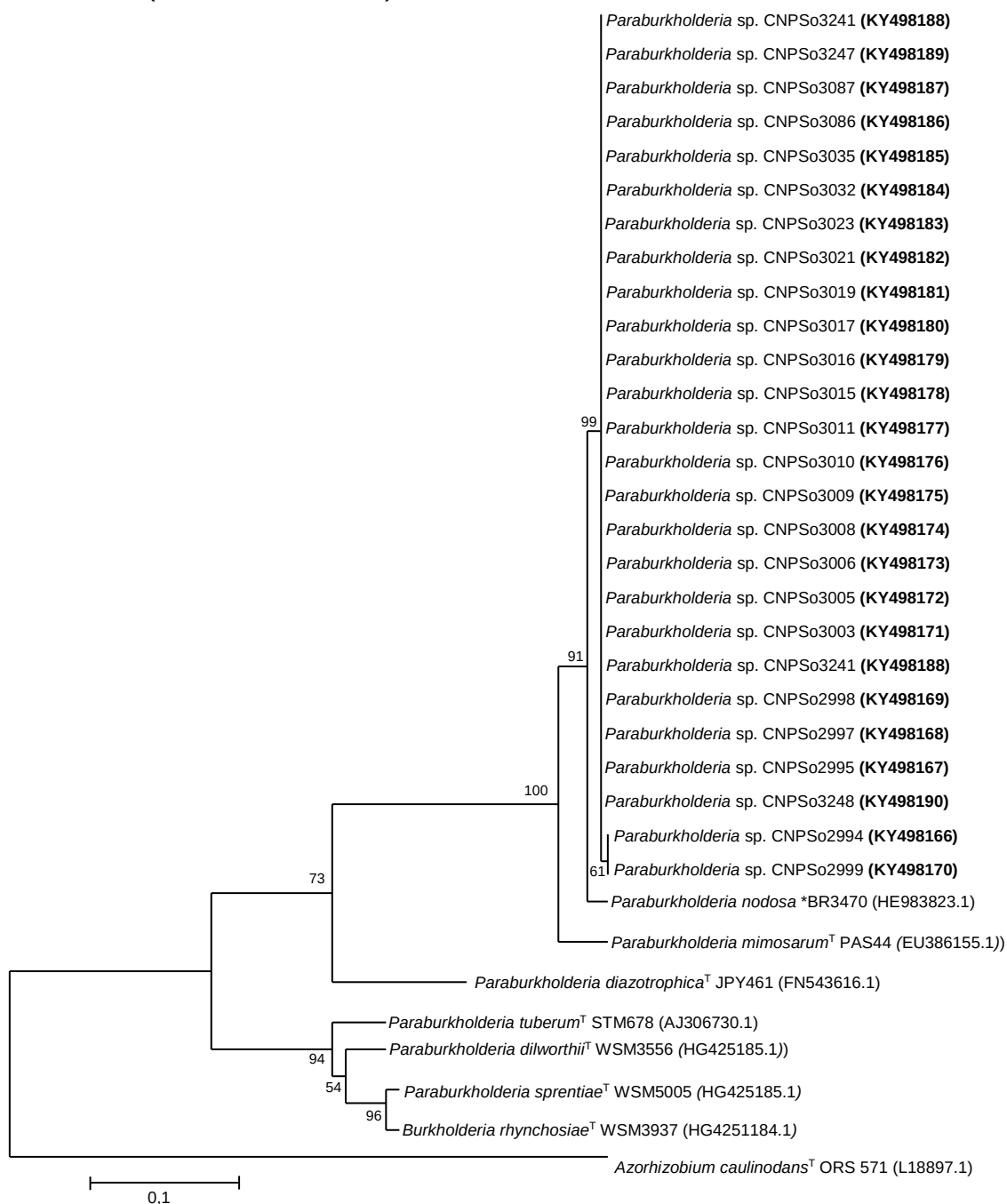


Figura 6: Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene de nodulação *nodC* de isolados de nódulos de *M. gymnas* (Máxima Verossimilhança, modelo Tamura-Nei com 1000 repetições) utilizando o software Mega 6.06.

A identidade nucleotídica encontrada para o gene *nodC* entre as estirpes obtidos de *M. gymnas* e *P. nodosa* Br3470 variou de 96,9% a 97,2% (Material suplementar S3).

5.4 Discussão

Uma das características mais singulares dos Campos Gerais é que a região possui zonas de transição entre dois biomas brasileiros considerados *hotspots* de biodiversidade: a Mata Atlântica e o Cerrado (MYERS, 2000; RITTER *et al.*, 2010), sendo caracterizado como um ecótono.

Ecótonos são áreas únicas, pois unem características físicas e biológicas de regiões adjacentes, conferindo uma composição da biodiversidade ainda mais rica do que em cada bioma separadamente (WILLIAMS, 1996; RITTER *et al.*, 2010; CARMO *et al.*, 2012; BATISTA & BASTOS, 2014). Em nosso estudo observamos que alguns atributos físico-químicos dos solos do Parque Estadual do Guartelá (Material suplementar S1) foram similares aos dos solos tipicamente encontrados no Cerrado, que se caracterizam por serem arenosos, pobres em nutrientes, possuem elevada acidez e elevados níveis de Al (GALLI-TERASAWA *et al.*, 2003; BATISTA *et al.*, 2007; MIATTO *et al.*, 2016).

Os solos das áreas de amostragem de *M. gymnas* nodulíferas possuem pH máximo de 3,8 (Material suplementar 1). O pH do solo é um dos fatores que exerce maior influência sobre a diversidade microbiana, provavelmente devido ao intervalo estreito para o valor de crescimento ótimo bacteriano, (LAUBER *et al.*, 2008; ROUSK *et al.*, 2010; ZHALNINA *et al.*, 2015), assim como influencia na composição florística de uma região (CAMARGO-RICALDE *et al.*, 2002; VIANI *et al.*, 2014). Segundo BORDELEAU & PREVOST (1994) grande parte das plantas da família Fabaceae requerem um solo alcalino ou ligeiramente ácido para seu crescimento, sendo que problemas na nodulação são esperados com pH abaixo de 5.5. Fato esse que não condiz com nossos resultados e levantamentos realizados na região, visto que os Campos Gerais possuem uma grande riqueza e abundância de leguminosas (CARMO, 2006; MORO & CARMO, 2007; CERVI & VON LINSINGEN, 2007; RITTER *et al.*, 2010) sendo muitas delas

recentemente relatadas como nodulíferas (KLEPA *et al.*, 2016). Pode-se sugerir que micro e macrossimbiontes estejam adaptados às condições locais.

Outro fator determinante é a concentração de Al no solo, e constatamos níveis elevados nos solos em estudo (Material suplementar 1). Em condições de baixo pH (pH <5) o Al passa à forma trivalente Al^{3+} que, em concentrações elevadas, é tóxico e identificado como o principal fator limitante na viabilidade da planta em 67% de todos os solos de pH baixo (FERGUSON *et al.*, 2013). Altos níveis de Al^{3+} no solo também inibem o desenvolvimento e funcionalidade de nódulos radiculares (KOCHIAN, 2004; FERGUSON *et al.*, 2013) alterando assim o processo FBN.

Apesar das condições encontradas nos solos do Parque Estadual do Guartelá serem relatadas como influências negativas ao estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa, relatamos a ocorrência de nodulação de plantas nativas dos Campos Gerais, pertencentes a diversas espécies, em especial do gênero *Mimosa* (KLEPA *et al.*, 2016).

Mimosa L. possui mais de 500 espécies e é o segundo maior gênero da subfamília Mimosoideae (SIMON *et al.*, 2011). Tem como principais centros de diversidade na América do Sul o Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina e o Centro-sul do México. O Brasil é considerado seu maior centro de diversificação, mais especificamente em áreas relacionadas aos Biomas Cerrado e a Caatinga, com várias espécies nativas e elevado grau de endemismo (BARNEBY, 1991; SIMON & PROENÇA, 2000; CHEN *et al.*, 2007; DOS REIS JR. *et al.*, 2010). Muitas dessas espécies são encontradas na região dos Campos Gerais (CARMO, 2006; MORO & CARMO, 2007; CERVI & VON LINSINGEN, 2007; RITTER *et al.*, 2010).

Em nosso estudo utilizamos a espécie *M. gymnas*, por ser bastante representativa na região dos Campos Gerais (REFLORA, 2016). A espécie associa-se normalmente a afloramentos areníticos e, com menos frequência, em áreas de transição de campo com floresta ombrófila mista. Sua morfologia promove rápida identificação por tratar-se de um subarbusto reptante com ramos marcadamente achatados. Acredita-se que essa característica dos ramos lhe confere uma vantagem adaptativa quanto à fixação ao substrato, pois *M. gymnas* normalmente ocorre em ambientes

íngremes (TAMASHIRO & ESCOBAR, 2016). A ocorrência de nódulos radiculares em *M. gymnas* foi relatada pela primeira vez no presente estudo assim como a diversidade de seus microssimbiontes.

Em nosso trabalho verificamos a preferência entre o gênero *Mimosa* e simbiontes pertencentes à classe Betaproteobacteria na América do Sul. A filogenia do gene ribossomal 16S DNAr revelou que todos os isolados de *M. gymnas* são pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* (Figura 4). A nodulação de leguminosas por betaproteobacterias foi relatada por outros autores (DOS REIS JR. *et al.*, 2010; BONTEMPS *et al.*, 2010; GYANESHWAR *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 2015; DALL'AGNOL *et al.*, 2016), porém poucas vezes foi realizado o isolamento a partir de nódulos nativos, o qual é essencial, pois relata fielmente a associação entre hospedeiro, microssimbionte e ambiente.

Os gêneros *Paraburkholderia* e *Caballeronia* foram recentemente criados visando a reclassificação de espécies de importância ambiental originalmente pertencentes ao gênero *Burkholderia* (SAWANA *et al.*, 2014; DOBRITSA & SAMADPOR, 2016). Esses os três gêneros têm em comum a excepcional versatilidade metabólica e funcional (COENYE & VANDAMME, 2003; COMPANT *et al.*, 2008; KOST *et al.*, 2013; DA COSTA *et al.*, 2014) e encontram-se normalmente associadas a condições adversas como solos nutricionalmente pobres, ambientes contaminados, altos níveis de Al e pH ácido (KUNITO *et al.*, 2012; PÉREZ-PANTOJA *et al.*, 2012; KOST *et al.*, 2013; DA COSTA *et al.*, 2014), assim como foi observado no presente trabalho. No entanto, informações sobre sua ecologia, biogeografia e diversidade ainda são escassos.

O gênero *Mimosa* é um modelo em estudos de taxonomia de rizóbios por ser nodulada não apenas por alfa-proteobacterias mas também por betaproteobacterias (BARRET & PARKER, 2006; LIU *et al.*, 2012; SHEU *et al.*, 2013; BONTEMPS *et al.*, 2016). Beta-rizóbios são os principais simbiontes de mimosoídeas na América do Sul (CHEN *et al.*, 2007; DOS REIS JR. *et al.*, 2010; BOURNAUD *et al.*, 2013). BARRETT & PARKER (2006) analisaram a diversidade de rizóbios de duas espécies de *Mimosa* sp. de diferentes regiões da Costa Rica. Os autores constataram a co-ocorrência de três diferentes gêneros de alfa e betaproteobactérias em

uma mesma planta hospedeira, cujas populações de microsimbiontes variaram conforme a localização geográfica e fatores ambientais locais. Já no México, espécies do gênero *Mimosa* são noduladas por alfaproteobactérias (BONTEMPS *et al.*, 2016).

Assim como em nossos resultados, STOPNISEK *et al.* (2013) relataram que espécies de *Burkholderia/Paraburkholderia* possuem notável vantagem competitiva em solos com pH ácido. Ainda, DALL'AGNOL *et al.* (2016), utilizando feijoeiro (*Phaesolus vulgaris*) como planta-isca para isolamento de rizóbios de solos do "Cerradão", relataram que aqueles pertencentes ao gênero *Rhizobium* (usual microsimbiontes do feijoeiro) representaram apenas uma pequena proporção dos simbiontes isolados, enquanto a maioria foi classificado como *Paraburkholderia* sp.

Alguns isolados de *M. gymnas* apresentaram valores de similaridade nucleotídica do 16S DNAr abaixo de 97% com relação a *P. nodosa* Br3437^T (Material suplementar 3), o que levou à utilização de análises adicionais para uma melhor definição taxonômica.

A utilização de sequências concatenadas dos genes *housekeeping recA* (~ 650 pb) e *gyrB* (~700 pb) permitiu uma melhor definição da taxonomia das estirpes em estudo (Figura 5). Esses genes foram escolhidos por serem comumente adotados em MLSA (*Multilocus sequence analysis*) e definição de novas espécies de rizóbios (LV *et al.*, 2016) além de serem especificamente eficientes para filogenia e taxonomia do gênero *Paraburkholderia* (BOURNAUD *et al.*, 2013; DALL'AGNOL *et al.*, 2016).

Os isolados foram separados em dois grupos principais, sendo o primeiro agrupando alguns dos isolados com *P. nodosa*^T e o segundo grupo formado unicamente por isolados de *M. gymnas*, com valor de *bootstrap* de 100%. Os isolados do segundo grupo exibiram identidade nucleotídica do 16S DNAr menor ou igual a 97% em relação à estirpe tipo *P. nodosa*; tais dados filogenéticos preliminares somados ao caráter endêmico da planta hospedeira indicam que os isolados CNPSO3248, CNPSO 3023, CNPSO 3008, CNPSO 3016, CNPSO 3003 e CNPSO 2995 requerem estudos específicos pois podem representar uma nova espécie do gênero (VANDAMME *et al.*, 1996).

A filogenia dos genes 16S DNAr combinada com a análise de genes *housekeeping* conferem uma elevada resolução taxonômica, servindo como base para reclassificação e proposta de novas espécies de *Paraburkholderia* (GYANESHWAR *et al.*, 2011; ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2013; , GAO *et al.*, 2016; BOURNAUD *et al.*, 2016; LV *et al.*, 2016; DOBRITSA & SAMADPOUR, 2016). Os genes *recA* e *gyrB* foram especialmente selecionados para tal finalidade por permitir uma eficiente classificação de rizóbios (DELAMUTA *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2016), em especial do gênero *Paraburkholderia* (DALL'AGNOL *et al.*, 2016; LV *et al.*, 2016).

Genes de nodulação são usualmente utilizados em estudos filogenéticos de rizóbios por serem exclusivos desse grupo e intrinsicamente relacionados com a interação planta-leguminosa. A filogenia do gene *nodC* é inclusive utilizada na definição de simbióvares de rizóbios, por sua importância central na síntese dos fatores Nod e, consequentemente, especificidade hospedeira (ROGEL *et al.*, 2011). Quanto à filogenia do gene de nodulação *nodC* de estirpes de *M. gymnas*, observou-se a formação de um único grupo (Figura 6) que não incluiu nenhuma estirpe tipo; as sequências exibiram similaridade nucleotídica com o gene *nodC* de *P. nodosa* Br3470 de 96,9 e 97,2% (Material Suplementar S3). A espécie *P. nodosa* foi exclusivamente isolada no Brasil e é capaz de nodular *Piptadenia*, *Parapiptadenia*, *Anadenanthera* (BOURNAUD *et al.*, 2013) e até *Phaseolus vulgaris* (DALL'AGNOL *et al.*, 2016).

A variabilidade do gene *nodC* em beta-rizóbios é significativamente menor quando comparada com alfa-rizóbios (BONTEMPS *et al.*, 2010). Supõe-se que as espécies de *Paraburkholderia* que nodulam leguminosas evoluíram de espécies diazotróficas indígenas do solo ou endofíticas que receberam os genes simbióticos via transferência horizontal (MOULIN *et al.*, 2015; BONTEMPS *et al.*, 2010).

No entanto, verifica-se uma elevada congruência entre os complexos de espécies de *Paraburkholderia* e clados formados em análises filogenéticas de genes de nodulação, o que indica que a ocorrência de transferência lateral de genes simbióticos entre beta-rizóbios foi bastante

limitada (GYANESHWAR *et al.*, 2011; BONTEMPS *et al.*, 2010; BONTEMPS *et al.*, 2010; DALL'AGNOL *et al.*, 2016); o mesmo foi observado em nossos resultados onde todas as estirpes apresentam um caráter monofilético em relação à filogenia do gene *nodC*.

5.5 Considerações finais

Durante muitos anos, os rizóbios foram estudados baseados em sua interação com espécies da família Fabaceae de importância agrônômica. Assim, os rizóbios eram essencialmente definidos como polifiléticos e distribuídos entre quatro famílias de alfa-proteobacterias, capazes de estabelecer interação simbiótica com uma ampla gama de gêneros de leguminosas.

Recentemente, com a intensificação da utilização de leguminosas nativas como modelos de estudo em diferentes localidades somada à revolução da filogenética molecular, novos táxons bacterianos foram descritos com base em sua capacidade de nodular leguminosas, em especial pertencentes à classe Betaproteobacteria. Diferente dos rizóbios “clássicos”, os beta-rizóbios possuem uma história evolutiva divergente e pouco elucidada e são particularmente associados a espécies pertencentes à subfamília Mimosoideae. Enquanto alfa-rizóbios são reconhecidos por serem taxonomicamente heterogêneos e polifiléticos, a capacidade de nodulação é restrita a poucos grupos de betaproteobactérias e de aparente origem monofilética (BONTEMPS *et al.*, 2010; BOURNAUD *et al.*, 2013).

O Brasil, seguido do México, é o principal centro de radiação do gênero *Mimosa*, muitas das quais são endêmicas particularmente em áreas de altitude (SIMON *et al.*, 2011). Considerando o elevado grau de endemismo dessas leguminosas no Brasil, o país também representa um dos principais centros de diversidade de beta-rizóbios (MOULIN *et al.*, 2015). As análises filogenéticas das estirpes de *Paraburkholderia* isoladas de *M. gymnas* nativas e endêmicas do Brasil confirmam que o gênero é o principal simbiote do gênero *Mimosa* no Brasil; o mesmo não ocorre no México, onde plantas do gênero *Mimosa* são preferencialmente noduladas por alfa-proteobacterias e os solos são neutros/alcalinos (BONTEMPS *et al.*, 2016).

Ainda, as análises filogenéticas dos genes 16S DNAr, *recA* e *gyrB* indicam a existência de um grupo de estirpes que foram suficientemente distintos das espécies bacterianas estabelecidas e, portanto, representam uma potencial nova espécie de beta-rizóbio.

Portanto, estudos de diversidade de rizóbios isolados de nódulos de leguminosas endêmicas e nativas são essenciais na investigação e resolução das relações evolutivas entre os simbioss e permitem o isolamento e caracterização de novos grupos taxonômicos de rizóbios.

6 Conclusão:

O Brasil é um país considerado megadiverso, inclusive em sua microbiota. Estudos com plantas associadas à rizóbios em áreas nativas são essenciais para a compreensão da evolução de macro e microsimbionte, e também pelo fato de que a associação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e plantas da família Fabaceae podem auxiliar na recuperação de áreas degradadas. Tais estudos são escassos, principalmente na região Sul do Brasil, portanto, o presente trabalho realizou o primeiro levantamento de bactérias diazotróficas na região dos Campos Gerais (Paraná, Brasil) e relatou por primeira vez a presença de nódulos radiculares em *M. gymnas*. Nosso trabalho corrobora com estudos que demonstram que os simbiossiontes preferenciais de *Mimosa* na América do Sul pertencem à classe Betaproteobacteria, pois todas as estirpes isoladas são pertencentes ao gênero *Paraburkholderia*. Além disso, confere suporte para a constatação da forte influência de componentes físico-químicos do solo na diversidade de microsimbiossiontes.

Visto que o estudo ainda relatou um grupo de estirpes que podem representar uma nova espécie, metodologias específicas com o intuito de descrever uma espécie do gênero *Paraburkholderia* serão realizadas.

7 Referências Bibliográficas

1. ABDOLLAHZADEH, J.; ZOLFAGHARI, S. Efficiency of rep-PCR fingerprinting as a useful technique for molecular typing of plant pathogenic fungal species: *Botryosphaeriaceae* species as a case study. **FEMS microbiology**. v. 361, n. 2, p. 144-157, 2014.
2. ALFAIA, S. S. Characterization and distribution of organic forms of nitrogen in three soils of Central Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 2, p. 135-140, 2006.
3. ANDRADE, A. L. P.; MIOTTO, S. T. S.; SANTOS, É. P. dos. The subfamily Faboideae (Fabaceae Lindl.) in the Parque Estadual do Guartelá, Paraná State, Brazil. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 737-768, 2009.
4. BARNEBY, R. C. *Sensitivae censitae*: a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the new world. **Memoirs of the New York Botanical Garden**. v. 65, p. 1-835, 1991.
5. 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**, v. 72, n. 2, p. 1198-1206, 2006.
6. BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. Sistemática de Angiospermas do Brasil. **Imprensa Universitária, Viçosa, UVF**. v.1, 309pp, 1991.

7. 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**, v. 53, n. 2, p. 270-284, 2007.

8. BATISTA, V. G.; BASTOS, R. P.. Anurans from a Cerrado-Atlantic Forest ecotone in Campos Gerais region, southern Brazil. **Check List**, v. 10, n. 3, p. 574-582, 2014.

9. BONTEMPS C., ROGEL, M. A., WIECHMANN, A., MUSSABEKOVA, A., MOODY, S., SIMON, M. F., MOULIN, L., ELLIOT, 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. & JAMES, E. K. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **New Phytologist**, v. 209, n. 1, p. 319-333, 2016.

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

11. *bootstrap*. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

12. BORDELEAU, L. M.; PREVOST, D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. **Symbiotic Nitrogen Fixation**. Springer Netherlands, 1994. p. 115-125.
13. BOURNAUD, C., DE FARIA, S. M., DOS SANTOS, J. M. F., TISSEYRE, P., Silva, M., CHAINTREUIL, C., GROSS, E.; JAMES, E. K.; PRIN, Y. & MOULIN, L. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the *piptadenia* group (tribe mimoseae). **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63478, 2013.
14. BOURNAUD, C., MOULIN, L., CNOCKAERT, M., de FARIA, S. M., PRIN, Y., SEVERAC, D., & VANDAMME, P. *Paraburkholderia piptadeniae* sp. nov. and *Paraburkholderia ribeironis* sp. nov., two root-nodulating symbiotic species of *Piptadenia gonoacantha* in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2016.
15. BROUGHTON, W. J. *et al.* Signals exchanged between legumes and Rhizobium: agricultural uses and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 129-137, 2003.
16. CAMARGO-RICALDE, S. L.; DHILLION, S. S.; GREYER, R. Community structure of endemic Mimosa species and environmental heterogeneity in a semi-arid Mexican valley. **Journal of Vegetation Science**, v. 13, n. 5, p. 697-704, 2002.
17. 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
18. CARMO, M. R. B. do; ASSIS, M. A. de. Structural and floral characterization of the naturally fragmented forests in the Parque Estadual do Guartelá, Tibagy municipality, Paraná, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, p. 133-145, 2012.
19. CERVI, A. C.; VON LINSINGEN, L.; HATSCHBACH, G.; & RIBAS, O. S. A vegetação do Parque Estadual de Vila Velha, município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Boletim do Museu Botânico Municipal**, v. 69, n. 1, p. 01-52, 2007.
20. CHAPIN, F. S. The mineral nutrition of wild plants. **Annual review of ecology and systematics**, v. 11, p. 233-260, 1980.
21. CHEN, W. M., LAEVEENS, S., LEE, T. M., COENYE, T., DE VOS, P., MERGEAY, M., & VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, 2001.
22. CHEN, W. M.; DE FARIA, S. M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMOES ARAUJO, J. L.; CHOU, J. H.; CHOU, Y. J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 11, p. 7461-7471, 2005.

23. CHEN, W. M., JAMES, E. K., COENYE, T., CHOU, J.H., BARRIOS, E., DE FARIA, S. M., ELLIOTT, G. N., SHEU, S.Y., SPRENT, J. I., VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1847-1851, 2006.
24. CHEN, W.M., de FARIA, S.M., JAMES, E.K., ELLIOTT, G.N., LIN, K.Y., CHOU, J.H., SHEU, S.Y., CNOCKAERT, M., SPRENT, J.I., VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1055-1059, 2007.
- 25.
26. CHEN, W.M., DE FARIA, S.M., CHOU, J.H., JAMES, E.K., ELLIOTT, G.N., SPRENT, J.I., BONTEMPS, C., YOUNG, J.P.W., VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2174-2179, 2008.
27. COENYE, T., VANDAMME, P., GOVAN, J. R. W. & LIPUMA, J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3427-3436, 2001.
28. COENYE, T., HENRY, D., SPEERT, D. P., & VANDAMME, P. *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2, 4, 5-

- trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. **Systematic and applied microbiology**, v. 27, n. 6, p. 623-627, 2004.
- 29.COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 719-729, 2003.
- 30.COMPANT, S., NOWAK, J., COENYe, T., CLÉMENT, C., & BARKA, E. A. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. 607-626, 2008.
- 31.CREWS, T. E. The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations. In: **New Perspectives on Nitrogen Cycling in the Temperate and Tropical Americas**. Springer Netherlands, 1999. p. 233-246.
- 32.DA COSTA, P. B.; GRANADA, C. E.; AMBROSINI, A.; MOREIRA, F.; DE SOUZA, R.; DOS PASSOS, J. F. M.; ARRUDA, L & PASSAGLIA, L. M. A model to explain plant growth promotion traits: a multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e116020, 2014.
- 33.DALL'AGNOL, R. F., PLOTEGHER, F., SOUZA, R. C., MENDES, I. C., DOS REIS JUNIOR, F. B., BÉNA, G., MOULIN, L & HUNGRIA, M. *Paraburkholderia nodosa* is the main N₂-fixing species trapped by

- promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian “Cerradão”. **FEMS microbiology ecology**, p. fiw108, 2016.
- 34.DELAMUTA, J. R. M., RIBEIRO, R. A., ORMEÑO-ORRILLO, E., MELO, I. S., MARTÍNEZ-ROMERO, E., & HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3342-3351, 2013.
- 35.DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; & HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 698-710, 2012.
- 36.DE MEYER, S. E., CNOCKAERT, M., ARDLEY, J. K., VAN WYK, B. E., VANDAMME, P. A., & HOWIESON, J. G. (2014). *Burkholderia dilworthii* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1090-1095, 2014.
- 37.DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature**, v. 02, p. 621-631, 2004.
- 38.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*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 2016.
- 39.DOS SANTOS, P. C.; FANG, Z.; MASON, S. W.; SETUBAL, J. C., & DIXON, R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1, 2012.
- 40.DOWNIE, J. A. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. **Current biology**, v. 15, n. 6, p. R196-R198, 2005.
- 41.DOYLE, J. J. Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 11, p. 1289-1295, 2011
- 42.EADY, R. R. Methods for studying nitrogenase. **Methods for evaluating biological nitrogen fixation/edited by FJ Bergersen**, 1980.
- 43.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.
- 44.Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the

- 45.FERGUSON, B.; LIN, M. H.; & GRESSHOFF, P. M. Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 3, p. e23426, 2013.

- 46.GALLI-TERASAWA, L. V.; GLIENKE-BLANCO, C.; HUNGRIA, M. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 933-939, 2003.

- 47.GAO, Z. Q.; ZHAO, D. Y.; XU, L.; ZHAO, R. T.; CHEN, M.; & ZHANG, C. Z. *Paraburkholderia* caffeinitolerans sp. nov., a caffeine degrading species isolated from a tea plantation soil sample. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, n. 11, p. 1475-1482, 2016.

- 48.GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENYE, T.; FEIL, E.J.;STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.;SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 733-739, 2005.

- 49.GIRAUD, E.; MOULIN, L.; VALLENET, D.; BARBE, V.; CYTRYN, E.; AVARRE, J. C.; & BENA, G. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic *bradyrhizobia*. **Science**, v. 316, n. 5829, p. 1307-1312, 2007.

- 50.GNAT, S.; MAŁEK, W.; OLEŃSKA, E.; WDOWIAK-WRÓBEL, S.; KALITA, M.; ŁOTOCKA, B.; & WÓJCIK, M. Phylogeny of Symbiotic

- Genes and the Symbiotic Properties of Rhizobia Specific to *Astragalus glycyphyllos* L. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0141504, 2015.
51. GUPTA, A.; SHARMA, V. K. Using the taxon-specific genes for the taxonomic classification of bacterial genomes. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1, 2015.
52. GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A. M.; MOULIN, L.; CHEN, W. M.; ELLIOTT, G. N.; BONTEMPS, C.; ESTRADA, P. L. S.; GROSS, E.; DOS DOS REIS JR., F. B.; SPRENTE, J. I.; JAMES, E. K. & YOUNG, J. P. W. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 11, p. 1276-1288, 2011.
53. HALL, T. A. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**. p. 95-98, 1999.
54. HANAGE, W. P.; FRASER, C.; SPRATT, B. G. Sequences, sequence clusters and bacterial species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1475, p. 1917-1927, 2006.
55. HEDGES, S. B.. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 366-369, 1992.

56. HUG, L.A.; BAKER, B.J.; ANANTHARAMAN, K.; BROWN, C.T.; PROBST, A.J.; CASTELLE, C.J.; BUTTERFIELD, C.N.; HERNSDORF, A.W.; AMANO, Y.; ISE, K. A new view of the tree of life. **Nature Microbiology**, v. 1, p. 16048, 2016.
57. HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P. & BANGEL, E. V. Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR. (Embrapa Soja. **Comunicado Técnico**, 79). Londrina: Embrapa Soja, p.12, 2008.
58. HUNGRIA, M.; SILVA, K. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2011.
59. JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist**, v. 11, p. 37–50, 1912.
60. JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W.; TAGA, M. E.; & WALKER, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 619-633, 2007.
61. KAMST, E.; PILLING, J.; RAAMSDONK, L. M.; LUGTENBERG, B. J.; & SPAINK, H. P.; KAMST, E. *Rhizobium* nodulation protein *NodC* is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in

- Nod* factor biosynthesis. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 7, p. 2103-2108, 1997.
62. KASCHUK, G., ALBERTON, O., & HUNGRIA, M. Quantifying effects of different agricultural land uses on soil microbial biomass and activity in Brazilian biomes: inferences to improve soil quality. **Plant and soil**, v. 338, n. 1-2, p. 467-481, 2011.
63. 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. **Applied Soil Ecology**, v. 32, n. 2, p. 210-220, 2006.
64. KENNEDY, C.; DEAN, D.. The *nifU*, *nifS* and *nifV* gene products are required for activity of all three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 231, n. 3, p. 494-498, 1992.
65. 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
66. KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A. & PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance

- and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 459-493, 2004.
- 67.KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v. 5, n. 4, p. 408-418, 1995.
- 68.KONSTANTINIDIS, K. T.; STACKEBRANDT, E. Defining taxonomic ranks. In: The prokaryotes. **The prokaryotes**. Springer Berlin Heidelberg, p. 229-254, 2013.
- 69.KOST, T., STOPNISEK, N., AGNOLI, K., EBERL, L., & WEISSKOPF, L. Oxalotrophy, a widespread trait of plant-associated *Burkholderia* species, is involved in successful root colonization of lupin and maize by *Burkholderia phytofirmans*. **Frontiers in Microbiology**, 2013.
- 70.KUNITO, T.; OWAKI, M.; IHYO, Y.; SUMI, H.; TODA, H.; FUKUDA, D.; & PARK, H. D. Genera *Burkholderia* and *Lipomyces* are predominant aluminum-resistant microorganisms isolated from acidic forest soils using cycloheximide-amended growth media. **Annals of microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1339-1344, 2012.
- 71.LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; & AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic

- relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 981-993, 2001.
72. LANGILLE, M. G.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J. G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J. A.; & BEIKO, R. G. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814-821, 2013.
73. LAUBER, C. L., STRICKLAND, M. S., BRADFORD, M. A., & FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2407-2415, 2008.
74. LEWIS, G. P. New Insights into the Systematics and Biology of Brazilian Leguminosae (Fabaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 177:1-2, 2016.
75. LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, **Kew, UK**, 2005.
76. LINDSTRÖM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: The case of rhizobia. **Research in microbiology**, v. 161, n. 6, p. 453-463, 2010.
77. LINNEAUS, C. Mimosa. In *Species plantarum* (C. Linnaeus, org). Impensis Laurentii Salvii, p. 516-523, 1753.

- 78.LIU, X.; WEI, S.; WANG, F.; JAMES, E. K.; GUO, X.; ZAGAR, C.;
XIA, L. G.; DONG, X. & WANG, Y. P. *Burkholderia* and *Cupriavidus*
spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in southern
China. **FEMS microbiology ecology**, v. 80, n. 2, p. 417-426, 2012.
- 79.LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive
DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of bacteriology**,
v. 174, n. 14, p. 4525, 1992.
- 80.LV, Y. Y., Chen, M. H., Xia, F., Wang, J., & Qiu, L. H.
Paraburkholderia pallidirosea sp. nov., isolated from the monsoon
evergreen broad-leaved forest soil. **International Journal of
Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2016.
- 81.MAACK, R. Notas preliminares sobre clima, solo e vegetação do
Estado do Paraná. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. v. 2, p.
102-200, 1948.
- 82.MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo:
Agronômica Ceres, p. 126-192, 2006.
- 83.MASSON-BOIVIN, C.; GIRAUD, E.; PERRET, X.; & BATUT, J.
Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many
rhizobium recipes?. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 10, p. 458-
466, 2009.
- 84.MENNA P. Taxonomia e diversidade genética de rizóbios
microsimbiontes de distintas leguminosas com base na análise
polifásica (BOX-PCR e 16S RNAr) e na metodologia de MLSA. 100f.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

85. MENNA, P., HUNGRIA, M., BARCELLOS, F.G., BANGEL, E.V., HESS, P.N., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315-332, 2006.
86. MENNA, P., PEREIRA, A. A., BANGEL, E. V., & HUNGRIA, M. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, v. 48, n. 1, p. 120-130, 2009.
87. MIATTO, R. C.; WRIGHT, I. J.; & BATALHA, M. A. Relationships between soil nutrient status and nutrient-related leaf traits in Brazilian cerrado and seasonal forest communities. **Plant and Soil**, p.1-21, 2016.
88. *Mimosa* in: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB78908>>. Acesso em: 27 Out. 2016
89. MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; & DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-100, 2010.

90. MORGANTE, P. G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio.** Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/3319817/Fixacao-Biologica-e-Assimilacao-de-Nitrogenio>, 2003>. Acesso em: 17 jun 2015.
91. MORO, R. S.; & CARMO, M. R. B. D. A vegetação campestre nos Campos Gerais. Patrimônio natural dos Campos Gerais do Paraná. Ponta Grossa, Brasil. **Editora UEPG**, p. 93-98, 2007.
92. 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.
93. 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.
94. MUS, F., CROOK, M. B., GARCIA, K., COSTAS, A. G., GEDDES, B. A., KOURI, E. D., PARAMASIVAN, P., RYU, M.H., OLDROY, G. E. D., POOLE, P.S., UDVARDI, M. K.; VOIGT, C. A., ANÉ, J.M.; PETERS, J.W. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3698-3710, 2016.

95. MYERS, N., R. A.; MITTERMEIER, C.G.; MITTERMEIER, G. A. B.; DA FONSECA & Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
96. NCBI, Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D6, 2015.
97. OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Rev Microbiol.** v.11, p. 252-263, 2013.
98. OLDROYD, G. E.; MURRAY, J. D.; POOLE, P. S.; & DOWNIE, J. A.; GILES E. D. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annual review of genetics**, v. 45, p. 119-144, 2011.
99. OLDROYD, G.E.D.; DOWNIE, J. A.. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 7, p. 566-576, 2004.
100. OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **The FASEB journal**, v. 7, n. 1, p. 113-123, 1993.
101. OTT, T.; VAN DONGEN, J. T.; GU, C.; KRUSSELL, L.; DESBROSSES, G.; VIGEOLAS, H.; & UDVARDI, M. K. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. **Current biology**, v. 15, n. 6, p. 531-535, 2005.

102. OVERBECK G.E., MÜLLER S.C., FIDELIS A., PFADENHAUER J., PILLAR V.D., BLANCO C.C., BOLDRINI I.I., BOTH R. & FORNECK E.D.. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. **Plant Ecology, Evolution and Systematics** v.9, p.101-116, 2007.

103. PATRIMÔNIO NATURAL DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ - **UEPG** - 2003.
Disponível em: <<http://www.uepg.br/natural/relatoriofinal.pdf>> Acesso em: 20/11/2014

104. PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; & BEDMAR, E. J. Bacterial associations with legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 17-42, 2015.

105. PÉREZ-PANTOJA, D., DONOSO, R., AGULLÓ, L., CÓRDOVA, M., SEEGER, M., PIEPER, D. H., & GONZÁLEZ, B. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 5, p. 1091-1117, 2012.

106. 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.

107. RAYMOND, J. L.; STAPLES, C. R. & BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

108. 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**. v. 186, l. 4, p. 934–946, 2010.
109. 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.
110. RIBEIRO, M. C., METZGER, J. P., MARTENSEN, A. C., PONZONI, F. J., & HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.
111. RIBEIRO, R.A., BARCELOS, F.G., THOMPSON, F.L., HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v. 160, n.4, p.297-306, 2009.
112. RITTER, L. M. O.; RIBEIRO, M. C.; & MORO, R. S. Composição florística e fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos

Campos Gerais, PR, Brasil-limite austral do bioma. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 379-414, 2010.

113. ROGEL, M. A.; ORMENO-ORRILLO, E. ; ROMERO, E. M.. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 96-104, 2011.
114. ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.
115. ROUSK, J.; BÅÅTH, E.; BROOKES, P. C.; LAUBER, C. L.; LOZUPONE, C. J.; CAPORASO, G.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME journal**, v. 4, n. 10, p. 1340-1351, 2010.
116. 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.
117. SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review of Genetics**, v.32, p.33-57, 1998.

118. SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 701, 2009.
119. SHEU, S. Y.; CHOU, J. H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; GROSS, E.; DOS REIS J. F. B.; & YOUNG, J. P. W. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, p. 435-441, 2013.
120. SIMON, M. F., GREETHER, R., DE QUEIROZ, L. P., SÄRKINEN, T. E., DUTRA, V. F., & HUGHES, C. E. The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 7, p. 1201-1221, 2011.
121. SIMON, M. F.; PROENÇA, C. Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism?. **Biological conservation**, v. 96, n. 3, p. 279-296, 2000.
122. SMÝKAL, P., COYNE, C. J., AMBROSE, M. J., MAXTED, N., SCHAEFER, H., BLAIR, M. W., GREENE, S. L.; NELSON, M. N.; BESHARAT, N.;... & VYMYSLICKÝ, T. Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 43-104, 2015.

123. SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.** 1973.
124. SNEATH, P. H. A. International code nomenclature of Bacteria (1900 revision), **Washington: American Society for Microbiology**, 1992.
125. SPILKER, T., BALDWIN, A., BUMFORD, A., DOWSON, C. G., MAHENTHIRALINGAM, E. & LIPUMA, J. J. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2607-2610, 2009.
126. SPRENT, J. Legume nodulation. **John Wiley & Sons**, 2009.
127. STACKEBRANDT, E.; EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiology today**, v. 33, n. 4, p. 152, 2006.
128. STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P.A.D.; KÄMPFER, P.; MAIDEN, M.C.J.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; SWINGS, J. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p.1043-1047, 2002.
129. STALEY, J. T. The bacterial species dilemma and the genomic–phylogenetic species concept. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1475, p. 1899-1909, 2006.

130. STOPNISEK, N., BODENHAUSEN, N., FREY, B., FIERER, N., EBERL, L., & WEISSKOPF, L. Genus-wide acid tolerance accounts for the biogeographical distribution of soil Burkholderia populations. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1503-1512, 2014.
131. STRALIOTTO, R. Aplicação e evolução dos métodos moleculares no estudo da biodiversidade do rizóbio. **Processos biológicos no sistema solo-planta. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica**, p. 281-322, 2005.
132. SY, A., GIRAUD, E., JOURAND, P., GARCIA, N., WILLEMS, A., De LAJUDIE, P., ... & DREYFUS, B. Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 214-220, 2001.
133. TACÃO, M.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M. J.; & CORREIA, A. BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 88, p. 173-179, 2005.
134. TAMASHIRO, J.Y.; & ESCOBAR, N.A.G.E. (coord.). *Mimosoideae* In: TOZZI, A.M.G.A.; MELHEM, T.S.; FORERO, E.; FORTUNA-PEREZ, A.P.; WANDERLEY, M.G.L.; MARTINS, S.E.; ROMANINI, R.P.; PIRANI, J.R.; FIUZA DE MELO, M.M.R.; KIRIZAWA, M.; YANO, O.; CORDEIRO, I. (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 8, p. 84-166, 2016.
Disponível em: http://botanica.sp.gov.br/files/2016/06/FFESP-Volume-III_06_24.pdf

135. TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. **Molecular biology and evolution**, v. 9, n. 4, p. 678-687, 1992.
136. TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., & KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
137. TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees, **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.
138. TATE III, R. L. **Soil microbiology**. John Wiley and Sons, 1995.
139. THOMPSON, C.; CHIMETTO, L.; EDWARDS, R. A.; SWINGS, J.; STACKEBRANDT, E.; & THOMPSON, F. L. Microbial genomic taxonomy. **BMC genomics**. v. 14, p.1, 2013.
140. THOMPSON, F. L.; GEVERS, D.; THOMPSON, C. C.; DAWYNDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B.; & SWINGS, J. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Applied and environmental microbiology**. v. 71, p. 5107-5115, 2005.
141. UEPG - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Caracterização do Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná. Ponta Grossa:

UEPG: Relatório de Pesquisa, 239p, 2003. Disponível em: <http://www.uepg.br/natural>

142. VAN RHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J. The Rhizobium-plant symbiosis. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 124-142, 1995.
143. VANDAMME, P. POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K., & SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**. v. 60, p. 40-438, 1996.
144. VANDAMME, P., GORIS, J., CHEN, W. M., DE VOS, P., & WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 507-512, 2002.
145. VANDAMME, P; COENYE, T.. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2285-2289, 2004.
146. VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J., & LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.
147. VIANI, R. A., RODRIGUES, R. R., DAWSON, T. E., LAMBERS, H., & OLIVEIRA, R. S. Soil pH accounts for differences in species distribution and leaf nutrient concentrations of Brazilian woodland

- savannah and seasonally dry forest species. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 16, n. 2, p. 64-74, 2014.
148. VINCENT J.M. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. **Oxford: Blackwell Scientific**, 1970.
149. WALKER, R.; AGAPAKIS, C. M.; WATKIN, E.; & HIRSCH, A. M. Symbiotic Nitrogen Fixation in Legumes: Perspectives on the Diversity and Evolution of Nodulation by *Rhizobium* and *Burkholderia* Species. **Biological Nitrogen Fixation**, p. 913-925, 2015.
150. WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, P.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRÜPER, H. G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 463-464, 1987.
151. WEISBURG, M.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A., Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p. 697-703, 1991.
152. WILLEMS, A. THE TAXONOMY OF RHIZOBIA: AN OVERVIEW. **PLANT AND SOIL**, v. 287, n. 1-2, p. 3-14, 2006.
153. WILLIAMS, P. H. Mapping variations in the strength and breadth of biogeographic transition zones using species turnover. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v.263, p. 579-588, 1996.

154. WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.
155. WOESE, C.R., KANDLER, O., WHEELIS, M.L. Evolution Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 87, p. 4576-4579, 1990.
156. 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.
157. ZHALNINA, K., DIAS, R., DE QUADROS, P. D., DAVIS-RICHARDSON, A., CAMARGO, F. A., CLARK, I. M., MACGRATH, S. P. & TRIPLETT, E. W. Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. **Microbial ecology**, v. 69, n. 2, p. 395-406, 2015.
158. ZHANG, X.X., TURNER, S. L., GUO, X.W., YANG, H.-J., DEBELLÉ, F., YANG, G.-P., LI, F.-D. The common nodulation genes of *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2988-2995, 2000..
159. ZIEGLER, D.; POTHIER, J. F., ARDLEY, J., FOSSOU, R. K., PFLÜGER, V., DE MEYER, S.; VOGEL, G; TONOLLA, M.;

HOWIESON, J.; REEVE, W. & Perret, X. Ribosomal protein biomarkers provide root nodule bacterial identification by MALDI-TOF MS. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5547-5562, 2015.

8 Material suplementar

Material suplementar S1 - Análises químicas e físicas dos solos das áreas de amostragem de *M. gymnas* nodulíferas. As coordenadas geográficas das áreas de coleta 1, 2 e 3 encontram-se descritas no item 5.1.

Análises químicas				
Atributo	Unidade	Área 1	Área 2	Área 3
pH em CaCl ₂		3,6	3,6	3,8
H + Al	cmolc/dm ³	10,45	10,45	9,01
Al trocável	cmolc/dm ³	2,1	2,4	1,7
Ca trocável	cmolc/dm ³	0,3	0,2	0,2
Mg trocável	cmolc/dm ³	0,2	0,1	0,1
K trocável	cmolc/dm ³	0,08	0,07	0,06
P	mg/dm ³	1,0	1,8	0,5
C-orgânico	g/dm ³	23	30	24
CTC a pH 7,0	cmolc/dm ³	11,03	10,82	9,37
CTC efetiva	cmolc/dm ³	2,68	2,77	2,06
Sat. por bases (V)	%	5,3	3,4	3,8
Sat. por Al (m)	%	78,4	86,6	82,5
Sat. por Ca	%	2,7	1,8	2,1
Sat por Mg	%	1,8	0,9	1,1
Sat. por K	%	0,7	0,6	0,6
Relação Ca/Mg		1,5	2,0	2,0
Relação Ca + Mg/K		6,3	4,3	5,0
Relação Ca + Mg/K		6,3	4,3	5,0
Análises físicas				
Areia	(g kg ⁻¹)	825	863	902
Argila	(g kg ⁻¹)	80	77	58
Silte	(g kg ⁻¹)	95	60	40

H + Al = Solução tampão SMP; Al Ca e Mh trocáveis = KCl 1 mol/L; P e K = Mehlich-1 e C-orgânico = Walkey-Black

Material Suplementar S2 – Características morfofisiológicas das colônias de rizóbios isolados de *M. gymnas*. As coordenadas geográficas das áreas de coleta 1, 2 e 3 encontram-se descritas no item 5.1.

Isolado (CNPSO)	Área de coleta	Crescimento ¹	Diâmetro 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
2994	2	Rápido	1,15	Ácido	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Escassa	Gomosa	Opaco	Creme	Levemente rosa
2995	3	Rápido	2,8	Neutro	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Escassa	Gomosa	Opaco	Branco	Levemente rosado
3010	3	Rápido	1,8	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Rugosa	Escassa	Gomosa	Opaco	Creme	Rosa
2997	3	Rápido	0,6	Ácido	Puntiforme	Convexo	Inteira	Lisa	Pouca	Viscosa	Opaco	Branco	Branco
3032	3	Rápido	1,8	Ácido	Circular	Convexo	Lobada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaco	Branco	Branco
3035	3	Rápido	0,9	Ácido	Puntiforme	Convexo	Inteira	Lisa	Moderada	Viscosa	Opaco	Branco	Branco
3186	3	Rápido	1,1	Ácido	Circular	Convexo	Denteada	Rugosa	Moderada	Viscosa	Opaco	Branco	Levemente rosado
2998	1	Intermediária	1,9	Ácido	Circular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Pouca	Viscosa	Opaco	Branco	Levemente rosado
2999	1	Rápido	1,5	Ácido	Circular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Escassa	Viscosa	Opaco	Branco	Levemente rosado
3011	1	Rápido	2,5	Ácido	Circular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Moderada	Gomosa	Opaco	Branco	Levemente rosado
3019	1	Rápido	2	Ácido	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Moderada	Viscosa	Opaco	Branco	Levemente rosado
3003	2	Rápido	1,7	Ácido	Circular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Pouca	Viscosa	Opaco	Creme	Rosa
3015	2	Rápido	2,2	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Lisa	Moderada	Viscosa	Opaco	Creme	Rosa
3009	2	Rápido	1,8	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Lisa	Pouca	Viscosa	Opaco	Branco	Levemente rosado
3005	2	Lento	3	Ácido	Circular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaco	Branco	Rosa

3016	2	Lento	1,8	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Rugosa	Pouca	Butírica	Opaco	Amarelo	Rosa
3006	3	Intermediária	2,8	Ácido	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Moderada	Gomosa	Opaco	Creme	Rosa
3008	2	Intermediária	2,4	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Lisa	Moderada	Gomosa	Opaco	Amarelo	Rosa
3017	2	Lento	3	Ácido	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Pouca	Seca	Opaco	Creme	Levemente rosado
3021	2	Lento	1	Ácido	Irregular	Lenticular	Inteira	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaco	Creme	Rosa
3023	2	Intermediária	1,75	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Lisa	Pouca	Butírica	Opaco	Amarelo	Rosa
3187	2	Intermediária	2,51	Ácido	Circular	Lenticular	Ondulada	Rugosa	Pouca	Gomosa	Opaco	Branco	Rosa
3241	1	Intermediária	2	Ácido	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaco	Branco	Rosa
3242	1	Intermediária	3	Ácido	Circular	Plana	Lobada	Rugosa	Pouca	Gomosa	Opaco	Creme	Rosa
3244	1	Intermediária	2	Ácido	Circular	Plana	Lobada	Rugosa	Pouca	Gomosa	Opaco	Creme	Levemente rosado
3245	1	Intermediária	1,5	Ácido	Circular	Plana	Lobada	Rugosa	Pouca	Gomosa	Opaco	Creme	Rosa
3246	1	Intermediária	2	Ácido	Circular	Plana	Ondulada	Rugosa	Pouca	Gomosa	Opaco	Creme	Rosa
3247	1	Intermediária	2	Ácido	Circular	Plana	Inteira	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaco	Creme	Branco
3248	3	Intermediária	2	Ácido	Circular	Plana	Denteada	Rugosa	Pouca	Gomosa	Opaco	Creme	Avermelhado

¹Rápido: até 3 dias; Intermediária: de 4 a 5 dias; Lento: 6 de 9 dias

²BTB: azul de bromotimol

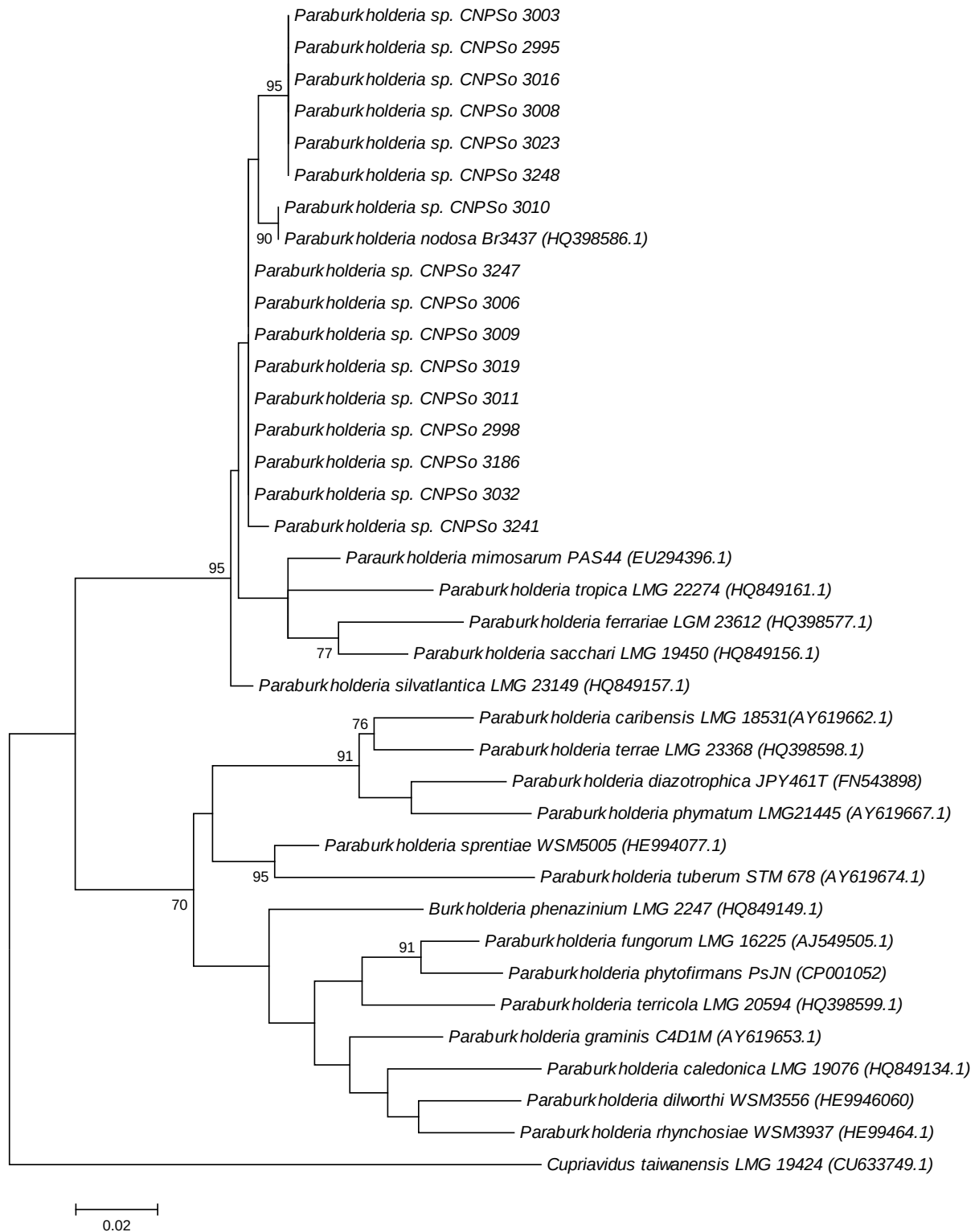
³VC: vermelho congo

Material suplementar S3 –Identidade nucleotídica (em percentual) entre as sequências parciais do gene 16S DNAr de *P. nodosa* Br3437^T e do gene de nodulação *nodC* de *P. nodosa* Br3470* com os rizóbios isolados de nódulos radiculares de *M. gymnas*.

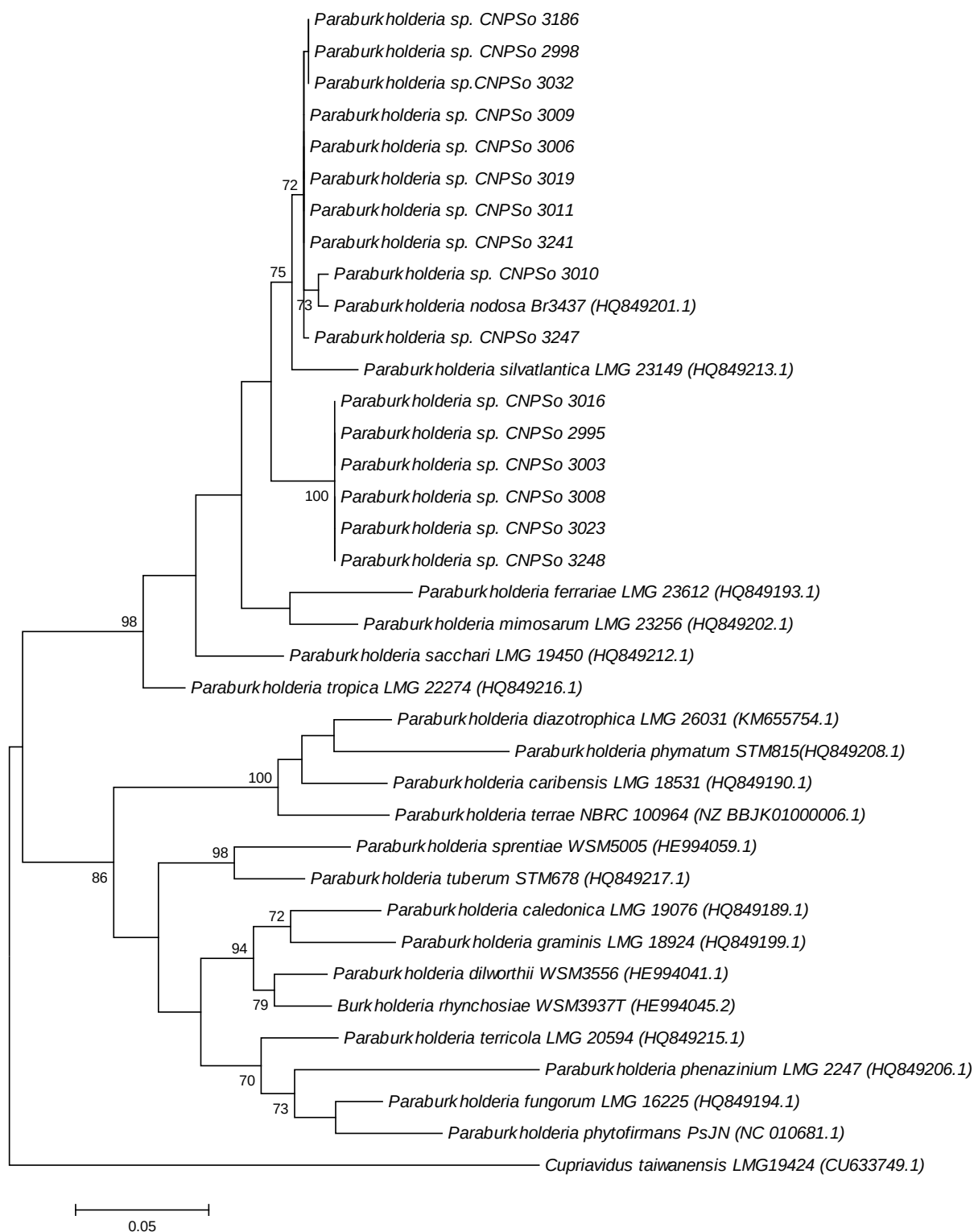
Estirpes isoladas de <i>M. gymnas</i>	16S DNAr	<i>nodC</i>
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3032	96,9	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3035	97,1	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3187	97,2	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo2995	96,9	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo2997	97	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo2998	97,1	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo2999	97	96,9
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3003	97	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3005	96,9	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3006	97,3	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3008	96,9	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3009	97,2	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3010	97,6	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3011	98	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3015	97,1	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3016	97	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3017	96,9	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3019	97,3	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3021	97	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3023	96,9	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3186	97,1	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3241	97	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3248	96,9	97,2
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo3247	97,2	97,2

*A sequência do gene *nodC* da estirpe tipo de *P. nodosa* não está depositada em bancos de dados, sendo substituída pela sequência correspondente da estirpe Br3470.

Material suplementar S4 - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene *recA* de isolados de nódulos de *M. gymnas* (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura-Nei com 1000 repetições) utilizando o software Mega 6.06.



Material suplementar S5 - Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene *gyrB* de isolados de nódulos de *M. gymnas* (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura-Nei com 1000 repetições) utilizando o software Mega 6.06.



Material suplementar S6 - Identidade nucleotídica em percentual dos genes *recA*, *gyrB* e sequências concatenadas *recA-gyrB* entre a estirpe *P. nodosa* Br3437^T e rizóbios isolados de nódulos de *M. gymnas*.

<i>Isolados de M. gymnas</i>	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA + gyrB</i>
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 2995	98,5	95,5	97
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 2998	99,2	98,9	99
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3003	98,5	95,5	97
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3006	99,2	99,1	99,1
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3008	98,5	95,5	97
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3009	99,2	99,1	99,1
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3010	99,8	99,2	99,5
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3011	99,2	99,1	99,1
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3016	98,5	95,5	97
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3019	99,2	99,1	99,1
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3023	98,5	95,5	97
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3032	99,2	98,9	99
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3186	99,2	98,9	99
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3241	99	99,1	98,9
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3247	99,2	98,9	99
<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPSo 3248	98,5	95,5	97