

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

VANESSA JANONI BOTELHO DE FREITAS DO NASCIMENTO

**OCORRÊNCIA DE *Mimosa micropteris* (Benth.) NODULÍFERAS NATIVAS NOS
CAMPOS GERAIS (PARANÁ-BRASIL) E DIVERSIDADE GENÉTICA DE SEUS
MICROSSIMBIONTES**

PONTA GROSSA

2017

VANESSA JANONI BOTELHO DE FREITAS DO NASCIMENTO

**OCORRÊNCIA DE *Mimosa micropteris* (Benth.) NODULÍFERAS NATIVAS NOS
CAMPOS GERAIS (PARANÁ-BRASIL) E DIVERSIDADE GENÉTICA DE SEUS
MICROSSIMBIONTES 2016-2017**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na
Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de Biologia
Evolutiva

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

PONTA GROSSA

2017

N244

Nascimento, Vanessa Janoni Botelho de Freitas do
Ocorrência de mimosa micropteris (Benth) nodulíferas nativas nos
Campos Gerais (Paraná-Brasil) e diversidade genética de seus microssimbiontes
/ Vanessa Janoni Botelho de Freitas do Nascimento. Ponta Grossa, 2017.
55 f.

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

Orientadora: Profa. Dra. Jesiane S da Silva Batista.

1. Rhizobium. 2. Burkholderia. 3. Rizóbios. 4. Fixação biológica - nitrogênio.
I. Batista, Jesiane S da Silva. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia
Evolutiva. III.T.

CDD: 574

UEPG



PARANÁ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 06/2017

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 **Vanessa Janoni Botelho de Freitas do Nascimento**.

Aos vinte e três 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) **Vanessa Janoni Botelho de Freitas do Nascimento**, 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 Rebeca Fuzinato Dall'Agnol (UEL) e Dr^a Carolina Weigert Galvão (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Ocorrência de *Mimosa micropteris* (Benth.) Nodulíferas Nativas dos Campos Gerais (Paraná-Brasil) e Diversidade Genética de seus Microssimbiontes**". 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)

CORREÇÕES ENCAMINHADAS PELA BANCA

Alteração de Título: sim ☒ não ☐

Novo título: DIVERSIDADE GENÉTICA DE MICROSSIMBIONTES DE
Mimosa micropteris (BENTHAM) NODULÍFERAS NATIVAS DOS
CAMPOS GERAIS DO PARANÁ (BRASIL)

Ponta Grossa, 23 de fevereiro de dois mil e dezessete.

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

Prof^a Dr^a Rebeca Fuzinato Dall'Agnol (UEL)

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

AGRADECIMENTOS

À Capes, ao CNPq e a Fundação Araucária, pelo apoio financeiro

À minha família, Helena Aparecida, Marco Aurélio e Luciana, por todo apoio e fonte eterna de amor concedido em todas as situações. Agradeço a paciência, o cuidado, a compreensão de vocês, e principalmente a confiança que sempre tiveram comigo. Vocês foram e sempre serão a razão de tudo!

Por mais estranho que pareça, agradeço as minhas “filhas do coração” Tata e Chamu, por todo o carinho, todo o amor, e principalmente pela companhia durante as madrugadas em claro.

Agradeço também à uma das melhores pessoas que conheci em minha vida, minha avó Iolanda, que foi quem mais se orgulhou pela minha vida acadêmica chegar onde chegou, e sempre enfatizava em dizer que o estudo era o que havia de mais importante, e que eu e minha irmã seríamos as únicas netas a dar o orgulho de nunca deixar de estudar. No ano de 2016, ela se juntou ao meu avó João no reino dos céus, e todo o esforço nessa reta final foi por ela, em agradecimento e retribuição aos 24 anos de puro amor, cuidado e dedicação que ela sempre teve não só comigo, mas com todos os netos.

Agradeço aos meus amigos de bancada Fabiane, Milena, Ana, Pablo, Leandro, Adriane, Géssica e Stephane por toda a ajuda, todo apoio, pela amizade e parceria ao longo desses anos.

Agradeço a minha orientadora, amiga e mãe Dr^a Jesiane Batista, por me aceitar em seu laboratório, depositar sua confiança em mim, me auxiliar em todos os momentos e me orientar da melhor forma possível. Tenho plena consciência de todas as noites mal dormidas que te proporcionei no processo de correção da dissertação e pelos “estragos” que acidentalmente cometi no laboratório. Obrigada pela paciência que teve comigo não somente nesses momentos, mas em todos os momentos que estivemos juntas. Você me auxiliou na minha vida acadêmica e muito mais na minha vida pessoal, e se estou defendendo esse título hoje, foi por você! Sempre me espelharei na profissional e pessoa maravilhosa que você é, obrigada por tudo.

Agradeço à Embrapa-Soja pelo suporte concedido ao longo da pesquisa.

Agradeço ao programa PPG em Biologia Evolutiva, pela oportunidade e pela estrutura para poder realizar esse trabalho.

Aos professores Dr. Roberto Artoni e Dr^a Carolina Galvão, pelas contribuições como membros de banca examinadora, por todo o conhecido transmitido e pela amizade de sempre.

Agradeço a banca examinadora, pela disposição e pelas contribuições concedidas.

Agradeço à UEPG pela estrutura concedida.

Agradeço à todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

**“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo. Mas qualquer um pode
recomeçar e fazer um novo fim. “**

Chico Xavier

RESUMO

Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas e possui ampla diversidade e distribuição geográfica. Em levantamentos da diversidade florística do Parque Estadual de Vila Velha (Ponta Grossa-PR) relatou-se a ocorrência de várias espécies da subfamília Mimosoidae, dentre as quais *Mimosa micropteris* Benth. O presente estudo apresenta a primeira descrição de nódulos radiculares em *M. micropteris*, bem como a descrição da diversidade fenotípica e genética de seus microssimbiontes. As análises físico-químicas evidenciam que os solos das áreas de amostragem são arenosos, ácidos e pobre em nutrientes. Dezoito isolados foram obtidos de nódulos radiculares de plantas nativas, coletadas de maio a outubro de 2015. Mediante cultivo dos isolados em meio YMA foi constatado que todos provocaram acidificação do meio, taxa de crescimento intermediária e as colônias foram caracterizadas, na sua grande maioria, como viscosas. Os perfis genômicos obtidos por BOX-PCR revelaram a formação de quatro grupos, considerando um nível de similaridade de até 70%. O grupo A foi o mais representativo, agrupando seis dos isolados, seguido do grupo D, agrupando cinco isolados. As sequências parciais do gene 16S rDNA de estirpes selecionadas com base nos resultados de BOX-PCR indicaram similaridade de isolados de todos os grupos com *Paraburkholderia nodosa*, indicando a ocorrência de variabilidade intraespecífica dentre os rizóbios isolados. Tais dados corroboram as recentes constatações de que rizóbios pertencentes à classe betaproteobacteria são os principais microssimbiontes de plantas do gênero *Mimosa* na América do Sul e que são rizóbios mais ubíquos do que anteriormente considerados. Ainda, segundo os resultados de 16S rDNA, alfa-rizóbios também foi isolado, pertencentes aos gêneros *Rhizobium*. Apesar da diversidade observada quanto aos gêneros dos microssimbiontes, as sequências parciais dos genes *nodC* de todos os isolados analisados exibiram elevada similaridade entre si e com o gene *nodC* de estirpes de *Paraburkholderia* sp. Nossos resultados demonstram que *M. micropteris* é um modelo de estudo da interação planta-rizóbios, visto que são capazes de serem noduladas por membros de duas diferentes classes de Proteobacteria, provavelmente mediante transferência lateral de genes simbióticos. Além disso, corroboram com a teoria de que beta-rizóbios possuem competitividade potencializada frente à baixa disponibilidade de nutrientes e pH ácido do solo em relação a alfa-rizóbios.

Palavras-chave: *Rhizobium*, *Burkholderia*, rizóbios, fixação biológica de nitrogênio

ABSTRACT

Fabaceae is one of the major botanical families, recognized by its species diversity and wide geographical distribution. Floristic surveys performed in the State Park of Vila Velha (Ponta Grossa-PR) pointed out the occurrence of several species of the subfamily Mimosoidae, including *Mimosa micropteris* Benth. This study presents the first description of root nodules in *M. micropteris* and describes the diversity of their rhizobia. Soils of the sample areas were characterized as sandy, acid and low in organic matter. Eighteen strains were obtained from nodules of native plants; all of them are acid-producing in YMA medium, intermediate growers with viscous colonies. Considering a 70% of similarity cutoff, BOX-PCR fingerprint analysis divided the strains in four groups. Group A was the most representative, with six strains, followed by group D, with five strains. Phylogenetic analysis of partial 16S rDNA sequences revealed the relation of strains of all BOX-PCR groups with *Paraburkholderia nodosa*, indicating intraspecific variability between *M. micropteris* symbionts. Only one strain was classified as *Rhizobium* sp. This data corroborates the recent findings that beta-rhizobia are the preferential symbionts of *Mimosa* in South America. The *nodC* phylogeny grouped all the strains, including the one classified as *Rhizobium* sp., into a well-supported clade that not grouped any known strain of the *Paraburkholderia* genus. Our results demonstrate that *M. micropteris* can be nodulated both by alpha- and beta-rhizobia, probably due to lateral gene transfer of symbiotic genes. Also, the prevalence of beta-rhizobia corroborates the statement that their superior competitiveness abilities under particular edaphic conditions, as acid pH and low nutrient content.

Keywords: *Rhizobium*, *Burkholderia*, rhizobia, biological nitrogen fixation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ORGANOGÊNESE DO NÓDULO EM PLANTAS LEGUMINOSAS	14
FIGURA 2: EXSICATAS DE <i>M. MICROPTERIS</i> (BENTH) VAR. <i>MICROPTERIS</i> E <i>M. MICROPTERIS</i> VAR. <i>PUNGENS</i> (BURKART) BARNEBY.	19
FIGURA 3: LOCALIZAÇÃO DO PARQUE ESTADUAL DE VILA VELHA.....	22
FIGURA 4: (A) NÓDULOS RADICULARES DE PLANTAS NATIVAS NODULÍFERAS DE <i>M. MICROPTERIS</i> ; (B) SECÇÃO TRANSVERSAL DE NÓDULO RADICULAR, EVIDENCIANDO A PRESENÇA DE LEGHEMOGLOBINA E ATIVIDADE DO NÓDULO.	35
FIGURA 5: DENDROGRAMA BASEADO NOS PERFIS DE BOX-PCR DE ISOLADOS DE NÓDULOS DE <i>M. MICROPTERIS</i> (UPGMA E COEFICIENTE DE JACCARD, 3% DE TOLERÂNCIA) UTILIZANDO O SOFTWARE BIONUMERICS 7.0.	37
FIGURA 6: ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA EM SEQUENCIAS PARCIAIS DO GENE 16S DNAR DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE <i>M. MICROPTERIS</i> (MÁXIMA VEROSSEMELHANÇA, MODELO TAMURA-3-PARÂMETROS COM DISTRIBUIÇÃO G+I, 1000 REPETIÇÕES DE BOOTSTRAP), UTILIZANDO O SOFTWARE MEGA 6.06. AS SEQUÊNCIAS FORAM DEPOSITADAS NO GENBANK DO NCBI E OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO ENCONTRAM-SE ENTRE PARÊNTESE.....	39
FIGURA 7: : ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA EM SEQUENCIAS PARCIAIS DO GENE DE NODULAÇÃO <i>nodC</i> DE ISOLADOS DE NÓDULOS DE <i>M. MICROPTERIS</i> (MÁXIMA VEROSSEMELHANÇA, MODELO TAMURA-NEI COM 1000 REPETIÇÕES) UTILIZANDO O SOFTWARE MEGA 6.06.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO DA ÁREA DE COLETA DE <i>M. MICROPTERIS</i> NODULÍFERAS NO PARQUE ESTADUAL DE VILA VELHA (PONTA GROSSA-PR)	34
TABELA 2: CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DAS COLÔNIAS DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE NÓDULOS RADICULARES DE <i>M. MICROPTERIS</i>	36
TABELA 3: IDENTIDADE NUCLEOTÍDICA (EM PERCENTUAL) ENTRE AS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE 16S DNAR DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE NÓDULOS DE <i>M. MICROPTERIS</i> E ESTIPES TIPO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE BACTÉRIAS, UTILIZANDO O SOFTWARE BIOEDIT.....	39
TABELA 4: IDENTIDADE NUCLEOTÍDICA (EM PERCENTUAL) ENTRE AS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE NODC DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE NÓDULOS DE <i>M. MICROPTERIS</i> E EM COMPARAÇÃO COM ESTIPES DE DIFERENTES ESPÉCIES DE RIZÓBIOS.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
N	Nitrogênio
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information non redundant</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
YMA	<i>Yeast Extract Mannitol</i> ágar
YM	<i>Yeast Extract Mannitol</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	13
2.2	INTERAÇÃO RIZÓBIOS – LEGUMINOSA	14
2.3	TAXONOMIA DE RIZÓBIOS	16
2.4	A FAMÍLIA FABACEAE E A FBN.....	17
2.4.1	<i>O Gênero Mimosa</i>	<i>17</i>
2.5	O GÊNERO FABACEAE NOS CAMPOS GERAIS	19
2.6	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVO	21
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1	LOCAL DE AMOSTRAGEM	22
4.2	COLETA E ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO SOLO DAS ÁREAS DE AMOSTRAGEM.....	23
4.3	AMOSTRAGEM DAS PLANTAS NODULÍFERAS E ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS.....	23
4.4	ESTOCAGEM DE LINHAGENS BACTERIANAS	23
4.5	CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE RIZÓBIOS EM MEIO YM ...	24
4.6	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL	24
4.7	AMPLIFICAÇÃO DO DNA PARA A REAÇÃO DE BOX-PCR	24
4.8	AMPLIFICAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL 16S	25
4.9	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>nodC</i>	25
4.10	SEQUENCIAMENTO DOS GENES 16S DNAr e <i>nodC</i>	26
4.11	ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS E FILOGENÉTICAS	26
5	OCORRÊNCIA DE <i>Mimosa micropteris</i> (BENTHAN) NODULÍFERAS NATIVAS DOS CAMPOS GERAIS (PARANÁ-BRASIL) E DIVERSIDADE GENÉTICA DE SEUS MICROSSIMBIONTES	28
5.1	INTRODUÇÃO	30
5.2	MATERIAL E METODOS	31
5.2.1	<i>Local de Amostragem</i>	<i>31</i>
5.2.2	<i>Coleta e Análise Físico-Química do Solo das Áreas de Amostragem.....</i>	<i>32</i>
5.2.3	<i>Extração do DNA Total</i>	<i>32</i>
5.2.4	<i>Amplificação do DNA para a reação de BOX-PCR.....</i>	<i>32</i>
5.2.5	<i>Amplificação e Sequenciamento do Gene Ribossomal 16s rDNA e Gene de Nodulação <i>nodC</i>.....</i>	<i>32</i>

5.2.6	<i>Análise dos Dados Moleculares</i>	33
5.3	RESULTADOS	34
5.3.1	<i>Características Físico-Químicas da Área de Amostragem de M. micropteris nodulíferas</i> 34	
5.3.2	<i>Isolamento e Caracterização Morfofisiológica das Estirpes Isoladas de Nódulos de M. Micropteris</i>	35
5.3.3	<i>Variabilidade Genética dos Microsymbiontes de M. micropteris por BOX-PCR</i> 37	
5.3.4	<i>Interferência Taxonômica dos Isolados pela Filogenia do Gene 16S DNAr</i>	38
5.3.5	<i>Diversidade do gene de nodulação nodC</i>	40
5.4	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) constitui a principal via de incorporação do nitrogênio (N) à biosfera e, junto à fotossíntese, é considerada um dos mais importantes processos biológicos da biosfera. Consiste na redução enzimática do N_2 a amônia, posteriormente incorporada em compostos nitrogenados, processo realizado exclusivamente por um grupo de bactérias e arqueias denominadas diazotróficas. Os microrganismos diazotróficos estabelecem diferentes tipos de associação com espécies vegetais e, de acordo com tal associação, são classificados em: de vida livre, associativos e simbióticos.

Os microrganismos diazotróficos simbióticos são coletivamente denominados rizóbios e estabelecem relação simbiótica usualmente com plantas leguminosas (família Fabaceae), culminando na organogênese de estruturas radiculares denominadas nódulos, onde o processo de FBN é desencadeado.

Levantamentos florísticos em diferentes localidades e biomas do Brasil apontam a elevada abundância e riqueza de gêneros e espécies da família Fabaceae, com elevado grau de endemismo, inclusive em centros de conservação da biodiversidade dos Campos Gerais e em especial pertencentes ao gênero *Mimosa*. No entanto, a interação de tais plantas com rizóbios nativos das respectivas áreas ainda é pouco estudada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é um elemento químico abundante na atmosfera em sua forma molecular (N₂), essencial para o desenvolvimento de espécies vegetais por ser essencial constituinte de diversas biomoléculas como aminoácidos, proteínas, hormônios da clorofila, ácidos nucleicos dentre outros. Apesar de sua elevada disponibilidade na atmosfera, as plantas não conseguem incorporá-lo em suas biomoléculas, devido à estabilidade da tripla ligação presente entre os átomos de N (MOLIN; MOLIN, 1997; TREVORS, 1998; WALL, 1999; VIRGINIA, 1999; MORGANTE, 2003).

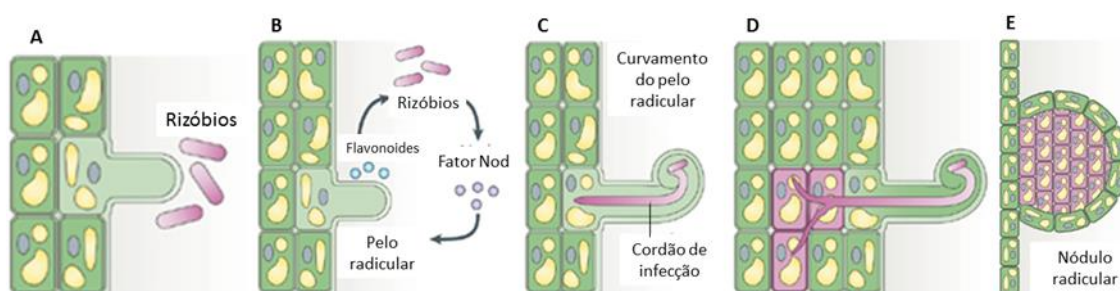
Um dos principais processos biológicos do ciclo biogeoquímico do N consiste na redução enzimática do N₂ a amônia (NH₃) denominado fixação biológica do Nitrogênio (FBN) (CURATII *et al.*, 2006). A capacidade de fixar biologicamente N₂ é um processo exclusivamente realizado por procariotos coletivamente denominados diazotróficos e deve-se à síntese de um complexo enzimático denominado dinitrogenase, formado por duas unidades proteicas: a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas capazes de transportar elétrons (HERNANDEZ *et al.*, 2008). Durante a reação de redução do N₂, a dinitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a ferridoxina a qual transfere um elétron para a unidade Fe-proteína que, então, reduzida, doa um elétron para a MoFe-proteína, que acumula os elétrons. O processo ocorre até que oito transferências de elétrons sejam acumuladas, possibilitando a redução completa do N₂ à NH₃. Estes oito elétrons são necessários porque, obrigatoriamente, também ocorre a redução de prótons (H⁺) a H₂ (RUBIO & LUDDEN, 2008). A reação final pode ser assim expressa: $N_2 + 8 e^- + 8 H^+ + 16 ATP \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$ (NUNES *et al.*, 2003). Outros três sistemas alternativos são conhecidos, contendo vanádio ou ferro em substituição ao molibdênio (VFe-proteína e FeFe-proteína, respectivamente), e um raro sistema dependente de monóxido de carbono (ZEHR *et al.*, 2003; HU; RIBBE, 2015).

Organismos diazotróficos são classificados em de vida livre, associativos e simbióticos, de acordo com o modelo de interação com espécies vegetais (OLIVARES *et al.*, 2013). Os microrganismos diazotróficos simbióticos são coletivamente denominados rizóbios.

2.2 INTERAÇÃO RIZÓBIOS – LEGUMINOSA

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, tanto naturais quanto agrícolas (LINDSTRÖM *et al.*, 2010). O sucesso de tal associação deve-se à organogênese de estruturas radiculares especializadas da planta hospedeira, denominadas nódulos, no interior dos quais é mantido um constante suprimento de carbono e regulação da 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; DEAKIN; BROUGHTON, 2009) (Figura 1).

Figura 1: Organogênese do nódulo em plantas leguminosas



Adaptado de: DEAKIN; BROUGHTON, 2009.

A nodulação é um processo complexo, que ocorre em várias etapas e envolve mudanças fisiológicas e morfológicas, tanto na célula hospedeira, quanto na bactéria. As alterações na bactéria visam, especialmente, o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP necessário para o processo da fixação biológica, enquanto as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (HUNGRIA *et al.*, 1994). Além disso, a baixa tensão de O₂ presente nesse microambiente, conferida especialmente pela leghemoglobina, é imprescindível para a FBN, visto que a enzima responsável pelo processo é rápida e permanentemente inativada pelo O₂. Se constata a formação da leghemoglobina por volta de duas semanas após a formação dos nódulos radiculares pela coloração interna rósea/vermelha do nódulo, indicando também a FBN (GALLON, 1981; ATLAS; BARTHA, 2002; CONN *et al.*, 2002; CÂMARA, 2014).

O estabelecimento da associação simbiótica entre rizóbios e a planta hospedeira inicia-se com a presença de rizóbios compatíveis na rizosfera da planta hospedeira (Figura 1A) e liberação de exsudatos radiculares pela leguminosa (Figura 1B).

Os exsudatos são secretados pelas raízes e sementes das plantas e são compostos por uma variedade de moléculas de baixo peso molecular e metabólitos secundários de composição variável de acordo com o genótipo e fenótipo vegetal (BAIS *et al.*, 2006; FAUVART; MICHIELS, 2008). Um de seus principais componentes, os flavonoides, agem como substâncias quimiotáticas, estimuladoras da multiplicação dos rizóbios e indutoras de genes de nodulação (genes *nod*, *nol* e *noe*) (MARTÍNEZ *et al.*, 1990; KRISHNAN *et al.*, 1995; LOPÉZ-LARA *et al.*, 1996; LONG, 1998;). Devido à complexidade bioquímica dos exsudados, a determinação exata de qual flavonoide é capaz de desencadear tais repostas em determinada espécie de rizóbio é complexa. De fato, é mais provável que o espectro de flavonoides exsudados, mais do que um flavonoide específico, seja capaz de determinar a especificidade hospedeira (HASSAN; MATHESIUS, 2012).

A indução dos genes de nodulação, em especial dos genes *nodABC*, desencadeia a síntese dos fatores de nodulação (fatores *Nod*, Figura 1B), que são oligossacarídeos lipoquitínicos secretados pelos rizóbios (BAIS *et al.*, 2006; DEAKIN; BROUGHTON, 2009).

Mediante reconhecimento pela planta hospedeira, os fatores *Nod* induzem diversas modificações no hospedeiro, como o curvamento dos pelos radiculares (Figura 1C), invaginação da parede celular e formação de um cordão de infecção no interior do pelo radicular (Figura 1C). 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 (Figura 1D) (DEAKIN; BROUGHTON, 2009).

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 N_2 ; assim, estabelece-se a formação de nódulos radiculares (Figura 1E). Essa interação simbiótica requer um alto grau de compatibilidade entre o rizóbio e a planta hospedeira, pois a sinalização molecular é altamente específica e coordenada (AGUILAR, *et al.*, 1988; ZAAT, *et al.*, 1989; SCHULTZE & KONDOROSI, 1998; OLDROYD & DOWNIE, 2008; DEAKIN & BROUGHTON, 2009; BORTOLAN *et al.*, 2009).

2.3 TAXONOMIA DE RIZÓBIOS

Tradicionalmente, os rizóbios encontram-se classificados como pertencentes a: Domínio: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Classe: Alfaproteobacteria. Bactérias capazes de nodular leguminosas pertencentes à classe Betaproteobacteria também foram identificadas anos depois. Alfa e Betaproteobacterias são também denominadas comumente de Alfarizóbios e Betarizóbios (CHEN *et al.* 2001; MOULIN *et al.*, 2001).⁴

WEIR (2016), baseando-se em dados do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) e o *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* – LPSN, descreve a existência atual de 98 espécies de rizóbios, distribuídas em 13 gêneros, sendo 11 pertencentes à classe Alfaproteobacteria (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Blastobacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Microvirga*, *Shinella*) e 2 pertencentes à classe Betaproteobacteria (*Cupriavidus*, *Burkholderia*).

Na primeira metade do século passado a taxonomia baseava-se em aspectos fenotípicos, contando com poucos recursos (morfologia da colônia, aspectos fisiológicos) levando erroneamente a uma grande definição de novas espécies (THOMPSON *et al.*, 2013). Atualmente, a taxonomia polifásica é aceita: nessa abordagem integram-se análises fenotípicas, genotípicas e filogenéticas para a classificação do organismo estudado (THOMPSON *et al.*, 2013).

A análise do gene 16S DNAr é a metodologia dominante de análise filogenética de procariotos e é amplamente utilizada em estudos taxonômicos, ecológicos e evolutivos, devido à alta conservação nas sequências nucleícas. As comparações entre sequências de nucleotídeos desse gene ribossomal integram estruturas essenciais à síntese proteica presentes nesses organismos, tratando-se de um gene universal, e portanto permite a identificação taxonômica em nível de gênero e têm sido amplamente utilizado para avaliar relações filogenéticas entre muitas espécies de rizóbios (JARVIS *et al.*, 1992; LAGUERRE *et al.*, 1993; LUCAS *et al.*, 1995; BERKUM *et al.*, 1996; BARRERA *et al.*, 1997; HARRIS *et al.*, 2003). Já dentre os métodos genotípicos, a tipagem molecular via amplificação de sequências repetitivas (repeats) do genoma permite a caracterização da variabilidade intraespecífica de estirpes (JUDD *et al.*, 1993; VINUESA *et al.*, 1998; BATISTA *et al.*, 2007; BARCELLOS *et al.*, 2015). 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). A espécie é a unidade básica da taxonomia bacteriana e é definida como um grupo de linhagens que compartilham 70% ou mais de similaridade genômica (WAYNE *et al.*, 1987; DELAMUTA *et al.*, 2013), além de 97% de similaridade nucleotídica no gene 16S rDNA (VANDAMME *et al.*, 1996).

2.4 A FAMÍLIA FABACEAE E A FBN

A família Fabaceae (=Leguminosae) constitui uma das maiores famílias de angiospermas, depois de Orchidaceae e Asteraceae com 800 gêneros e cerca de 20.000 espécies, distribuídas em três subfamílias: Faboideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae (LEWIS *et al.*, 2005).

Fabaceae apresenta uma distribuição ampla, está presente tanto nas florestas tropicais quanto desertos, planícies, regiões alpinas, com exceção das regiões árticas e antárticas, ainda, abrange uma ampla gama de formas de vida, desde ervas alpinas árticas e arbustos perenes até xerófitas anuais e árvores gigantes equatoriais (SOUZA; LORENZI, 2008; MARCHIORI, 2013). Os membros da família Fabaceae são caracterizados por possuir um fruto distinto denominado legume, que dá à família seu nome original (Leguminosae) e o nome usual (leguminosas) (SMÝKAL *et al.*, 2015).

A simbiose de leguminosas com rizóbios não possui valia apenas na agricultura, mas também desempenha um papel crucial nos ecossistemas naturais, por ser a principal forma de incorporação de nitrogênio nos ambientes terrestres (SMÝKAL *et al.*, 2015).

2.4.1 O Gênero *Mimosa*

O gênero *Mimosa*, pertencente à subfamília Mimosoideae, é um dos maiores gêneros da família Fabaceae com mais de 500 espécies representantes.

Suas espécies podem se desenvolver em diversos biomas (BARNEBY, 1991; LEWIS *et al.*, 2005), porém sua ocorrência predominante é em regiões neotropicais (cerca de 90% das espécies). O Brasil é uma das principais regiões quanto à diversidade de espécies e endemismo, sendo que um quarto das espécies já descritas do gênero encontram-se no bioma Cerrado (SIMON *et al.*, 2011).

O gênero apresenta-se de formas variadas, desde árvores com tronco único à arbustos espessos, subarbustos e ervas, podendo ser perene ou monocarpa. *Mimosas* arbustivas são em sua grande maioria oportunistas. Normalmente estão em agrupamentos onde existe forte competição por água, mas não por fonte de luz (BARNEBY, 1991; QUEIROZ, 2009).

Representantes do gênero *Mimosa* foram estudados por BENTHAM (1962) que levantou a ocorrência de 199 espécies de *Mimosa* no Brasil, e BARNEBY (1991) contribuiu com o levantamento de cerca de 330 espécies. Vários levantamentos florísticos apontaram a ocorrência do gênero em determinadas regiões, como Rio Grande do Sul com 42 espécies (RAMBO, 1966), Santa Catarina com 47 espécies, segundo BURKART (1979) e Bahia com 63 espécies segundo LEWIS (1987).

O gênero *Mimosa* é modelo de estudo de interação rizóbio-planta (ALLEN; ALLEN, 1981; SOUZA *et al.*, 1994; BARBERI *et al.*, 1998) por sua capacidade de estabelecer simbiose com vários gêneros/espécies de rizóbios. Rizóbios pertencentes à classe Betaproteobacteria são os simbiossiontes dominantes na América do Sul (LAMMEL *et al.*, 2015).

REIS Jr *et al.* (2010) realizaram uma extensa análise de diversidade de rizóbios simbiossiontes de plantas do gênero *Mimosa* provenientes de campos ruprestes de dois importantes biomas nacionais: a Caatinga e o Cerrado. Contando com muitas espécies endêmicas, os autores demonstraram ainda a importância de tal interação na incorporação de N em áreas consideradas frágeis.

Cabe salientar que várias espécies do gênero *Mimosa* são endêmicas do Brasil. Uma delas é a espécie *Mimosa micropteris* Benth (Figura 2), com ocorrência confirmada nas regiões Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná e Santa Catarina), associada a áreas de Campos Rupestres e Cerrados (DUTRA; MORIM, 2016). É uma planta arbustiva, com tamanho que varia entre 1-4 metros de altura com flores em capítulos globosos reunidos em racemos, e legumes comprimidos com valvas deiscentes, papiráceas, que não se desarticulam em segmentos subquadrados (BURKART, 1979). Contempla a existência de duas variedades: *M. micropteris* (Benth) var. *micropteris* e *M. micropteris* var. *pungens* (Burkart) Barneby [basinômio *M. regnelli* var. *pungens* (Burkart)] (DUTRA; MORIM, 2016).

Figura 2: Exsicatas de *M. micropteris* (Benth) var. *micropteris* e *M. micropteris* var. *pungens* (Burkart) Barneby.



Fonte: Re flora – Herbário Virtual (2016).

2.5 O GÊNERO FABACEAE NOS CAMPOS GERAIS

Os Campos Gerais foram definidos como unidade fitogeográfica natural correspondente à campos limpos de cerrados naturais e capões isolados de Floresta Ombrófila Mista (MAACK, 1948). Localizam-se na borda do segundo planalto paranaense, representado pela Escarpa Devoniana (que separa o primeiro planalto do segundo planalto), com extensão territorial de 11.761,41 km² (MELO *et al.* 2008) constituindo uma grande área de alta homogeneidade fisionômica (MORO; CARMO, 2007), possuindo características típicas com predominante cobertura herbácea. Caracterizam-se, ainda, pela ocorrência de solos com baixa taxa de nutrientes, solos rasos e arenosos (SILVA *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2008).

A região conta com várias unidades de conservação (UC), constituídas por remanescentes vegetacionais originais (TAKEDA *et al.*, 2001). Levantamentos florísticos realizados em tais UC usualmente descrevem a elevada riqueza e abundância de membros da família Fabaceae.

CERVI *et al.* (2007) desenvolveram um trabalho a respeito da vegetação encontrada no Parque Estadual de Vila Velha, e identificaram as seguintes formações no parque: savana gramíneo lenhosa (campo limpo/sujo), savana higrófila (campo úmido), refúgios vegetacionais rupestres (afloramentos de arenito), formações pioneiras de influência fluvial (várzea), floresta ombrófila mista montana (Floresta de Araucária) e floresta ombrófila mista aluvial (floresta ciliar). Esse trabalho identificou 126 famílias botânicas, estando a família Fabaceae entre as 10

famílias de maior riqueza com 72 espécies, e o grupo das Leguminosae reunindo 107 espécies compondo o terceiro grupo com maior número de espécies.

2.6 JUSTIFICATIVA

A região dos Campos Gerais, onde o Parque Estadual de Vila Velha (Ponta Grossa-Paraná) está inserido, possui uma grande diversidade de gêneros e espécies da família Fabaceae, em especial pertencentes ao gênero *Mimosa*. Esse gênero possui grande visibilidade como modelo de estudo da evolução da interação rizóbio-planta hospedeira por serem capazes de estabelecer simbiose com uma gama de rizóbios, pertencentes a táxons variados (BONTEMPS *et al.*, 2015).

O acesso à diversidade genética de rizóbios associados a espécies de leguminosas nativas endêmicas é um eficiente recurso na exploração e conhecimento dessa interação simbiótica, permitindo inclusive a descrição de novos táxons.

Cabe salientar que o presente trabalho representa o primeiro relato de presença de nódulos radiculares em *M. micropteris*. A análise da diversidade de seus microsimbiontes pode nos conferir importantes informações quanto à evolução da interação planta-microrganismo, bem como sobre a composição de populações simbióticas.

3 OBJETIVO

Caracterizar a diversidade de rizóbios microssimbiontes de *Mimosa micropteris* Benth. nodulíferas nativas dos Campos Gerais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros físico-químicos dos solos das áreas de amostragem das plantas nodulíferas de *M. micropteris*;
- Isolar rizóbios de nódulos radiculares;
- Caracterizar genética e fenotipicamente os rizóbios isolados;
- Comparar os dados de caracterização do solo com a diversidade de microssimbiontes.

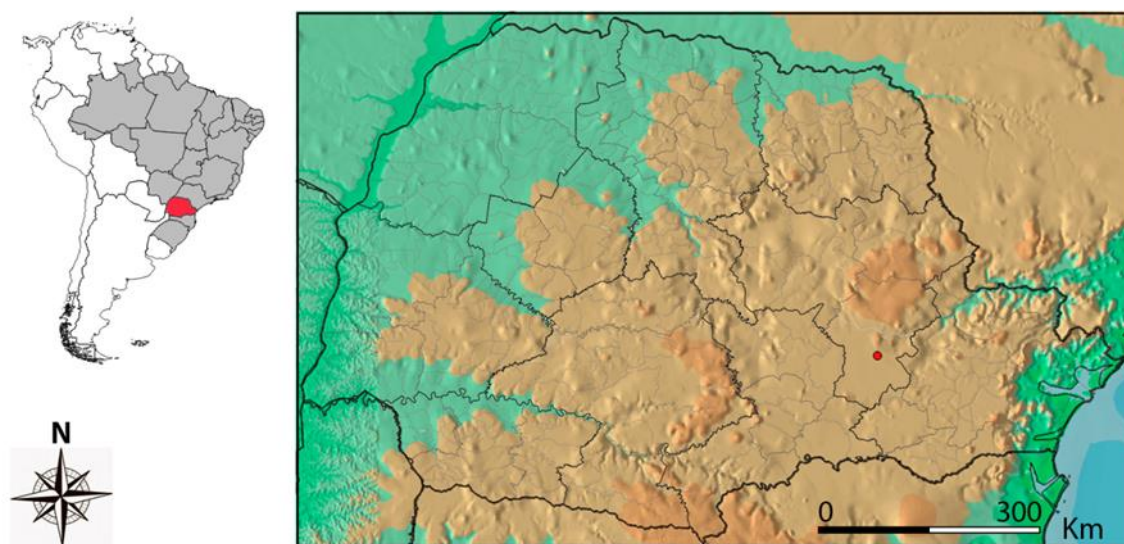
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE AMOSTRAGEM

As coletas contaram com registro e autorização no Sistema de Autorização e Informação de Biodiversidade – SISBIO (49603), expedida pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade/Ministério do Meio Ambiente (ICMBio/MMA), e também registro e autorização expedida pelo Instituto Ambiental do Paraná (14.238.963-0).

O Parque Estadual de Vila Velha (PEVV) é uma unidade de Conservação de 3.122,11 ha, localizada no município de Ponta Grossa entre as coordenadas 25° 12'34" e 25° 15'35" de latitude S e 49° 58'04" e 50° 03'37" longitude Oeste, a uma altitude de 800 a 1.068 m s.n.m. (IAP, 2004) (Figura 3), na região fitogeográfica dos Campos Gerais, Estado do Paraná (SILVA, 2014). O Parque por sua vez, é regido e mantido pelo Governo do Estado segundo a Lei nº1.292 de 12 de outubro de 1953, e tombado em 1966 pelo Patrimônio Histórico e Artístico Estadual (SCHWARTSBURD, 2016).

Figura 3: Localização do Parque Estadual de Vila Velha



Fonte: IAP, 2004

4.2 COLETA E ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO SOLO DAS ÁREAS DE AMOSTRAGEM

As subamostras foram obtidas na profundidade de 0 a 10 cm e homogeneizadas, resultando na amostra composta representativa da área de amostragem das plantas nodulíferas. As amostras foram submetidas a análises químicas e físicas nos Laboratórios de Ciências Agrárias e de Tecnologia do Departamento de solo e Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.3 AMOSTRAGEM DAS PLANTAS NODULÍFERAS E ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS

As plantas nodulíferas nativas de *Mimosa micropteris* (var *micropteris*), foram removidas manualmente ou com auxílio de pás para jardinagem e acondicionadas em sacos plásticos. Os espécimes vegetais foram depositados no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (HUEPG), mediante classificação taxonômica dos mesmos. Para o isolamento, inicialmente procedeu-se a desinfestação dos nódulos com o objetivo de eliminar os microrganismos presentes na superfície. Para tanto, cada nódulo permaneceu 30 segundos na solução de álcool 70%, 3 minutos na solução hipoclorito de sódio 3% e por último, 10 lavagens consecutivas em água destilada estéril. Em seguida, os nódulos foram macerados em 10µl de água estéril. A solução gerada foi inoculada em placas de Petri contendo meio sólido seletivo Yeast Mannitol (YM) adicionado de corante seletivo Vermelho Congo (VC), para isolamento de colônias de rizóbios (VINCENT, 1970).

4.4 ESTOCAGEM DE LINHAGENS BACTERIANAS

Os estoques bacterianos foram mantidos em meio sólido inclinado YM a 4 °C e criopreservados com 50% de glicerol a - 80 °C. As estirpes também foram depositadas na “Coleção de culturas de microrganismos multifuncionais” da Embrapa Soja (Londrina-PR).

4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE RIZÓBIOS EM MEIO YM

As estirpes obtidas nos isolamentos foram cultivadas em meio sólido YM acrescido de vermelho congo 2,5% à 28 °C, por 2-7 dias. Confirmada a pureza dos isolados, estes foram descritos de acordo com características morfofisiológicas das colônias: tempo de crescimento, diâmetro da colônia, forma, elevação, bordas, superfície, consistência, produção de muco, cromatogênese da colônia em meio sólido YM com vermelho congo e com indicador Azul de Bromotimol 2,5%. Todas as avaliações seguiram o “Manual de Curadores de Germoplasma da Embrapa Soja” (HUNGRIA & SILVA, 2011).

4.6 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

Foram utilizadas células cultivadas em meio líquido YM crescidas até a fase exponencial para a extração do DNA total, utilizando o PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade e concentração do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

4.7 AMPLIFICAÇÃO DO DNA PARA A REAÇÃO DE BOX-PCR

Para análise de diversidade por DNA fingerprinting, foi utilizado o primer BOX-AIR (5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC *et al.*, 1994; KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995), seguindo as modificações de KASCHUK *et al.* (2006) e BATISTA *et al.* (2007).

A reação foi conduzida em um volume final de 25 µL, contendo 13,8 µL de água Milli-Q estéril; 5,0 µL de dNTPs, (estoque com 1,5 mmol/L de cada base); 2,5 µL de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,5 µL de MgCl₂ (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 (5 U/µL).

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

Os perfis obtidos foram analisados para geração de um dendrograma, utilizando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.4.6), 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 3% de tolerância.

4.8 AMPLIFICAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL 16S

O DNA total de cada estirpe foi utilizado como molde para amplificação do gene 16S rDNA, utilizando os iniciadores universais fd1 e rD1 (WEISBURG *et al.*, 1991). A reação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, 93°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; um ciclo final de extensão por 5 minutos. A reação foi conduzida em um volume final de 50 µL, contendo 35,3 µL de água Milli-Q 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 (5 U/µL).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante. A precipitação, sequenciamento e processamento das sequencias foram realizadas conforme descrito no item 4.10.

4.9 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *nodC*

O gene *nodC* foi amplificado utilizando-se os primers *nodCBurkF* (5' TRATYGAYATGGAATACTGGC) e *nodCBurkR* (5' CAGCGGAYATMGTCATTGA). A reação foi conduzida em um volume final de 50 µL, contendo 34,3 µL de água Milli-Q 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 primer (10 µM); 2,0 µL de DNA (50 ng/µL) e 0,2 µL de Taq (5 U/µL). A amplificação das sequências consistiu em 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 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; manutenção a 4°C (BONTEMPS *et al.*, 2010).

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

sequenciamento e processamento das sequências foram realizadas conforme descrito no item 4.2.10.

4.10 SEQUENCIAMENTO DOS GENES 16S DNAr e *nodC*

Os produtos purificados de PCR dos genes 16S DNAr e *nodC* foram submetidos a uma outra etapa de amplificação específica para sequenciamento. Nesse caso, a reação consistiu em 30µg do produto de PCR purificado, 1,3 µL de BigDye Terminator (ThermoFisher Scientific), 2,5 µL de tampão (ThermoFisher Scientific), 1 µL de primer (3,2 pmol) e água Milli-Q (quantidade suficiente para 20µL). Para sequenciamento do gene *nodC* foram utilizados os primers *nodCBurkF* e *nodCBurkR* e para o gene 16S DNAr foram utilizados os primers 362f e 786f (MENNA *et al.*, 2006).

A amplificação para sequenciamento consistiu em um ciclo inicial de 96°C por 1minuto; 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 min.

As amostras amplificadas foram precipitadas de acordo com o método descrito por MENNA *et al.* (2006). As amostras foram submetidas a sequenciamento no *AB1 3500xl Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

4.11 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS E FILOGENÉTICAS

As sequências dos genes 16S rDNA e *nodC* foram corrigidas e alinhadas utilizando os programas Bionumerics (*Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium*, v. 7.6), Bioedit v. 7.2.5 e Geneious v.7.1 (Biomatters).

O software Bioedit v.7.2.5 foi utilizado para calcular a identidade nucleotídica entre as sequências de 16S DNAr e *nodC* dos isolados de *M. micropteris* e estirpes tipo de espécies bacterianas representativas.

As árvores filogenéticas foram construídas com o programa MEGA v. 6.1, algoritmo de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*) (FELSENSTEIN, 1981), com modelo de distância Tamura-3-parâmetros (TAMURA, 1992) e distribuição G+I para o gene 16S DNAr e modelo de distância Tamura-Nei (TAMURA & NEI, 1993) para o gene *nodC*. O suporte estatístico para as árvores foi avaliado por bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições.

As sequências foram depositadas no banco de dados Genbank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), recebendo números de acesso KX809740- KX809746 (16S rDNA) e KX468306- KX468309 (*nodC*).

5 OCORRÊNCIA DE *Mimosa micropteris* (BENTHAN) NODULÍFERAS NATIVAS DOS CAMPOS GERAIS (PARANÁ-BRASIL) E DIVERSIDADE GENÉTICA DE SEUS MICROSSIMBIONTES

RESUMO

Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas e possui ampla diversidade e distribuição geográfica. Em levantamentos da diversidade florística do Parque Estadual de Vila Velha (Ponta Grossa-PR) relatou-se a ocorrência de várias espécies da subfamília Mimosoidae, dentre as quais *Mimosa micropteris* Benth. O presente estudo apresenta a primeira descrição de nódulos radiculares em *M. micropteris*, bem como a descrição da diversidade fenotípica e genética de seus microssimbiontes. As análises físico-químicas evidenciam que os solos das áreas de amostragem são arenosos, ácidos e pobre em nutrientes. Dezoito isolados foram obtidos de nódulos radiculares de plantas nativas, coletadas de maio a outubro de 2015. Mediante cultivo dos isolados em meio YMA foi constatado que todos provocaram acidificação do meio, taxa de crescimento intermediária e as colônias foram caracterizadas, na sua grande maioria, como viscosas. Os perfis genômicos obtidos por BOX-PCR revelaram a formação de quatro grupos, considerando um nível de similaridade de até 70%. O grupo A foi o mais representativo, agrupando seis dos isolados, seguido do grupo D, agrupando cinco isolados. As sequências parciais do gene 16S rDNA de estirpes selecionadas a partir do BOX-PCR indicaram similaridade dos isolados de todos os grupos com *Paraburkholderia* sp., indicando a ocorrência de variabilidade intraespecífica dentre os rizóbios isolados. Tais dados corroboram as recentes constatações de que rizóbios pertencentes à classe betaproteobacteria são os principais microssimbiontes de plantas do gênero *Mimosa* na América do Sul e que são rizóbios mais ubíquos do que anteriormente considerados. Ainda, segundo os resultados de 16S rDNA alfa-rizóbios também foi isolado, pertencente ao gênero *Rhizobium*, respectivamente. Apesar da diversidade observada quanto aos gêneros dos microssimbiontes, as sequências parciais dos genes *nodC* de todos os isolados analisados exibiram elevada similaridade entre si e com o gene *nodC* de estirpes de *Paraburkholderia* sp. Nossos resultados demonstram que *M. micropteris* é um modelo de estudo da interação planta-rizóbios, visto que são capazes de serem noduladas por membros de três diferentes classes de Proteobacteria, provavelmente mediante transferência lateral de genes simbióticos;. Além disso, corroboram com a teoria de que beta-rizóbios possuem competitividade potencializada frente à baixa disponibilidade de nutrientes e pH ácido do solo em relação a alfa-rizóbios.

Palavras-chave: *Rhizobium*, , *Burkholderia*, rizóbios, fixação biológica de nitrogênio

ABSTRACT

Fabaceae is one of the largest botanical families and has a wide diversity and geographical distribution. In surveys of the floristic diversity of the Vila Velha State Park (Ponta Grossa-PR), the occurrence of several species of the subfamily Mimosoidae was reported, among which the *Mimosa micropteris* Benth. The present study shows the first description of root nodules in *M. micropteris*, as well as the description of the phenotypic and genetic diversity of its microsymbionts. The physical-chemical analysis shows that the soils of the sampling areas are sandy, acidic and poor in nutrients. Eighteen isolates were obtained from root nodules of native plants, collected from May to October 2015. By cultivation of the isolates in YMA environment it was verified that all of them caused acidification of the environment, intermediate growth rate and the colonies were characterized, for the most part, as viscous. The genomic profiles obtained by BOX-PCR revealed the formation of four groups, considering a level of similarity of up to 70%. Group A was the most significant of all, grouping six of the isolates, followed by group D, grouping five isolates. Partial sequences of the 16S rDNA gene from strains selected from BOX-PCR indicated similarity of isolates from all groups with *Paraburkholderia* sp., indicating the occurrence of intraspecific variability among the isolated rhizobia. These data corroborate the recent findings that rhizobia belonging to the betaproteobacteria class are the main microsymbionts of plants of the genus *Mimosa* in South America and that are rhizobia more ubiquitous than previously considered. Also, according to the results of 16S rDNA, alpha-rhizobia and gamaproteobacteria-rhizobia were also isolated, belonging to the genus *Rhizobium* and *Pseudomonas*, respectively. Despite the diversity observed in the genus of the microsymbionts, the partial sequences of the *nodC* genes of all the isolates analyzed exhibited high similarity to each other and to the *nodC* gene of *Paraburkholderia* sp. Our results demonstrate that *M. micropteris* is a study model of plant-rhizobia interaction, since they are capable of being nodulated by members of three different classes of Proteobacteria, probably by lateral transfer of symbiotic genes; In addition, they corroborate with the theory that beta-rhizobia have potentiated competitiveness against the low availability of nutrients and acidic pH of the soil in relation to alpha-rhizobia.

Key-words: *Rhizobium*, *Burkholderia*, Rhizobia, biological nitrogen fixation.

5.1 INTRODUÇÃO

O estudo da simbiose rizóbio-leguminosa é de grande importância, visto que permite o aporte de nitrogênio para os ecossistemas terrestres, contribuindo significativamente para manutenção de ecossistemas naturais e agrícolas (LINDSTRÖM *et al.*, 2010; SMÝKAL, 2015). Essa interação envolve a infecção de pelos radiculares por rizóbios compatíveis e organogênese de uma estrutura radicular denominada nódulo, que mantém um constante suprimento de carbono e regulação da pressão de oxigênio, permitindo a realização da fixação biológica de nitrogênio pelos microssimbiontes (SCHULTZE; KONDOROSI, 1998; OLDROYD; DOWNIE, 2004; DEAKIN; BROUGHTON, 2009).

Os “rizóbios clássicos” são pertencentes à classe Alfaproteobacteria e são os mais estudados simbioses de leguminosas, contando com 13 gêneros conhecidos (MOULIN *et al.*, 2001). Durante muitos anos, acreditava-se que apenas existiam alfa-rizóbios; tal constatação deve-se ao fato de que os estudos relacionados à interação leguminosa-rizóbio eram, em sua maioria, baseados em plantas hospedeiras de importância agrônômica e o estabelecimento da simbiose ocorria em condições controladas (MOULIN *et al.*, 2001; BONTEMPS *et al.*, 2013).

Com a ampliação dos estudos sobre diversidade de rizóbios em plantas endêmicas e nativas e isolamento utilizando solos de ambientes diversos com diferentes plantas-isca, um crescente número de espécies de rizóbios pertencentes à classe Betaproteobacteria passou a ser identificado (CHEN *et al.*, 2007; BONTEMPS *et al.*, 2010; REIS JR *et al.*, 2010; GYANESHWAR *et al.*, 2011; BORNAUD *et al.*, 2013; DALL’AGNOL *et al.*, 2016), pertencentes aos gêneros *Paraburkholderia* (MOULIN *et al.*, 2001) (antes *Burkholderia*) e *Cupriavidus* (CHEN *et al.*, 2001; WEIR *et al.*, 2016;).

Nesse sentido, os Campos Gerais do Paraná (Brasil) configuram uma área potencial para estudos sobre diversidade de rizóbios, visto que abriga uma grande diversidade de espécies pertencente à família Fabaceae (LEWIS, *et al.*, 2005; CERVI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016). A região conta com várias unidades de conservação, constituídas por remanescentes vegetacionais originais como o Parque Estadual de Vila Velha localizado no município de Ponta Grossa (TAKEDA *et al.*, 2001).

A subfamília Mimosoideae, principalmente gênero *Mimosa*, possui grande representatividade na região, contando com várias espécies nativas e endêmicas. *Mimosa micropteris* (Benth.) é endêmica do Brasil com ocorrência relatada no Sudeste e Sul do Brasil, associadas a áreas de Campos Rupestres e Cerrados (DUTRA; MORIM, 2016). Trata-se de um

arbusto com tamanho variando entre 1-4 metros de altura, com flores em capítulos globosos reunidos em racemos, e legumes comprimidos com valvas deiscentes papiráceas, que não se desarticulam em segmentos subquadrados (BURKART, 1979; DUTRA; MORIM, 2016).

Apesar de o Brasil ser um dos principais centros de diversidade do gênero *Mimosa* poucos estudos descrevem a diversidade de seus microssimbiontes, sendo os mesmos essenciais na descrição de novos táxons de rizóbios e elucidação de questões evolutivas e ecológicas relacionadas à interação leguminosa-rizóbio. Ademais, os Campos do Sul do País são negligenciados quanto à conservação e proteção de sua biodiversidade, e apresentam ecótonos que são regiões ecologicamente frágeis (OVERBECK *et al.*, 2007).

O presente trabalho apresenta a identificação e análise da diversidade dos microssimbiontes de *M. micropteris* nodulíferas nativas do Parque Estadual de Vila Velha, uma importante unidade de conservação localizada nos Campos Gerais.

5.2 MATERIAL E METODOS

5.2.1 Local de Amostragem

Os espécimes de *Mimosa micropteris* nodulíferas foram coletados na Unidade de Conservação do Parque Estadual de Vila Velha, localizada no município de Ponta Grossa – Paraná, sob as coordenadas 25° 12'34" e 25° 15'35" de latitude S e 49° 58'04" e 50° 03'37" longitude Oeste, a uma altitude de 800 à 1.068m s.n.m. (IAP, 2004) (Figura 3).

Os nódulos radiculares coletados sofreram desinfestação segundo VINCENT (1970) e foram inoculados em placa com meio de cultivo YMA (Yeast Mannitol Ágar) adicionado de corante seletivo Vermelho Congo 2,5%. Dezoito isolados foram obtidos e suas colônias isoladas foram caracterizadas morfofisiologicamente (forma, elevação, produção de muco, consistência, borda, detalhes ópticos e cromogênese em meio YM adicionado de indicador de pH azul de bromotimol).

Todos os isolados foram depositados na Coleção de Cultura e Microorganismos Multifuncionais da Emprapa Soja de Londrina, e receberam um nome de acesso CNPSo. As estirpes foram estocadas em ágar inclinado (YMA) mantidos à 4°C e preservadas a longo prazo em solução glicerol 50% à -20°C e -80°C, e em estoque liofilizado.

5.2.2 Coleta e Análise Físico-Química do Solo das Áreas de Amostragem

As subamostras foram obtidas na profundidade de 0 a 10 cm e homogeneizadas, resultando na amostra composta representativa da área de amostragem das plantas nodulíferas. As amostras foram submetidas a análises químicas e físicas nos Laboratórios de Ciências Agrárias e de Tecnologia do Departamento de solo e Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

5.2.3 Extração do DNA Total

Foram utilizadas células cultivadas em meio líquido YM crescidas até a fase exponencial para a extração do DNA total, utilizando o PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade e concentração do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

5.2.4 Amplificação do DNA para a reação de BOX-PCR

Para análise de diversidade por DNA *fingerprinting*, foi utilizado o primer BOX-AIR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC *et al.*, 1994; KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995), seguindo as modificações de KASCHUK *et al.* (2006) e BATISTA *et al.* (2007). Os *amplicons* foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se o *1kb Plus Ladder* (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

5.2.5 Amplificação e Sequenciamento do Gene Ribossomal 16s rDNA e Gene de Nodulação *nodC*

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), e do gene *nodC*, com os iniciadores *nodCBurkF* (5' TRATYGAYATGGAATACTGGC) e *nodCBurkR* (5' CAGCGGAYATMGTCATTGA) (BONTEMPS *et al.*, 2010). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante.

Para sequenciamento do gene *nodC* foram utilizados os iniciadores *nodCBurkF* e *nodCBurkR* (BONTEMPS *et al.*, 2010) e para o gene 16S DNAr foram utilizados os iniciadores 362f (5' - CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG - 3') e 786f (5' - CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG - 3') (MENNA *et al.*, 2006). As amostras amplificadas foram precipitadas de acordo com o método descrito por MENNA *et al.* (2006) e submetidas a sequenciamento no *AB1 3500xl Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

5.2.6 Análise dos Dados Moleculares

Os perfis obtidos foram analisados para geração de um dendrograma, utilizando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.4.6), 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 3% de tolerância.

As sequências dos genes 16S DNAr e *nodC* foram corrigidas e alinhadas utilizando os programas Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 7.6), Bioedit v. 7.2.5 e Geneious v.7.1 (Biomatters). As sequências foram depositadas no banco de dados Genbank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), recebendo números de acesso KX809740- KX809746 (16S rDNA) e KX468306- KX468309 (*nodC*).

O software Bioedit v.7.2.5 foi utilizado para calcular a identidade nucleotídica entre as sequências de 16S rDNA e *nodC* dos isolados de *M. micropteris* e estirpes tipo de espécies bacterianas representativas.

As árvores filogenéticas foram construídas com o programa MEGA v. 6.1, algoritmo de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood) (FELSENSTEIN, 1981), com modelo de distância Tamura-3-parâmetros (TAMURA, 1992) e distribuição G+I para o gene 16S DNAr e modelo de distância Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993) para o gene *nodC*. O suporte estatístico para as árvores foi avaliado por bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Características Físico-Químicas da Área de Amostragem de *M. micropteris* nodulíferas

Os dados das características químicas do solo do Parque Estadual de Vila Velha evidenciam o elevado teor de radical Al^{+} no solo, assim como elementos Ca e Mg em menor proporção (Tabela 1).

O solo da área de amostragem das plantas nodulíferas foi caracterizado como ácido (pH 3,9), com elevado teor de areia e, portanto, baixa retenção de água. O elevado teor de alumínio dissolvido no solo reforça a ideia de acidez juntamente com o elevado índice pluviométrico da região. Nota-se, ainda, a baixa concentração de matéria orgânica, evidenciada pelo índice de C-orgânico (Tabela 1).

Tabela 1: Características físico-químicas do solo da área de coleta de M. micropteris nodulíferas no Parque Estadual de Vila Velha (Ponta Grossa-PR)

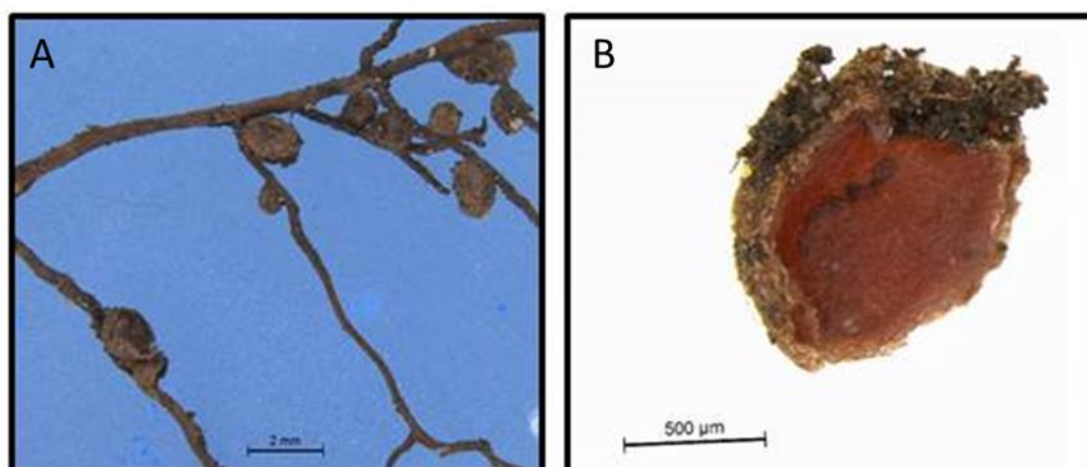
Análise Química		
Atributo	Unidade	Valor
pH em $CaCl_2$		3,9
H + Al	cmolc/dm ³	13,07
Al trocável	cmolc/dm ³	2,6
Ca trocável	cmolc/dm ³	0,4
Mg trocável	cmolc/dm ³	0,6
K trocável	cmolc/dm ³	0,10
P	mg/dm ³	0,9
C – orgânico	g/dm ³	37
CTC à pH 7,0	cmolc/dm ³	13,87
CTC efetiva	cmolc/dm ³	3,4
Sat. por base (V)	%	5,8
Sat. por Al (m)	%	76,5
Sat. por Ca	%	2,9
Sat. por Mg	%	2,2
Sat. por K (%)	%	0,7
Relação Ca/Mg		1,3
Relação Ca + Mg/K		7,0
Análise Física		
Areia	g Kg ⁻¹	900
Silte	g Kg ⁻¹	60
Argila	g Kg ⁻¹	40

5.3.2 Isolamento e Caracterização Morfofisiológica das Estirpes Isoladas de Nódulos de *M. Micropteris*

Os nódulos radiculares (Figura 4) foram coletados quando *M. micropteris* estava florescendo, facilitando a identificação taxonômica das plantas. As plantas foram fotografadas e tiveram as folhagem e flores preservadas para identificação e depósito no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa - HUPG.

Dezoito isolados foram obtidos, todos representando bactérias Gram-negativas. Os isolados foram inicialmente caracterizados quanto aos padrões morfofisiológicos (Tabela 2).

Figura 4: (A) Nódulos radiculares de plantas nativas nodulíferas de *M. micropteris*; (B) Secção transversal de nódulo radicular, evidenciando a presença de leghemoglobina e atividade do nódulo.



As estirpes apresentaram crescimento variando entre rápido e intermediário, e com exceção da estirpe CNPSo3058 que manteve o meio de cultivo neutro, todas as estirpes acidificaram o meio de cultivo. O tamanho das colônias variou de 1 a 3,6mm e a maioria das estirpes apresentou colônias com forma variando de irregular e circular, elevação lenticular ou convexa, com exceção da estirpe CNPSo3075 que apresentou elevação plana. A borda das colônias variou entre denteada, ondulada ou inteira, sendo a estirpe CNPSo3059 se diferenciando com borda de colônia lobada. Por fim, as colônias apresentaram superfície lisa, diferenciando apenas das estirpes CNPSo3076 e CNPSo3077 com superfície rugosa.

A produção de muco em grande maioria foi classificada como baixa, de consistência gomosa ou viscosa, com exceção da estirpe CNPSo3058 com consistência butirica.

Tabela 2: Características morfofisiológicas das colônias de rizóbios isolados de nódulos radiculares de *M. micropteris*.

Isolado (CNPSO)	Crescimento ¹	Diâmetro colônias (mm)	pH BTB ²	Forma	Elevação	Borda	Superfície	Produção de muco	Consistência	Detalhes ópticos	Cromogênese da colônia BTB	Cromogênese da colônia VC ³
3057	Intermediário	1,2 mm	Ácido	Circular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaca	Creme	L. rosada
3058	Rápido	1,1 mm	Neutro	Circular	Lenticular	Denteada	Lisa	Pouca	Viscosa	Opaca	Creme	L. rosada
3059	Intermediário	2,7 mm	Ácido	Irregular	Lenticular	Lobada	Lisa	Pouca	Butírica	Opaca	Branco	Rosa bebê
3031	Intermediário	2,4 mm	Ácido	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaca	Creme	L. rosada
3063	Rápido	2,1 mm	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaca	Creme	Rosa bebê
3034	Rápido	3 mm	Ácido	Irregular	Lenticular	Denteada	Lisa	Abundante	Viscosa	Opaca	Branco	L. rosada
3065	Rápido	1 mm	Ácido	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaca	Creme	L. rosada
3066	Intermediário	2,4 mm	Ácido	Irregular	Lenticular	Denteada	Lisa	Moderada	Viscosa	Opaca	Creme	Rosa bebê
3067	Intermediário	3,6 mm	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaca	Branco	L. rosada
3068	Intermediário	3 mm	Ácido	Irregular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Moderada	Viscosa	Opaca	Branco	Rosa bebê
3069	Rápido	1,7 mm	Ácido	Irregular	Lenticular	Ondulada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaca	Creme	L. rosada
3070	Rápido	3,4 mm	Ácido	Irregular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaca	Branco	L. rosada
3071	Intermediário	3 mm	Ácido	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Abundante	Viscosa	Opaca	Creme	Rosa bebê
3073	Intermediário	1,6 mm	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaca	Branco	L. rosada
3074	Rápido	1 mm	Ácido	Puntiforme	Lenticular	Inteira	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaca	Branco	L. rosada
3075	Rápido	2,4 mm	Ácido	Circular	Plana	Denteada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaca	Branco	L. rosada
3076	Intermediário	2,4 mm	Ácido	Circular	Lenticular	Denteada	Rugosa	Pouca	Gomosa	Opaca	Amarelo	L. rosada
3077	Intermediário	2,4 mm	Ácido	Circular	Lenticular	Ondulada	Rugosa	Pouca	Gomosa	Opaca	Creme	L. rosada

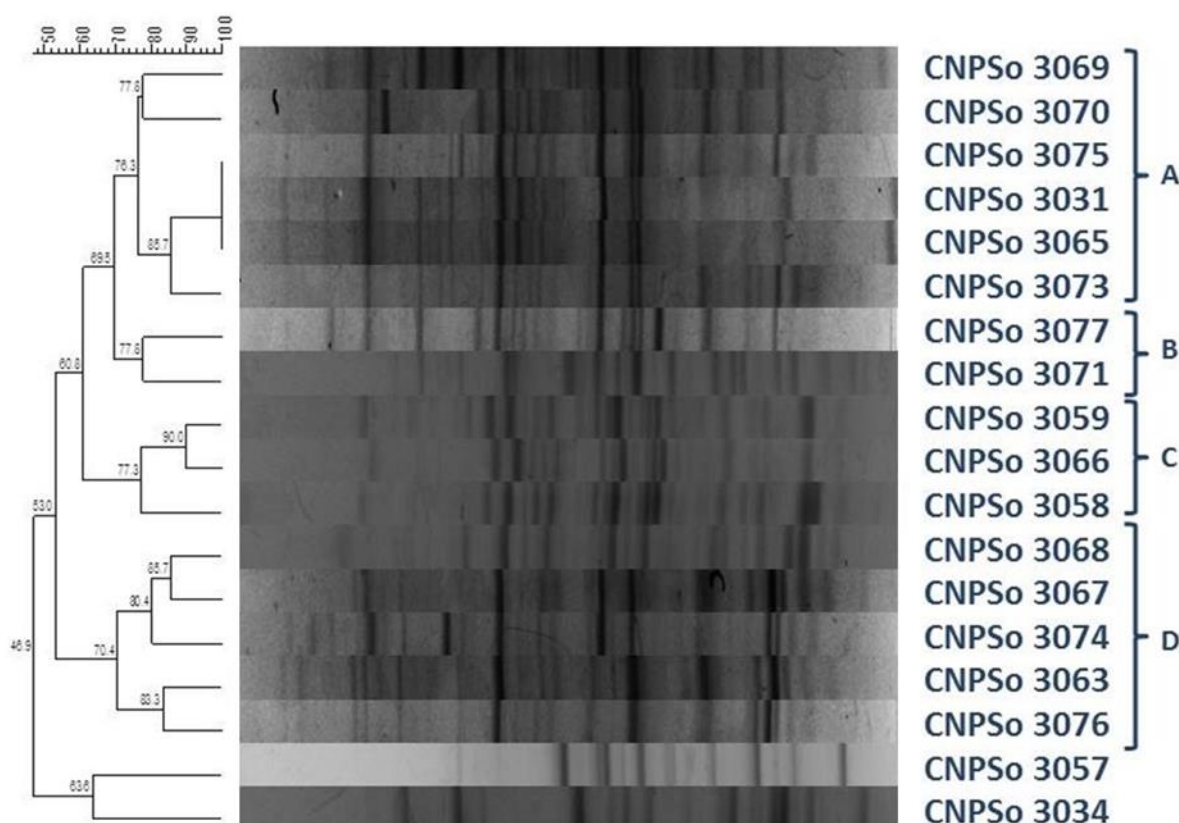
¹Rápido: até 4 dias; Intermediária: de 5 a 10 dias²BTB: azul de bromotimol³VC: vermelho congo

5.3.3 Variabilidade Genética dos Microsimbiontes de *M. micropteris* por BOX-PCR

O DNA total das estirpes foi extraído e utilizado como molde para análise de variabilidade genômica por BOX-PCR. Para a análise, padrões de amplicons foram gerados para cada estirpe com êxito, com o uso do iniciador BOX-A1R e utilizados na construção de um dendrograma (Figura 5).

Considerando um valor limiar de 70% de similaridade (VANDAMME et al, 1996), usualmente adotado para delineamento de grupos microbianos por técnicas baseadas na amplificação de elementos repetitivos, quatro grupos foram formados e duas estirpes, CNPSO3057 e CNPSO3064, exibiram perfis únicos (Figura 5).

Figura 5: Dendrograma baseado nos perfis de BOX-PCR de isolados de nódulos de *M. micropteris* (UPGMA e coeficiente de Jaccard, 3% de tolerância) utilizando o software Bionumerics 7.0.



O grupo A foi o mais representativo contando com seis isolados, agrupados com 76,3% de similaridade, seguido do grupo D, cujos cinco isolados foram agrupados com 70,4% de similaridade (Figura 5). As estirpes CNPSO3075, CNPSO3061 e CNPSO3065, pertencentes ao grupo A, apresentaram padrões idênticos.

As estirpes que integraram o grupo B, apesar de exibir 77,8% de similaridade, apresentaram perfis visualmente diferenciados, possivelmente pela adoção de um valor de tolerância de 3% (Figura 5).

5.3.4 Interferência Taxonômica dos Isolados pela Filogenia do Gene 16S DNAr

Estirpes representativas foram selecionadas de acordo com os agrupamentos formados no dendrograma de BOX-PCR para análise filogenética baseada em sequenciamento parcial (aproximadamente 1150pb) do gene 16S DNAr. A árvore filogenética exibe que maioria dos isolados de nódulos radiculares de *M. micropteris* pertencente ao gênero *Paraburkholderia* (Figura 6).

As estirpes CNPSo3077, CNPSo3058, CNPSo3056, CNPSo3057 e CNPSo3031 formaram o clado I agrupando-se com a espécie *Paraburkholderia nodosa*. O clado II contou com a estirpe CNPSo3034 que foi agrupada com *Paraburkholderia* sp.. Por fim o clado III agrupou a estirpe CNPSo3071 com *Rhizobium tropici*.

Segundo VANDAMME et al (1996) para que duas estirpes pertençam a mesma espécie elas devem compartilhar no mínimo 97% de identidade nucleotídica entre as sequências de 16S DNAr. Todas as estirpes apresentaram identidade superior a 97% apenas com uma ou nenhuma espécie (Tabela 3). As estirpes CNPSo3057, CNPSo3076, CNPSo3077 e CNPSo3058 possuem identidade nucleotídica compatível com a estirpe tipo de *Paraburkholderia nodosa* Br3437, com valor superior a 97%. A estirpe CNPSo3034 apresentou similaridade nucleotídica de 99% com *Paraburkholderia* sp. R-42359 e CNPSo3071 com *Rhizobium tropici* CIAT 899 com valor de 99%. Em contrapartida, a estirpe CNPSo3031 não apresentou identidade nucleotídica de valor superior a 97% com nenhuma espécie conhecida (Tabela 3).

Figura 6: Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S DNAr de rizóbios isolados de *M. micropteris* (Máxima Verossimelhança, modelo Tamura-3-parâmetros com distribuição G+I, 1000 repetições de bootstrap), utilizando o software Mega 6.06. As seqüências foram depositadas no Genbank do NCBI e os respectivos números de acesso encontram-se entre parêntese.

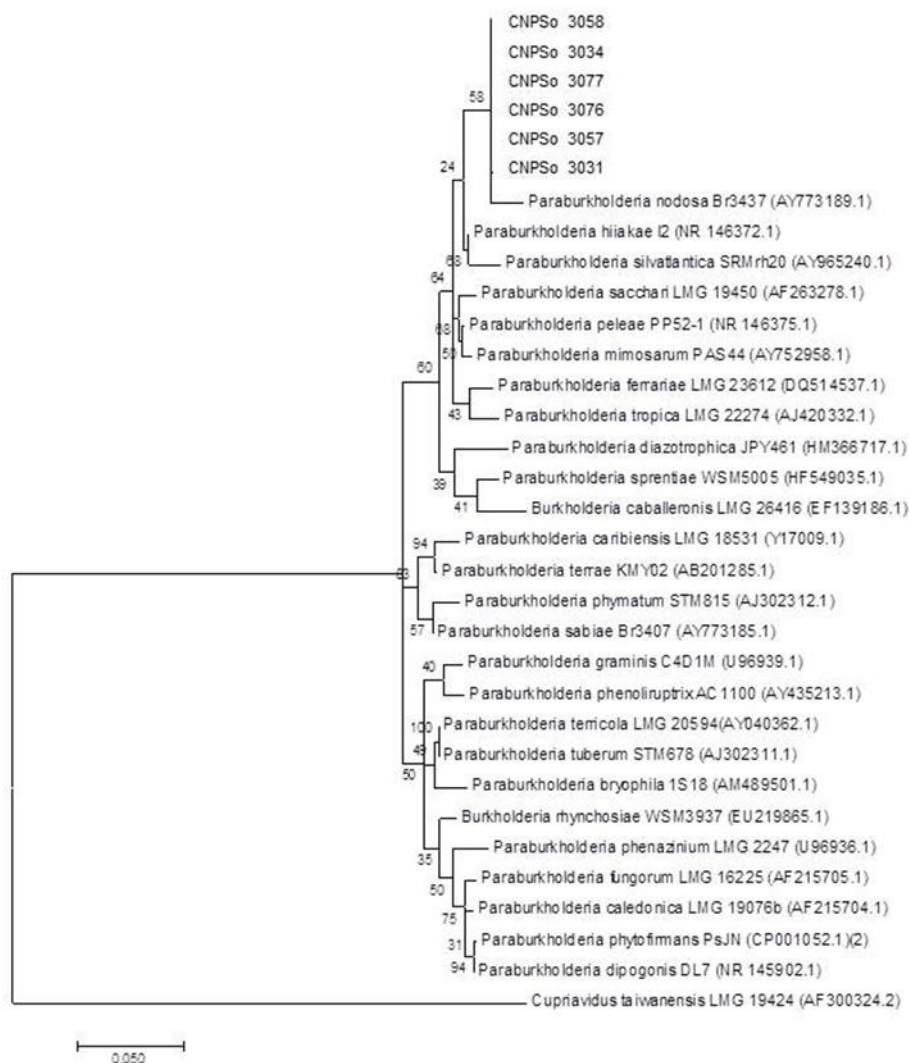


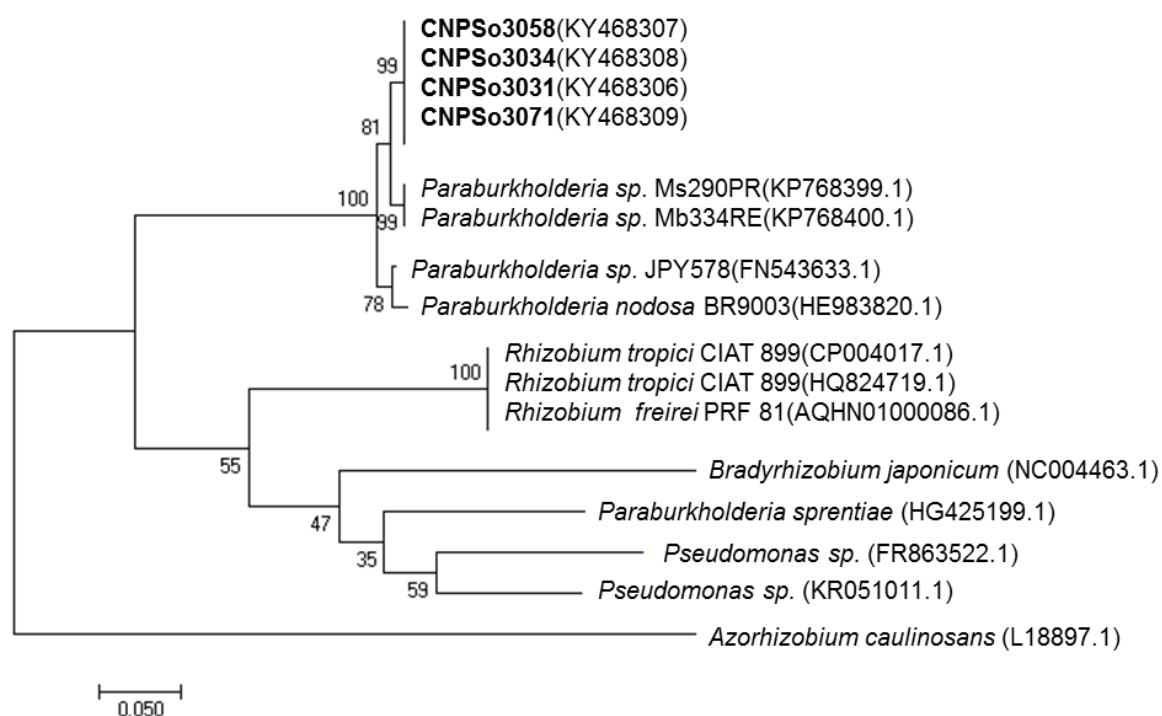
Tabela 3: Identidade nucleotídica (em percentual) entre as seqüências parciais do gene 16S DNAr de rizóbios isolados de nódulos de *M. micropteris* e estipes tipo de diferentes espécies de bactérias, utilizando o software Bioedit.

	CNPSo 3057	CNPSo 3031	CNPSo 3076	CNPSo 3077	CNPSo 3058	CNPSo 3034	CNPSo 3071
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 101	0,767	0,731	0,766	0,759	0,759	0,782	0,891
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571	0,768	0,727	0,766	0,759	0,759	0,795	0,904
<i>Paraburkholderia nodosa</i> Br3437T	0,98	0,915	0,981	0,975	0,974	0,832	0,777
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	0,787	0,74	0,776	0,769	0,769	0,796	0,998

5.3.5 Diversidade do gene de nodulação nodC

As estirpes *Paraburkholderia* sp. CNPSo3034, *Rhizobium* sp. CNPSo3071, *Paraburkholderia* sp. CNPSo3058 e *Paraburkholderia* sp. CNPSo3031 foram selecionadas para análise de diversidade do gene nodC. A árvore filogenética construída com as sequências parciais (~400 pb) do gene nodC (Figura 7) apresenta dados divergentes em relação aos resultados obtidos nas análises de diversidade morfofisiológica (Tabela 2) e genética (Figuras 5 e 6).

Figura 7: : Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene de nodulação nodC de isolados de nódulos de *M. micropteris* (Máxima Verossemelhança, modelo Tamura-Nei com 1000 repetições) utilizando o software Mega 6.06



Independente da classificação taxonômica dos isolados, baseada no sequenciamento do gene 16S DNAr, todas as estirpes formaram um único cluster na análise filogenética do gene nodC e apresentaram-se agrupadas com estirpes nodulíferas de *Paraburkholderia* sp., sendo a estirpe Mb334RE originalmente isolada de *Mimosa bimucromata* e Ms290PR de *M. scabrela* no Brasil (LAMMEL et al; 2015).

Observou-se uma elevada identidade nucleotídica com a estirpe *Paraburkholderia* sp. Mb-334RE, entre 93,2 e 97,8%. No entanto, uma identidade nucleotídica ainda superior foi observada entre os próprios isolados de *M. micropteris*, variando de 94,6 a 98,3% (Tabela 4).

Tabela 4: Identidade nucleotídica (em percentual) entre as sequências parciais do gene *nodC* de rizóbios isolados de nódulos de *M. micropteris* e em comparação com estipes de diferentes espécies de rizóbios.

	<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPS03031	<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPS03058	<i>Paraburkholderia</i> sp. CNPS03034	<i>Rhizobium</i> sp. CNPS03071
<i>Paraburkholderia</i> sp Mb 334RE	0,978	0,948	0,932	0,958
<i>Paraburkholderia nodosa</i> BR9003	0,964	0,934	0,918	0,944
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	0,737	0,706	0,693	0,715
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPS03031	1	0,962	0,946	0,974
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPS03058	0,962	1	0,973	0,983
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPS03034	0,946	0,973	1	0,969
<i>Rhizobium</i> sp CNPS03071	0,974	0,983	0,969	1

5.4 DISCUSSÃO

Rizóbios foram isolados de nódulos nativos de *Mimosa micropteris*, uma planta arbustiva endêmica do Brasil, encontrada em áreas de Campos Rupestres e Cerrado dos Estados de São Paulo, Santa Catarina e, principalmente, Paraná (DUTRA; MORIM, 2016). Foram encontradas plantas nodulíferas no Parque Estadual de Vila Velha, uma importante unidade de conservação dos Campos Gerais. O solo da área de amostragem foi classificado como arenoso, extremamente ácido, pobre em nutrientes e com elevado teor de alumínio; tais condições são potenciais interferentes negativos com o processo de nodulação, porém não impediu o estabelecimento de simbiose efetiva de *M. micropteris* com rizóbios nativos.

As características morfofisiológicas dos rizóbios isolados preliminarmente já indicavam uma inesperada diversidade entre os microssimbiontes, dado o elevado grau de endemismo do hospedeiro (Tabela 2). As análises de diversidade genética baseadas em BOX-PCR (Figura 5) e sequenciamento parcial do gene 16S DNAr (Figura 6) corroboram essa alta diversidade e indicaram o gênero *Paraburkholderia* como o predominante microssimbionte de *M. micropteris*. De fato, beta-rizóbios são relatados como os preferenciais simbiotes de *Mimosa* na América do Sul (CHEN *et al.*; 2005; REIS JR *et al.*, 2010; BOURNAUD *et al.*, 2013;).

As características físico-químicas do solo do Parque Estadual de Vila Velha, onde as plantas nodulíferas foram amostradas, corrobora com estudos prévios que correlacionam a eficiência saprofítica e simbiótica de rizóbios pertencentes ao gênero *Paraburkholderia*, em

solos ácidos e com baixa retenção de água (OLIVEIRA et al, 2006; GARAU et al. 2009; MISHRA et al., 2012).

REIS Jr et al. (2010) realizaram uma extensa análise de diversidade de rizóbios simbiossiontes de plantas do gênero *Mimosa* provenientes de campos rupestres de dois importantes biomas nacionais: a Caatinga e o Cerrado. No que tange aos aspectos físico-químicos do solo, ambos os biomas possuem características muito semelhantes aos Campos Gerais. Contando com muitas espécies endêmicas, os autores reportaram a prevalência de *Paraburkholderia* como preferenciais simbiossiontes, além de demonstrar sua importância na incorporação de N tais áreas. Rizóbios pertencentes à classe Alphaproteobacteria também foram isolados de nódulos radiculares de *M. micropteris* (Figura 6), porém em menor frequência. Os alfa-rizóbios incluem os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, dentre outros. São usualmente denominados “rizóbios clássicos” pois foram os primeiros descritos e extensivamente caracterizados por serem os principais microssimbiossiontes de espécies vegetais de importância agrônômica, como soja e feijão (RIVAS et al., 2009).

De fato, verificamos que as estirpes *Paraburkholderia* sp. CNPSO3034 e *Rhizobium* sp. CNPSO3071 possuem genes de nodulação *nodC* congruentes com as sequências de diferentes espécies de *Paraburkholderia* (Figura 7), sugerindo que tais isolados dos gêneros *Rhizobium* e *Paraburkholderia* tenham adquirido genes de nodulação provenientes de uma estirpe indígena de *Paraburkholderia* e, conseqüentemente, a habilidade de estabelecer simbiose com *M. micropteris*. Os genes simbióticos encontram-se em plasmídeos ou em ilhas cromossômicas e ambos são elementos genéticos potencialmente móveis que contêm apenas genes acessórios (MINAMISAWA et al., 2002; BARCELLOS et al., 2007). Rizóbios são reconhecidos por sua “promiscuidade genética” (GOGARTEN et al., 2002) pois podem utilizar diferentes mecanismos de transferência lateral de genes para disseminar tais elementos móveis para bactérias pertencentes a táxons variados, capacitando-as a ocupar um novo nicho ecológico (JING et al., 2016). Nesse sentido, esses elementos podem possuir um histórico evolutivo divergente em relação a genes comumente adotados como marcadores taxonômicos que, por sua vez, são transmitidos verticalmente (Figuras 6 e 7).

Sabe-se que os genes de nodulação dos gêneros *Rhizobium* e *Paraburkholderia* encontram-se nos plasmídeos (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012; CUNHA et al., 2012). O plasmídeo simbiótico da estirpe CCGE1002 de *Paraburkholderia* possui um segmento de 62 Kb que integra genes de nodulação e fixação de nitrogênio; um elemento semelhante é encontrado em *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424 (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012). O sequenciamento do genoma da estirpe *Rhizobium tropici* CIAT 899 descreve a existência de

um plasmídeo simbiótico (pSym), também presente em *R. freirei* PRF 81 e *R. leucaenae* CFN 299; as três estirpes são capazes de nodular feijoeiro (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2012).

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que *M. micropteris*, uma leguminosa endêmica do Brasil, é um modelo de estudo da interação planta-rizóbio, visto que foram isolados microssimbiontes pertencentes a três diferentes classes de Proteobacteria. A filogenia dos genes 16S DNAr e *nodC* evidenciam a ocorrência de transferência lateral de genes simbióticos. Além disso, corrobora-se com a teoria de que beta-rizóbios possuem competitividade potencializada frente à baixa disponibilidade de nutrientes e pH ácido do solo em relação à alfa-rizóbios.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R.; KELLY, E. F.; HEIL, R. D. Effects of Cultivation on Soils in Northern Great Plains Rangeland. **Alliance of Crop, Soil and Environmental Science Societies**, Vol. 52, Nº 4, p. 1081-1085. 1988.
- ALLEN, O. N; ALLEN, E. The Leguminosae: a source book of characteristics, use and nodulation Washington. **The University of Wisconsin Press**, 1981.
- ANDAM, C. P.; MONDO, S. J.; PARKER, M. A. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texas and Costa Rica populations of *Cupriavidus* nodule symbionts. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 73, Nº 14, p. 4686 - 4690. 2007.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology Fundamentals and Applications**. Ed. Addison **Wesley**. Madrid, p.561. 2002.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Plant Biology**, Vol. 57, p. 1-875. 2006.
- BARBERI, A.; CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Nodulação em Leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne**, Vol.4, Nº 1, p. 145-153. 1998.
- BARCELLOS, F. G.; MENNA, P.; BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M. Evidence of Horizontal Transfer of Symbiotic Genes from a *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Strain to Indigenous Diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol.17, Nº 8, p. 2635-2643. 2007.
- BARNEBY, R. C. **Sensitivae censitae: a description of the genus Mimosa Linnaeus (Mimosaceae) in the new world**. Book: Memoir of the New York Botanical Garden. Vol. 65, p. 103-835. 1991.
- BARRETTT, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panamá. **Systematic and Applied Microbiology**, Vol. 28 Issue 1, p. 57-65. 2005.
- BARRERA, L. L.; TRUJILLO, M. E.; GOODFELLOW, M.; GARCÍA, F. J.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; DÁVILA, G.; BERKUM, P. VAN; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Vol. 47, p. 1086-1091. 1997.
- 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**, Vol.53, p. 270-284. 2007.
- BENATA, H.; MOHAMMED, O.; NOUREDDINE, B.; ABDELBASSET, B.; MURESU, R.; SQUARTINI, A.; IDRISSE, M. M. Diversity of bacteria that nodulate *Prosopis juliflora* in the

eastern area of Morocco. **Systematic and Applied Microbiology**. Vol. 31, Issue 5, p. 378–386. 2008.

BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MURESU, R.; GIACOMINI, A.; SQUARTINI, A. Gamma Proteobacteria can nodulate legumes of the Genus *Hedysarum*. **Sistematic and Applied Microbiology**, Vol. 7, Issue 4, p. 462-468. 2004.

BENTHAM, G. Mimosaceae. In: MARTINS, C. F. P.; Endlicher, S. & Urban, I. **Flora Brasiliensis**. Vol. 15, p. 1-216. 1962.

BESSEGA, C.; HOPP, H. E.; FORTUNATO, R.H. Toward a phylogeny of Mimosa (*Leguminosae: Mimosoideae*): a preliminar analysis of Southern South American species based on chloroplast DNA sequence. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Vol. 95 Issue 4, p. 567-579. 2008.

BERKUM, P. VAN; NAVARRO, R. B.; VARGAS, A. A. T. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup+) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 60, p. 554-561. 1994.

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

BOURNAUD, C.; FARIA, S. M.; SANTOS, J. M. F.; TISSEYRE, P.; SILVA, M.; CHAINTREUIL; 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**, Vol. 8, Issue. 5, p. 1-13. 2013.

BORGES, A. L.; SILVA, J. F. J.; **Nutrição, Calagem e Adubação**. Sistema de Produção de Banana para a Zona da Mata de Pernambuco. Vol. 01, p. 25-34. 2000.

BORTOLAN, S.; BARCELLOS, F. G., MARCELINO, F. C., HUNGRIA, M. Expressão dos genes nodC, nodW e nopP em *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CPAC 15 avaliada por RT-Qpcr. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Vol. 44, Nº 11, p. 1491-1498. 2009.

BURKART, A. **Flora Ilustrada Catarinense**: Parte 1 – Leguminosas *Mimosoideas*. Itajaí, Santa Catarina. Vol. 01, p. 299-304. 1979

CÂMARA, G. M. S.; Fixação Biológica de Nitrogênio em soja. **Informações Agronômicas**, Vol. 01, p. 03. 2014.

CAMARI, P. H. Climatologia. In: Plano de manejo Parque Estadual de Vila Velha. Curitiba, **IAP, SEMA**. Vol. 01, p. 136-174. 2004.

CARMO, R. B.; ANDRADE, A. L. P.; SANTOS, G. A. S.; ASSIS, M. A.; Análise estrutural em relictos de Cerrado no Parque Estadual do Guartelá, município de Tibagi, Estado do Paraná. **Ciência Florestal**, Vol. 22, Nº 3, p. 505-517. 2012

CASTELLA, P. R.; BRITZ, R. M. (Org.) **A Floresta com araucária no Paraná: conservação e diagnóstico dos remanescentes Florestais**. Brasília, MMA, Vol. 01, p. 236. 2004.

CERVI, C. A.; VON-LINSINGEN, L.; HATSCHBACH, G.; RIBAS, O. S. **A Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha**, Município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Madrid, Vol. 10 Nº 02, p. 1-22. 2007.

CHEN, W. M.; DE FARIA, S.; STRALIOTTO, M. R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; CHOU, J. H.; CHOU, Y. J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; OTHER AUTHORS. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa* nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 71, p. 7461–7471. 2005.

CHEN, W. M.; JAMES, E. K.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; YANG, S. Z.; SPRENT, J. I. β -Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **New Phytol**, Vol. 168, p. 661–675. 2005

CONN, E. E.; STUMPF, P. K.; BRUENING, G.; DOI, R. H. Bioquímica Fundamental. **Limusa Wiley**, Vol. 04, p. 12 – 736. 2002.

CUNHA, C.; ZULETA, L. F. G.; ALMEIDA, L. G. P.; CIAPINA, L. P.; BORGES, W. L.; PITARD, R. M.; BALDANI, J. I.; STRALIOTTO, R.; FARIA, S. M.; HUNGRIA, M.; CAVADA, B. S.; MERCANTE, F. M.; VASCONCELOS, A. T. R. Complete Genome sequences of *Burkholderia phenoliruptrix* BR3459a (CLA1), a Heat-Tolerant, Nitrogen-Fixing Symbiont of *Mimosa flocculosa*. **Journal of Bacteriology**, Vol. 194, Nº 23, p. 6675-6676. 2012.

CURATTI, L.; LUDDEN, P. W.; RUBIO, L. M. *NifB*- dependent *in vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Current Issue**, Vol. 103, Nº 4, p. 5297-5301. 2006.

DEAKIN, W. J.; BROUGHTON, W. J. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, Vol. 7, Nº 4, p. 312. 2009.

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**, Vol. 63, Nº 9, p. 3342-3351. 2013.

DUDIK, N. M. Morphology of the pods of Leguminales (Fabales). In Advances in legume systematics. (R.M. Polhill & P.H. Raven, eds.). **Royal Botanical Gardens**, Vol. 2, p. 897-901. 1981.

DUTRA, V. F.; MORIM, M. P. **Mimosa in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB100978>>. Acesso em: 13/03/2015.

EHRHARDT-BROCARD, N. C. M.; STOCO, P.; TRAMONTIN, A. L.; FILHO, L. C. I. O.; SANTOS, J. C. P. Cultural Morphological and Genetic diversity of diazotrophs isolated from nodules of Bracatinga. **Revista Árvore, Viçosa-MG/BR**, Vol. 39, Nº 5, p. 923-933. 2015.

ELLIOTT, G. N.; CHOU, J.-H.; CHEN, W.-M.; BLOEMBERG, G. V.; BONTEMPS, C.; MARTÍNEZ- ROMERO, E.; VELÁZQUEZ, E.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I. AND JAMES, E. K. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, Vol. 11, Nº 1, p. 762-778. 2009.

ELLIOTT, G. N.; CHOU, J. H.; CHEN, W. M.; BLOEMBERG, G. V.; BONTEMP, C.; YOUNG, J. P.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K.; *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, Vol. 11, p. 762–778. 2009.

ESTRADA-DE-LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J.; *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 67, Nº 6, p. 2790-2798. 2001.

FAUVART, M.; MICHELIS, J. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium–legume symbiosis. **FEMS Microbiology Lett.** Vol. 285, Nº 1, p. 1-9. 2008.

FELSENSTEIN, J.; Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, Vol. 17, Issue 6, p. 368-376. 1981.

GALLON, J. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. **Trends in Biochemical Sciences**, Vol. 6, Nº 1, p. 19-23. 1981.

GARAU, G.; YATES, R. J.; DEIANA, P.; HOWIESON, J. G. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Vol. 41, Nº 1, p. 125-134. 2009.

GIÁCOMO, R. G.; CARVALHO, D. C.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, A. B.; GAUI, T. D. Florística e fitossociologia em áreas de campo sujo e cerrado sensu stricto na estação ecológica de pirapitinga – mg floristic and phytosociology in ‘campo sujo’ and ‘cerrado’ sensu stricto areas in the ecological station of pirapitinga, minas gerais state. **Ciência Florestal**, Vol. 23, Nº 1, p. 29-43. 2013.

GOGARTEN, J. P.; DOOLITTLE, W. F.; LAWRENCE, J. G. Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer. **Molecular Biology Evolution**, Vol. 19, Issue 12, p. 2226-2238. 2002.

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A. M.; MOULIN, L.; CHEN, W. M.; ELLIOT, G. N.; BONTEMPS, C.; ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; GROSS, E.; REIS, J. R. F. B.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Legume-Nodulating Betaproteobacteria diversity, Host range, and Future prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Vol. 24, No. 11, p. 1276-1288. 2011.

HARRIS, J. K.; KELLEY, S. T.; SPIEGELMAN, G. B.; PACE, N. R.; The genetic core of the universal ancestor. **Genome Research**, Vol. 13, p. 407-412. 2003.

HASSAN, S. and MATHESIUS, U. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. **Journal of Experimental Botany**. Vol. 1, p. 1-16. 2012.

HASSAN, S.; The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 63, Nº 9, p. 3429-3444. 2011.

HERNANDEZ, J. A.; CURATTI, L., AZNAR, C. P.; PEROVA, BRITT, R.D.; RUBIO, L.M. **PNAS**, Vol. 105, Nº 33, p. 11679-11684. 2008.

HU, Y.; RIBBE, M. W.; Nitrogenase and homologs. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Vol. 20, Issue 2, p. 435-445. 2015.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. Brasília: **EMBRAPA Soja e EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e Biotecnologia**, Vol. 332 e 333, p. 20-21. 2011.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. **EMBRAPA** – Brasília, DF, Vol. 46, Cap. 2, p. 45-69. 1994.

IBÂNEZ, F.; ANGELINI, J.; TONELLI, M. L.; FABRA, A.; Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic *Gammaproteobacteria*. **Systematic and Applied Microbiology**, Vol. 32, Issue 1, p. 49-55. 2009.

JACCARD, P. The distribution of the flora in the alpine zone. **New Phytologist**, Vol. 11, Issue 2, p. 37-50. 1912.

JARVIS, B. D. W.; DOWNER, H. L.; YOUNG, J. P. W. Phylogeny of fast Growing Soybean-Nodulating Rhizobia Supports Synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and Assignment to *Rhizobium fredii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Vol. 42, Nº 1. 1992.

JUDD, A. K.; SHNEIDER, M.; SADOWSKY, M. J.; BRUIJN, F. J. de. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 59, p. 1702-1708. 1993.

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**, Vol. 32, Issue 2, p. 210-220. 2006.

KLEIN, R. M.; HATSCHBACH, G. Fitofisionomia e notas complementares sobre o mapa fitogeográfico de Quero-Quero (Paraná). **Bol Par Geoc**, Vol. 1, Nº 28/29, p. 159-188. 1971.

KLEPA, M. S.; PAULITSCH, F.; BATISTA, J. S. S. Diversidade de rizóbios microssimbiontes de leguminosas nativas dos campos gerais. **Resumo EAIC 2016 – Universidade Estadual de Ponta Grossa**, Ponta Grossa. 2016.

KOCK, M. Diversity of root nodule bacteria associated with *Cyclopia* species. **Ph.D. thesis. University of Pretoria**, South Africa, 2004.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome research**, Vol. 5, Issue 1, p. 408-418.

KRISHNAN, H. B.; LORIO, J.; KIM, W. S.; JIANG, G. Q.; KIM, K. Y.; DE BOER, M. AND PUEPPKE, S. G. (2003). Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Vol. 16, p. 617–625. 1995.

LAGUERRE, G.; BARDIN, M.; AMARGER, N. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hybridization. **Canadian Journal of Microbiology**, Vol. 39, N° 12, p. 1142-1149. 1993

LAMMEL, D. R.; CRUZ, L. M.; MESCOLOTTI, D.; STÜRMER, S. L.; CARDOSO, E. J. B. N. Woody Mimosa species are nodulated by *Burkholderia* in ombrophylous forest soils and their symbioses are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). **Plant Soil**, Vol. 393, N° 1-3, p. 1-12. 2015.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. Leguminosae of the world. **Royal Botanic Gardens**, Kew, Vol. 10, p. 1-3. 2005.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. **Royal Botanic Gardens**, Kew, Vol. 10, p. 1- 369. 1987.

LINDSTROM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N.; The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, Vol. 161, Issue 6, p. 453-463. 2010.

LIU, X. Y.; WANG, E. T.; LI, Y. & CHEN, W. X. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. **Archives of Microbiology**, Vol. 188, Issue 1, p. 1–14. 2007.

LONG, S. R.; Genes and Signals in the Rhizobium – Legume Symbiosis. **Plant Physiology**, Vol. 125, Issue 1, p. 69-72. 1998.

LÓPEZ-LARA, I. M.; BLOK-TIP, L.; QUINTO, C.; GARCIA, M. L.; STACEY, G.; BLOEMBERG, G. V.; LAMERS, G. E. M.; LUGTENBERG, B. J. J; THOMAS-OATES, J. E.; SPAINK, H. P. NodZ of *Bradyrhizobium* extends the nodulation host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals. **Molecular Microbiology**. Vol. 21, Issue 2, 1996.

LUCAS, I. H.; SEGOVIA, L.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PUEPPKE, S. G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 61, p. 2775-2779. 1995.

MAACK, R. **Notas preliminares sobre clima, solo e vegetação do Estado do Paraná. Arquivos de Biologia e Tecnologia.** Curitiba – Paraná, Vol. 3, p. 102-200. 1948.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biología de los Microorganismos,** Madrid – España, 8ª ed., p. 1064. 1999.

MARCHIORI, J. N. C.; SIEGLOCH, A. M.; PEREIRA, A. C. S.; Anatomia do lenho de *Mimosa micropteris benth.* **Balduinia**, Vol. 40, p. 18-22. 2013.

MARTINEZ, E.; ROMERO, D.; PALACIOS, R.; The *Rhizobium* genome. **Reviews in Plants Science**, Vol. 9, Issue 1, p. 59-93. 1990.

MELO, M. S.; MORO, R. S. & GUIMARÃES, G. B. 2007. **Os Campos Gerais do Paraná.** In: MELO, M. S.; MORO, R. S.; GUIMARÃES, G. B. (Eds.). Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná. Ponta Grossa: Ed. UEPG, p. 288. 2008.

MENDONÇA, R. C. J. M.; FELFILI, B. M. T.; WALTER, M. C.; SILVA, J. R. A. V.; REZENDE, T. S.; FILGUEIRAS; P. E. N. SILVA. Flora vascular do cerrado, p.288-556. In S.M. SANO; S.P. ALMEIDA (EDS.), **Cerrado: Ambiente e flora.** Planaltina, EMBRAPA-CPAC, p. 556. 1998.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL E. V.; HESS P. N. AND MARTÍNEZ-ROMERO E. 2006. Molecular phylogeny base on the 16S rRNA gene of elite rhizobial stains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, Vol. 29, Nº 1, p. 315-322. 2006.

MICHIELS, J.; FAUVART, M.; Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. **FEMS Microbiology letters**, Vol. 285, Issue 1, p. 1-9. 2008.

MINAMISAWA, K.; ITAKURA, M.; SUZUKI, M.; ICHIGE, K.; ISAWA, T.; YUHASHI, K.; MITSUI, H. Horizontal transfer of nodulation genes in soils and microcosms from *Bradyrhizobium japonicum* to *B. elkanii*. **Microbiology Environmental**, Vol. 17, p. 82-92. 2002.

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

MOLIN, J.; MOLIN, S. Case: Complex adaptive systems ecology. **Advances in Microbial Ecology**, Vol. 15, p. 27-79. 1997.

MORGANTE, C.; ANGELINI, J.; CASTRO, S.; FABRA, A. Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut. **Soil Biology and Biochemistry**, Vol. 37, Issue 8, p. 1436-1444. 2007.

MORO, R. S.; CARMO, M. R. B. A vegetação campestre nos Campos Gerais. In: MELO, M. S.; MORO, R. S. & GUIMARÃES, G. B. (Eds.). **Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná**. Ponta Grossa: Ed. UEPG. 2007.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**, Vol. 200, Issue 50, p. 411-948. Erratum in: **Nature**, Vol. 200, Issue 50, p. 412-926. 2001.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C.; Nodulation of legumes by members of the β -subclasse of Proteobacteria. **Nature**, Vol. 411, Nº 1, p. 948-950. 2001.

MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F. B.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiology Ecology**, Vol. 65, Issue 3, p. 383-400. 2008.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de Nitrogênio: Estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, Vol. 26, Nº 6, p. 872-879. 2003.

OLDROYD; DOWNIE. Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. **The Annual Review of Plant Biology**. Vol. 59, p. 519-546. 2008.

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

OLIVARES, J.; BEDMAR, E. J.; SANJUÁN, J. Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change. **Molecular Plant- Microbe Interactions**, Vol. 26, Nº 5, p. 486-494. 2013.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS, J. R. A. F. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, Vol. 26, Nº 1, p. 204-210. 2006.

ORMEÑO-ORILLO, E.; MENNA, P.; ALMEIDA, L. G. P.; OLLERO, F. J.; NICOLÁS, M. F.; RODRIGUES, E. P.; NAKATANI, A. S.; BATISTA, J. S. S.; CHUEIRE, L. M. O.; SOUZA, R. C.; VASCONCELOS, A. T. R.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium sp.* PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, Vol. 13, Issue 735, p. 2-26. 2012.

OVERBECK, G. E.; LER, S. C. M.; FIDELIS, A.; PFADENHAUER, J.; PILLAR, V. D.; BLANCO, C. C.; BOLDRINI, I. I.; BOTH, R.; AND FORNECK, E. D. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. **Perspect Plant Ecology Evolution Systematic**, Vol. 9, Nº 1, p. 101-116. 2007.

PARKER, M. A.; WURTZ, A. K. & PAYNTER, Q. Nodule symbiosis of invasive *Mimosa pigra* in Australia and in ancestral habitats: a comparative analysis. **Biological Invasions**, Vol. 9, Issue 2, p. 127-138. 2007.

QUEIROZ, L. P. **Sistemática e filogenia do gênero *Camptosema*, W. J. Hook & Arn. (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoaleae)**. Tese de Doutorado Universidade de São Paulo, SP. p. 259. 2009.

RAMBO, B. 1966. **Leguminosae riobrandenses**. São Leopoldo, Instituto Anchietano de Pesquisas, Vol. 23, p. 21-46. 1966.

REIS, J. R. F. B.; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEV, R. M.; ELLIOTT, G. N.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; QUEIROZ, L. P.; SCOTTI, M. R.; CHEN, W. M.; NORÉN, A.; RUBIO, M. C.; FARIA, S. M.; BONTEMPS, CYRIL.; GOI, S. R.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. P. W.; JAMES, E. K.; Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa spp.* in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, Vol. 186, Issue 4, p. 934 - 946. 2010.

RIVAS, R.; FRAILE, P. G.; VELAZQUEZ, E. Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes. **Microbiology insights**, Vol. 2, Nº 1, p. 51-69. 2009.

RUBIO, L. M.; LUDDEN, P. W. Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. **Annual Review of Microbiology**. Vol. 62, Issue 1, p. 1-487. 2008

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia* : proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Evolutionary and Genomic Microbiology**, Vol. 5, Issue 429, p. 1-22. 2014.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A.; Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual reviews of Cell Biology**, Vol. 32, p. 1 – 697. 1998.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, E.; RATET, P.; BUIRE, M.; and KONDOROSI, A. Cell and Molecular Biology of *Rhizobium*-Plant. **International Review of Cytology**. Vol. 156, Nº 1, p. 1-75. 1994

SCHWARTSBURD, P. B.; RABELO, L. S. Schizaeales (Filicopsida, Tracheophyta) of Viçosa, Minas Gerais, Brazil, with special reference to hybrids. **Brittonia**, Vol. 68, Nº 4, p. 379-396. 2016

SHIRAISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, Vol. 33, Nº 1, p. 269-274. 2010.

SILVA, P. A.; RABELO, V. M.; CALIXTO, J. M. R.; COELHO, P. O.; GORSKI, I. C.; Quality assessment of coffee grown in Campos Gerais, Minas Gerais State, Brazil. **Technology Acta Scientiarum**. Vol. 36, Nº 4, p. 739 – 743. 2014.

SIMON, M. F.; PROENÇA, C. Phytogeographic patterns of *Mimosa* (*Mimosoideae*, *Leguminosae*) in the Cerrado biome of Brazil: na indicator genus of high-altitude centers of endemismo. **Biological Conservation**, Vol. 96, Nº 3, p. 279-296. 2000.

SMYKAL, P.; COYNE, C. J.; AMBROSE, M. J.; MAXTED, N.; SCHAEFER, H.; BLAIR, M. W.; STEPHANIE, J. B.; GREENE, L.; NELSON, M. N.; BESHARAT, N.; VYMYSLICKY,

T.; TOKER, C.; SAXENA, R. K.; ROORKIWAL, M.; PANDEV, M. K.; HU, J.; LI, Y. H.; WANG, L. X.; GUO, W. Y.; QIU, L. J.; REDDEN, R. J.; VARSHNEV, R. K. Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Vol. 34, Issue 1-3, p. 43-104. 2015.

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

SOUZA, V.; LORENZI, H.; **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**. Baseado em APG II. 2ª Ed. 2008.

TACÃO, M.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M. J.; CORREIA, A. BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. **Antonie van Leeuwenhoek**, Vol. 88, p. 173-179. 2005.

TAKEDA, A.K. **Unidades de conservação da região dos Campos Gerais, Paraná**. Publicatio UEPG, Ponta Grossa, Vol. 7, Nº 1, p. 57-78. 2001.

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**, Vol. 10, Issue 3, p. 512-526. 1993.

TAURIAN, T.; ANGELINI, J.; MORGANTE, C.; CASTRO, S.; FABRA, A.; Mejoramiento de la fijación biológica del nitrógeno como estrategia para incrementar la producción de cultivos de leguminosas manteniendo la fertilidade del recurso suelo. **Molecular Physics**, Vol. 100, p. 705-715. 2003.

THOMPSON, C. C.; CHIMETTO, L.; EDWARDS, R. A.; SWINGS, J.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. L. Microbial genomic taxonomy. **BMC Genomics**, p. 14-913. 2013.

TREVORS, J. T.; Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically – contaminated, soil. **Water, Air and Soil Pollution**, Vol. 101, Issue 1, p. 45-67. 1998.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Vol. 60, Nº 2, p. 407-438. 1996.

VELOSO, H. P.; RANGEL FILHO, A. L.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, p. 123. 1991.

VERMA, S. C., LADHA, J. K., TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Vol. 91, p. 127–141. 2001.

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

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. Book : A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. p. 100-164. 1970.

VINUESA, P.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. de; WERNER, D. Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding a 16S rRNA and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 64, p. 2096-2104. 1998.

VIRGINIA, A. R.; WALL, D. H. Controls on soil biodiversity: insights from extreme environments. **Applied Soil Microbiology**, Vol.13, Issue 2, p. 137-150. 1999

WALL, D. H.; VIRGINIA, R. A.; Controls on soil biodiversity: insights from extreme environments. **Applied Soil Ecology**, Vol. 13, Nº 1, p. 137-150. 1999.

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.

WEIR, B. S.; TURNER, S. J.; SILVESTER, W. B.; PARK, D. C.; YOUNG, J. M.; Unexpectedly Diverse *Mesorhizobium* Strains and *Rhizobium leguminosarum* Nodulate Native Legume Genera of New Zealand, while Introduced Legume Weeds Are Nodulated by *Bradyrhizobium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 70, Nº 10, p. 5980-5987. 2004.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Vol. 173, Nº 2, p. 697-703. 1991.

ZAAT, S. A. J.; SCHRIJPEMA, J.; WIJFFELMAN, C. A.; BRUSSEL, A. A. N. V.; LUGTENBERG, B. J. J.; Analysis of the major inducers of the *Rhizobium nodA* promoter from *Vicia sativa* root exudate and their activity with different *nodD* genes. **Plant Molecular Biology**, Vol. 12, Issue 2, p. 175-188. 1989.

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**, Vol. 5, Issue 7, p. 539 – 554. 2003.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FILHO, F. R. F.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Vol. 41, Nº 5, p. 811-818. 2006.