

UFRRJ
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E FLORESTAIS

DISSERTAÇÃO

**Biogeografia de rizóbios de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*
Benth.) isolados dos biomas Caatinga e Mata Atlântica**

ISABELLY SANTOS ROSADO DE OLIVEIRA

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E FLORESTAIS**

**BIOGEOGRAFIA DE RIZÓBIOS DE SABIÁ (*Mimosa caesalpinifolia*
Benth.) ISOLADOS DOS BIOMAS CAATINGA E MATA ATLÂNTICA**

ISABELLY SANTOS ROSADO DE OLIVEIRA

Sob a Orientação do Pesquisador
Sergio Miana de Faria

e

Co-orientação do Pesquisador
Ederson da Conceição Jesus

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Conservação da Natureza.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pela autora

S48b Santos Rosado de Oliveira, Isabelly, 1994-
Biogeografia de rizóbios de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.)
isolados dos biomas Caatinga e Mata Atlântica / Isabelly Santos Rosado de
Oliveira.
- 2018.
63 f.: il.

Orientador: Sergio Miana de Faria. Coorientador: Ederson da
Conceição Jesus. Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências
Ambientais e Florestais, 2018.

1. Fixação Biológica de Nitrogênio. 2. Beta-rizóbios.
3. Filogenia. I. Miana de Faria, Sergio, 1958-, orient. II. da
Conceição Jesus, Ederson, 1979-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em
Ciências Ambientais e Florestais. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS**

ISABELLY SANTOS ROSADO DE OLIVEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, área de Concentração em Conservação da Natureza.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2018.

Ederson da Conceição Jesus

Ederson da Conceição Jesus. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Co-orientador)

Marcia Reed Rodrigues Coelho

Marcia Reed Rodrigues Coelho. Dr^a. Embrapa Agrobiologia

Irene da Silva Coelho

Irene da Silva Coelho. Dr^a. UFRRJ

DEDICATÓRIAS

Dedico esta obra, com muito amor

À memória do meu avô César.

À minha avó Lucia

Aos meus pais Joel e Cristiane.

Ao meu marido Leandro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por seu imenso amor e infinita bondade, sem Ele eu não conseguiria chegar até aqui.

Agradeço a minha mãe, Cristiane Santos, por todo amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e ao meu pai, Joel Augusto, por todo carinho e incentivo.

Agradeço a minha avó Lucia, minha segunda mãe, por iluminar a minha vida com suas orações e por cuidar de mim até hoje com tanta dedicação.

Agradeço ao meu marido, Leandro Coutinho, meu parceiro de vida, por todo seu amor, carinho, paciência e por compartilhar comigo dos piores e melhores momentos. Sou grata por me apoiar incondicionalmente e por não me deixar desanimar.

Agradeço aos meus queridos cunhados Bruna e Bruno por todo apoio e pelo presente que me proporcionaram: ser madrinha do Bernardo, é uma relação incrível e de muito amor, que me proporcionou alegrias e renovo em momentos de tristeza e cansaço.

Agradeço ao meu orientador Sergio Miana, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela confiança que depositou em mim e pelo conhecimento compartilhado.

Agradeço ao meu co-orientador e amigo Ederson Jesus, por toda sua paciência e dedicação em me ajudar sempre que preciso, pelos conselhos e pela parceria desde os tempos da graduação. Tenho o coração extremamente grato por tudo e por poder ter convivido com um grande exemplo para mim.

Agradeço aos queridos amigos que sempre estiveram ao meu lado: Gabriela Queiroz, Juliana Thompson, Luciano Santos (meu irmão), Yago Martins, Liandra Alvarez e a minha prima Caroline Rosado, por me ajudar em tantos momentos de crise e por me oferecer tantas palavras de conforto e incentivo, mesmo que de longe, isso foi muito importante para mim.

Agradeço a minha amiga, companheira e “fiel escudeira” Maura Santos, compartilhamos muitos momentos desde a graduação, dos mais alegres aos tristes, dos fáceis aos mais difíceis, e sua parceria foi fundamental. Sou grata a Deus pela sua vida, sem você com certeza seria tudo mais complicado. A amizade que construímos proporcionou leveza mesmo nos momentos mais tensos, pois fomos capazes de sorrir juntas e erguer a cabeça com a força de Deus.

Agradeço ao Roberto Carlos, além de um funcionário da Embrapa, um grande amigo, que me ajudou e auxiliou em todos os momentos com muito carinho e que sempre está disposto a me ouvir e me aconselhar. Sou muito grata por essa preciosa amizade que levarei para a vida toda.

Agradeço ao meu amigo Thiago Gonçalves, sempre disposto a me ajudar. Obrigada pela paciência, pela troca de experiências, orientações e pela imensa ajuda, que foi fundamental, principalmente nesta etapa final de muita tensão para mim.

Agradeço a Fernanda Dourado, uma querida funcionária da Embrapa, por toda paciência e auxílio na fase de preparação das amostras para o sequenciamento. Uma pessoa disponível e muito cuidadosa, sua ajuda foi essencial.

Agradeço aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Leguminosas Florestais, em especial ao Felipe Ferreira e a Thainá Santos, que me ajudaram muito na fase das disciplinas com a “temida” estatística e em outros momentos desta jornada, sou muito grata pelo apoio que me ofereceram com muito carinho e atenção. Agradeço também ao analista do laboratório, Marcelo Antoniol e aos técnicos Adriana e Fernando Cunha, pela ajuda e suporte quando precisei.

Agradeço a UFRRJ e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais pela oportunidade e suporte ao longo do mestrado.

Agradeço a Embrapa Agrobiologia pela estrutura e o material necessário à realização deste trabalho e a CAPES pelo suporte financeiro.

A todos os meus mais sinceros agradecimentos!

BIOGRAFIA

Isabelly Santos Rosado de Oliveira nasceu aos 4 dias do mês de Maio de 1994, no bairro Campo Grande, município e Estado do Rio de Janeiro. Filha de Cristiane Santos Rosado de Oliveira e Joel Augusto Rosado de Oliveira, conclui em 2011 o ensino médio na Escola Santa Bárbara (ESB). Em 2012, ingressou no Curso de Ciências Biológicas no Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), foi bolsista de iniciação científica do CNPq de outubro de 2013 a fevereiro de 2016, quando obteve a titulação de bacharela em Ciências Biológicas. Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado na UFRRJ, junto ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais, área de concentração Conservação da Natureza, desenvolvendo as análises experimentais na Embrapa Agrobiologia-CNPAB, sob a orientação do PhD. Sergio Miana de Faria e co-orientação do Dr. Ederson da Conceição Jesus.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

RESUMO

DE OLIVEIRA, Isabelly Santos Rosado. **Biogeografia de rizóbios de sabiá (*Mimosa caesalpiinifolia* Benth.) isolados dos biomas Caatinga e Mata Atlântica.** 2018. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Departamento de Conservação da Natureza. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O sabiá (*Mimosa caesalpiinifolia* Benth.) é uma espécie lenhosa da família Fabaceae (Leguminosae) nativa do bioma Caatinga e que foi introduzida com sucesso em outros biomas, como o Cerrado e a Mata Atlântica. Esta espécie possui alto potencial para usos como: cerca viva, lenha, carvão entre outras utilidades. O sucesso na adaptação em diferentes biomas brasileiros pode estar relacionado com a capacidade dessa espécie em se associar simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio, chamadas genericamente de rizóbios, em especial aos beta-rizóbios do gênero *Paraburkholderia*. Dentro desse contexto, estudou-se a filogenia de estirpes de bactérias que estariam envolvidas nessa simbiose nos biomas Caatinga e Mata Atlântica. O objetivo deste trabalho foi estudar as relações filogenéticas entre as estirpes de rizóbios provenientes do estado do Rio de Janeiro e de regiões de onde o sabiá é nativo, de modo a desvendar a relação entre o simbiote e a introdução bem-sucedida da espécie em outros ambientes. Foram selecionados isolados que foram cultivados e caracterizados morfológicamente em meio 79 e autenticados em casa de vegetação em condições estéreis. Em seguida, foi realizada a caracterização molecular por BOX-PCR, o sequenciamento dos genes 16S rRNA, *recA* e *nifH* e a construção das árvores filogenéticas por meio de programas de bioinformática. Os resultados mostraram que o sabiá se associou preferencialmente a bactéria *Paraburkholderia sabiae* em solos do bioma Mata atlântica, além de nodular com bactérias do gênero *Rhizobium*. Já, em seu bioma de origem, o simbiote encontrado foi predominantemente a *Paraburkholderia diazotrophica*; apenas um isolado proveniente do Rio Grande do Norte, foi classificado como *Paraburkholderia symbiotica*. A classificação taxonômica e a divisão baseada na localidade foram suportadas tanto pela filogenia do gene 16S rRNA quanto pela do gene *recA*. A filogenia do gene *nifH* também separou os isolados de acordo com seu local de origem. Contudo, ao contrário do que foi observado para os demais genes, a *P. phymatum* se apresentou evolutivamente mais próxima de *P. diazotrophica* do que de *P. sabiae*, indicando a ocorrência de uma transferência horizontal desse gene entre as duas primeiras espécies. Os resultados aqui apresentados demonstram a capacidade de adaptação da espécie a populações bacterianas nativas do Sudeste do Brasil.

Palavras-Chave: Fixação Biológica do Nitrogênio; Beta-rizóbios; Filogenia.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Isabelly Santos Rosado. **Biogeography of rhizobia of sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) isolated from the biomes Caatinga and Atlantic Forest.** 2018. 63p. Dissertation (Master in Environmental and Forest Sciences). Institute of Forestry, Department of Nature Conservation Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) is a woody legume species native to the Caatinga, and which has been successfully introduced in other Brazilian biomes, such as the Cerrado and the Atlantic Forest. This species has high potential for several uses such as hedge, wood, and coal, among others. Its successful adaptation to different biomes may be related to its ability to associate symbiotically with nitrogen-fixing bacteria called rhizobia, in particular to beta-rhizobia of the genus *Paraburkholderia*. In this context, we studied the phylogeny of rhizobia strains that are involved in this symbiosis in the Caatinga and in the Atlantic Forest. The objective of this work was to study the phylogenetic relationships between rhizobia strains from Rio de Janeiro, where sabiá was introduced, and from regions where this legume is native to discover the relationship between the symbiont and the successful introduction of this species into a new environment. The morphological characterization of the isolates was carried out in yeast-mannitol agar and they were authenticated under sterile conditions in a glasshouse. The genotypic characterization of those strains was carried out by BOX-PCR, and representative strains were chosen for sequencing of the 16S rRNA, *recA*, and *nifH* genes, followed by phylogenetic analysis with bioinformatics programs. The results showed that sabiá was mainly associated with *Paraburkholderia sabiae* in the Atlantic Forest, besides nodulating with *Rhizobium*. *Paraburkholderia diazotrophica* was the predominant symbiont in the Caatinga, with only one isolate from Rio Grande do Norte belonging to *P. symbiotica*. Both the taxonomic classification and the separation of strains by location were supported by the 16S rRNA, and *recA* phylogenies. The strains were also separated by location in the *nifH* phylogeny, however, differently from what was observed with the other genes, *P. phymatum* was phylogenetically closer to *P. diazotrophica* than to *P. sabiae*, indicating a possible horizontal transfer event between the first two species. The results presented herein demonstrate the ability of sabiá to adapt to bacterial populations native to the Southeast.

Keywords: Biological Nitrogen Fixation; Beta-rhizobia; Phylogeny.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados no estudo e condições das reações de amplificação.....	14
Tabela 2A: Discriminação da origem dos isolados e/ou amostras de solo, número de isolados selecionados no início do estudo, seus respectivos códigos e coordenadas geográficas (quando informada).....	41
Tabela 3B: Descrição das características morfológicas em meio de cultivo 79 com azul de bromotimol de 83 isolados de nódulos de sabiá de diferentes localidades entre as regiões Nordeste e Sudeste do Brasil.	42
Tabela 4C: Discriminação dos 22 isolados que foram selecionados após a análise de BOX-PCR agrupados de acordo com o local de origem, com exceção das duas estirpes de referência, que foram utilizados nas análises filogenéticas dos genes 16SrRNA, <i>recA</i> e <i>nifH</i>	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Dendrograma de similaridade dos perfis dos produtos obtidos na análise de BOX-PCR de 33 bactérias isoladas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. de municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. O dendrograma foi construído utilizando-se o índice de Dice e o método UPGMA. As delimitações em vermelho indicam os grupos formados e a seta vermelha indica o ramo mais externo. Códigos: SAB e P1 (Seropédica-RJ); P3 (Itaguaí-RJ); PM e P4 (Mangaratiba-RJ); JUA (Juazeiro-BA); CPATSA (Embrapa Semi-Árido-Petrolina-PE); RN (Natal-RN). 17

Figura 2: Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. em municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. O método utilizado para a construção da árvore foi o de Máxima Verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros (1992). As delimitações em vermelho indicam os Clados dentro do grupo das β -proteobactérias e o grupo formado pelas α -proteobactérias. Códigos: SAB e P1 (Seropédica-RJ); P3 (Itaguaí-RJ); PM e P4 (Mangaratiba-RJ); JUA (Juazeiro-BA); CPATSA (Embrapa Semi-Árido-Petrolina-PE); RN (Natal-RN). 19

Figura 3: Árvore filogenética baseada em sequências do gene *recA* de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa caesalpinifolia* Benth em municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. O método utilizado para a construção da árvore foi o de Máxima Verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros (1992). As delimitações em vermelho indicam os Clados dentro do grupo das β -proteobactérias e o grupo formado pelas α -proteobactérias. Códigos: SAB e P1 (Seropédica-RJ); P3 (Itaguaí-RJ); PM e P4 (Mangaratiba-RJ); JUA (Juazeiro-BA); CPATSA (Embrapa Semi-Árido-Petrolina-PE); RN (Natal-RN). 21

Figura 4: Árvore filogenética baseada em sequências do gene *nifH* de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa caesalpinifolia* Benth em municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. O método utilizado para a construção da árvore foi o Máxima Verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura-Nei (1993). As delimitações em vermelho indicam os Clados. Códigos: SAB e P1 (Seropédica-RJ); P3 (Itaguaí-RJ); PM e P4 (Mangaratiba-RJ); JUA (Juazeiro-BA); CPATSA (Embrapa Semi-Árido-Petrolina-PE); RN (Natal-RN). 23

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

BOX – sequências repetitivas interespaçadas de DNA;
Câmara B.O.D – do inglês *Biochemical Oxygen Demand* é uma estufa incubadora controlada;
DNA – ácido Desoxirribonucléico;
dNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatados;
FBN – fixação biológica do nitrogênio;
Kb – tamanho do fragmento de DNA por 1000 pares de base;
Método UPGMA – do inglês *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages* é um simples método estatístico de agrupamento hierárquico;
MLSA - *Multilocus Sequencing Analysis*;
μl – microlitro;
NCBI – *Nacional Center for Biotechnology Information*;
pb – pares de bases, correspondentes ao comprimento do DNA;
PCR – reação em cadeia da DNA polimerase;
rpm – rotações por minuto;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 Reclassificação das subfamílias de Fabaceae (Leguminosae) e a espécie <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth. (sabiá)	4
3.2 Nodulação.....	5
3.3 Nitrogênio e Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN).....	5
3.4 Taxonomia de microrganismos	6
3.4.1 Breve histórico da taxonomia dos rizóbios.....	7
3.4.2 O gênero <i>Burkholderia</i>	8
3.4.3 Reclassificação das espécies ambientais de <i>Burkholderia</i> no gênero <i>Paraburkholderia</i>	9
3.4.4 O gênero <i>Paraburkholderia</i>	9
3.5 Preferência do gênero <i>Mimosa</i> por <i>Paraburkholderia</i> no Brasil	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Origem dos isolados.....	11
4.2 Caracterização morfocultural	11
4.3 Experimento de autenticação	11
4.4 Análises Moleculares	12
4.4.1. Extração de DNA	12
4.4.2. Análise de BOX-PCR	12
4.4.3. Amplificação dos genes 16S rRNA, <i>recA</i> e <i>nifH</i>	13
4.4.4 Sequenciamento e montagem de contigs	15
4.4.5 Alinhamentos e análises filogenéticas	15
5. RESULTADOS	16
5.1 Experimento de autenticação	16
5.2 Análises Moleculares	16
5.2.1 BOX-PCR.....	16
5.2.2 Filogenia dos genes 16S rRNA, <i>recA</i> e <i>nifH</i>	18
6. DISCUSSÃO	24

6.1 Distribuição de simbiontes de sabiá entre municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil	24
6.2 Árvores filogenéticas dos genes 16SrRNA, <i>recA</i> e <i>nifH</i>	25
6.3 Ocorrência de α-proteobactérias do gênero <i>Rhizobium</i> em simbiose com o sabiá no bioma Mata Atlântica.....	26
6.4 Características do solo influenciam o padrão de distribuição dos simbiontes em <i>Mimosa spp</i>	27
7. CONCLUSÕES.....	29
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS	41
ANEXO A.....	41
ANEXO B.....	42
ANEXO C:	47

1. INTRODUÇÃO

A família Fabaceae (Leguminosae) é uma das mais significativas dentre as angiospermas, pois possui espécies amplamente distribuídas em toda faixa tropical e em regiões temperadas. São reconhecidos 770 gêneros e cerca de 19.500 espécies (LEWIS et al., 2005; LPWG 2013a). Além disso, ela é uma das famílias botânicas com maior variedade de plantas superiores e está presente em quase todos os biomas brasileiros (ALLEN & ALLEN, 1981; FELFILI et al., 1993; MOREIRA et al., 1992; SOLBRIG, 1996).

Atualmente reclassificado dentro da subfamília Caesalpinioideae, no clado Mimosoid (AZANI et al., 2017), o gênero *Mimosa* possui cerca de 400 espécies, que podem ser encontradas em diferentes ambientes. Dentre as espécies desse gênero, o sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) é nativo do Nordeste do Brasil, onde predomina o bioma Caatinga, e caracterizado por seu rápido crescimento, sua alta capacidade de regeneração e resistência ao tempo seco. Além disso, o sabiá pode ser utilizado como fonte de alimento para o gado, tem potencial para a produção de estacas e varas, possui valor apícola e paisagístico e é de grande utilidade em plantios de recuperação de áreas degradadas (PASSOS et al., 2007; BABIC et al., 2008; CARVALHO, 2007).

O sabiá é capaz de se associar a bactérias fixadoras de N₂, genericamente conhecidas como rizóbios, em especial aos beta-rizóbios, constituídos principalmente por espécies do gênero *Paraburkholderia* (anteriormente classificados em *Burkholderia*) (SAWANA et al., 2014). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) constitui-se na quebra da tripla ligação covalente de grande estabilidade entre os átomos de nitrogênio atmosférico e, apenas uma parcela de espécies de procariotos, consegue converter enzimaticamente N₂ em N disponível e assimilável pela planta (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A FBN em leguminosas ocorre em estruturas radiculares conhecidas como nódulos, a formação destes nódulos é considerada complexa, e envolve mudanças significativas tanto na planta hospedeira quanto na bactéria (HUNGRIA et al., 2001).

A capacidade do sabiá de nodular eficientemente com os rizóbios, pode estar diretamente relacionada à boa adaptação da espécie ao ambiente do Rio de Janeiro, onde predomina o bioma Mata Atlântica. Pode-se dizer que, essas bactérias desempenharam papel crítico na introdução bem-sucedida dessa espécie em um local de não ocorrência natural e que, devido a isso, o sabiá se tornou um modelo de estudo em potencial para se compreender como a interação com microrganismos simbiotes influencia a adaptação de espécies vegetais a novos habitats.

Diante disso, é importante entender como as plantas e os microrganismos estão distribuídos em diferentes regiões, sendo o estudo da biogeografia e de técnicas que dão suporte a ela, fundamental para este fim. Os estudos da diversidade genética e da relação entre os parceiros simbiotes se utilizam técnicas biotecnológicas como, por exemplo, o uso de marcadores moleculares (XAVIER et al., 2006; BONTEMPS et al., 2010; LEMAIRE et al. 2016). O uso destes marcadores permitiu uma grande evolução na análise de perfis de DNA, na biologia da conservação, na genética de populações e em estudos de filogenia (KUZNETSOVA et al., 2005; LI, CHEN e ZHANG, 2005; HAO et al., 2006; ZHANG et al., 2007; KOCHIEVA et al., 2006).

Dentre os genes que são utilizados como marcadores em estudos de filogenia e taxonomia, estão: o gene 16SrRNA, o *recA*, e os genes simbióticos como o *nifH* e o *nodC*. Além disso, o *fingerprint* genômico (“impressão digital”) utilizando iniciadores específicos, como o BOX, também é aplicado nos estudos de genética de microrganismos para traçar perfis e agrupá-los de acordo com as similaridades (MENNA et al., 2006; TORRES et al., 2008).

Os estudos de biogeografia e diversidade de microrganismos são baseados em informações geradas por esses marcadores moleculares (BONTEMPS et al., 2010; BOURNAUD et al. 2013; LEMAIRE et al.,2016) e em conhecimentos geográficos prévios acerca do local de ocorrência das espécies vegetais e das propriedades dos solos nos quais elas se desenvolvem (PIRES et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar estirpes de rizóbios de sabiá provenientes do Estado do Rio de Janeiro, bioma Mata Atlântica, com estirpes isoladas das regiões de onde essa leguminosa é nativa, bioma Caatinga, visando estudar a sua biogeografia e a influência do endossimbionte na adaptação, estabelecimento e crescimento da espécie.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização morfológica dos rizóbios associados ao sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.);
- Realizar a autenticação das estirpes em casa de vegetação em condições estéreis;
- Realizar a caracterização genotípica das estirpes com a técnica de BOX-PCR e o sequenciamento dos genes 16SrRNA, *recA* e *nifH*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Reclassificação das subfamílias de Fabaceae (Leguminosae) e a espécie *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (sabiá)

A família Fabaceae (Leguminosae) tem sido foco de inúmeros estudos filogenéticos, e todos indicam que a classificação em três subfamílias (Caesalpinioideae DC., Mimosoideae DC. e Papilionoideae DC.) está ultrapassada (KAJITA et al., 2001; LAVIN et al., 2005; BRUNEAU, 2008; SIMON et al., 2009; CARDOSO et al., 2013b; LPWG, 2013a). Isto se deve ao fato destas subfamílias tradicionais terem sido classificadas essencialmente com base em características florais e, apesar da importância desses caracteres, estes estão muito mais propensos às modificações evolutivas e interferências ambientais, especialmente quando se fala em simetria floral (AZANI et al., 2017).

A intenção com esta nova classificação é manter a utilidade dos grupos já conhecidos e, ao mesmo tempo, refletir corretamente as relações evolutivas e as características distintas em cada uma das subfamílias. As relações entre os principais grupos dentro de Caesalpinioideae, por exemplo, são consideradas, ainda, mal resolvidas e, os “mimosoides” apesar de morfologicamente distintos, fazem parte agora de um clado dentro desta subfamília (AZANI et al., 2017).

Após a identificação de divergências na filogenia de Fabaceae, seis subfamílias foram reconhecidas e nomeadas da seguinte forma: Duparquetioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Caesalpinioideae (que inclui o clado mimosoid) e Papilionoideae (AZANI et al., 2017). Vale destacar que, a anteriormente classificada como subfamília, Mimosoideae, agora é um clado dentro de Caesalpinioideae: o clado Mimosoid, composto por mais de 3.300 espécies e que possui todos os gêneros pertencentes a antiga Mimosoideae mais o gênero *Chidlowia*, e dentre eles está o gênero *Mimosa* L.

Dentre as espécies de *Mimosa* está a *Mimosa caesalpinifolia* Benth., conhecida popularmente como sabiá. Ela ocorre naturalmente nos estados do Rio Grande do Norte, Piauí e Ceará (RIBASKI et al., 2003) e é uma espécie pioneira, com alta capacidade de regeneração e resistência à seca (BALBINO et al., 2010). Ela pode ser encontrada também em povoamentos artificiais do Maranhão à Bahia (RIZZINI, 1995) bem como em regiões úmidas dos Estados da Paraíba, Rio de Janeiro (Baixada Fluminense e Planaltos Fluminenses) e São Paulo (Vale do Paraíba do Sul e Planaltos Paulistas) (GOMES, 1977; MENDES, 1989).

O sabiá é encontrado naturalmente em terrenos profundos e principalmente em solos de textura arenosa, o tronco é geralmente dotado de acúleos em maior ou menor grau e o caule espinhoso na idade jovem (CARVALHO, 2007). Espontaneamente ocorre em áreas de caatinga semi-úmidas com precipitações que variam de 600 a 1.000 mm ou em áreas mais secas, onde as temperaturas médias estão entre 20° C e 28° C, com déficit hídrico. Nesse caso, apresenta forma mais arbustiva com o tronco polifurcado (RIBASKI et al., 2003).

A espécie na idade adulta pode atingir 10 m de altura por 30 cm de diâmetro a 1,30 m do solo, seu aspecto é entouceirado e apresenta uma boa capacidade de rebrota (LORENZI, 2000). As folhas são bipinadas, geralmente com seis pinas opostas de 3 a 8 cm de comprimento e as flores são brancas, monóclinas, pequenas e axilares, reunidas em espigas cilíndricas de 5 a 10 cm de comprimento (RIZZINI E MORHS, 1976). O fruto é um craspédio plano com 70 a 100 mm x 10 a 13 mm x 1,0 a 1,2 mm (comprimento x largura x espessura) dividido em 5 a 9 artigos quadrangulares, presos por dois filamentos fibrosos laterais (CARVALHO, 2007).

As sementes são lisas, duras e pequenas, medindo 5-8 mm de diâmetro e possuem altos níveis de dormência tegumentar (LORENZI, 2000), fazendo com que tratamentos de quebra de dormência sejam realizados, tais como: a imersão das sementes em água quente

(OLIVEIRA et al., 2003) e imersão, sem envoltório, em ácido sulfúrico concentrado (PASSOS et al., 2007). As raízes são caracterizadas como espessas, longas e numerosas e podem atingir os seis metros de comprimento, favorecendo a absorção de água das chuvas e a produção de folhagem antes das outras espécies da Caatinga (MENDES, 2001).

O sabiá possui a capacidade de se associar com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. A simbiose pode ocorrer com membros da família *Rhizobiaceae*, pertencente à classe α -*Proteobacteria*, e também com membros da classe β -*Proteobacteria*, como a *Paraburkholderia sabiae*, que foi isolada de nódulos dessa planta, indicando que o sabiá se associa preferencialmente a espécies deste gênero (ELLIOTT, 2007; CHEN et al., 2008b).

Muitos estudos realizados com espécies do gênero *Mimosa* têm demonstrado que as β -proteobactérias desempenham um papel fundamental na fixação de nitrogênio em associação com plantas leguminosas (CHEN et al., 2005a; ELLIOTT et al., 2009; GYANESHWAR et al., 2011; BONTEMPS et al., 2010; REIS JUNIOR et al., 2010) e, atualmente, este gênero tem sido utilizado como modelo para estudos envolvendo associações simbióticas (PIRES et al., 2017).

3.2 Nodulação

O evento da nodulação nas leguminosas, provavelmente, é resultado de um processo evolutivo que lhes conferiu a capacidade de fornecer nitrogênio para suprir a alta necessidade desta família (MCKEY, 1994), os nódulos são novos órgãos altamente especializados que consistem em células infectadas das plantas com bacteróides. Dentro dos nódulos, as bactérias assumem esta forma endossimbionte, o bacterióide, que é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônio.

A formação de um simples nódulo é resultado de um processo complexo que envolve diversos estágios. Basicamente, as sementes em germinação e as raízes exsudam moléculas que atraem quimicamente os rizóbios, outras que estimulam o crescimento das bactérias na rizosfera da planta e outras que desencadeiam a expressão de diversos genes, tanto na bactéria como na planta hospedeira. Em seguida, as bactérias penetram na raiz, formando os nódulos, onde ficarão alojadas. Quando os nódulos estão em plena atividade apresentam, em sua parte interna, coloração rósea intensa, devido a atividade da leg-Hemoglobina, que tem a mesma função da hemoglobina no sangue humano: o transporte de oxigênio, essencial às funções vitais desses microrganismos aeróbios (HUNGRIA et al, 2001).

O estabelecimento da simbiose pode ocorrer se as bactérias possuem genes necessários ao processo de fixação, como os genes *nif* e *fix*, e ao processo de nodulação, identificados como genes *nod*, *nol* e *noe* (HUNGRIA; STACEY, 1997; MORGANTE, 2003; RIVAS; GARCÍA-FRAILE; VELÁZQUEZ, 2009). Dentre os genes requeridos à nodulação, o gene *nodC* por exemplo, é frequentemente usado para entender as especificidades simbióticas, pois está envolvido na síntese dos lipo-quito-oligossacarídeos, ou fatores de nodulação (Fatores Nod). São esses fatores que induzem a expressão dos genes de nodulação nas raízes das leguminosas, dando início ao processo de formação do nódulo. Além dos fatores Nod, existem outros compostos como carboidratos, proteínas e polissacarídeos presentes na célula do simbionte que auxiliam no processo de infecção das raízes da planta (BROUGHTON et al, 2006).

3.3 Nitrogênio e Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio (N) é o macronutriente exigido em maior quantidade pelos vegetais e constitui-se no quarto elemento mais abundante da matéria orgânica, por ser fundamental na estrutura e função de aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, hormônios, clorofila,

entre outros (MORGANTE, 2003). Ele é considerado, juntamente com o fósforo, o nutriente mais limitante aos sistemas de produção (ODUM, 2001; RICKFLES, 2003), principalmente em condições tropicais (FRANCO et al., 1992). Diante disto, processos que tornem a incorporação destes nutrientes viável e sem grandes impactos ao meio ambiente, como por exemplo a fixação biológica do nitrogênio (FBN) que acontece através da simbiose rizóbio-leguminosa, são importantes e devem ser estudados.

A FBN é um processo que consiste, basicamente, na quebra da tripla ligação covalente que confere estabilidade aos átomos do N₂ atmosférico. O nitrogênio é retirado do ar e transformado em amônio, que é utilizado diretamente pela planta. O nitrogênio fixado pode, ainda, ser transformado em nitrato no solo, forma em que também se encontrará disponível para ser assimilado. Vale ressaltar que, apenas uma pequena parte dos procariotos consegue realizar esta conversão enzimática de N₂ em N disponível (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os genes estruturais, que participam do mecanismo de fixação de forma ativa, podem ser utilizados para estudar relações entre espécies de rizóbios. Desde sua descrição em *Klesbiella pneumoniae* (CANNON et al., 1974; DIXON et al., 1980), especificamente o gene *nifH*, tem sido bastante utilizado em estudos filogenéticos e possui um vasto banco de dados. Em diferentes organismos fixadores, são encontrados genes homólogos aos genes *nif*, provavelmente pela presença comum a todos estes microssimbiontes da enzima nitrogenase.

Dentre os sistemas conhecidos, que realizam a FBN, pode-se citar como um bem caracterizado e explorado o da relação simbiótica rizóbio-leguminosa. Os rizóbios são um grupo de bactérias Gram-negativas que abrangem um grupo de α (alfa)-proteobactérias dos gêneros *Allorhizobium* (de LAJUDIE et al., 1998; MOUSAVI et al., 2014), *Aminobacter* (MAYNAUD et al. 2012), *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2006), *Devosia* (RIVAS et al., 2003), *Mesorhizobium* (LARANJO, ALEXANDRE; OLIVEIRA, 2014), *Methylobacterium* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2005b, 2006), *Microvirga* (ARDLEY et al., 2012), *Neorhizobium* (MOUSAVI et al., 2014), *Ochrobactrum* (TRUJILLO et al., 2005) '*Pararhizobium*' (MOUSAVI et al., 2015), *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), (GARRITY; HOLT, 2001) e *Shinella* (LIN et al., 2008) e um grupo de β (beta)-proteobactérias dos gêneros *Burkholderia*, *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2001).

A capacidade das β -proteobactérias em formar nódulos em leguminosas foi descoberta por Moulin et al. (2001), que constatou a capacidade de *Paraburkholderia* em nodular e fixar N₂, e por Chen et al. (2001) que isolou e caracterizou uma espécie nodulante de *Cupriavidus*, o *Cupriavidus taiwanensis*. Estas espécies foram denominadas beta-rizóbios para diferenciá-las dos até então conhecidos alfa-rizóbios (DALL'AGNOL, 2016).

3.4 Taxonomia de microrganismos

A taxonomia consiste em classificar, nomear, e identificar grupos de organismos e é geralmente relacionada à sistemática (COWAN, 1968). A sistemática bacteriana é descrita como um estudo da diversidade e das inter-relações com o objetivo de caracterizar e organizar as bactérias (TRUPER & SCLEIFER, 1991).

A classificação consiste na organização dos organismos em grupos (taxa), com base em características em comum, e a nomeação (ou nomenclatura) é a determinação de nomes para os grupos taxonômicos. A classificação bacteriana se divide em diversos níveis, sendo o maior chamado de Domínio. Para cada Domínio são descritos os Filos, Classes, Ordens, Famílias, Gêneros, espécies e subespécies (GARRITY & HOLT, 2001). Já a identificação tem por objetivo determinar a identidade de um isolado como parte integrante, ou não, de um grupo específico.

Segundo Dall’Agnol (2016) para uma classificação adequada de um determinado microrganismo, deve-se seguir processos rigorosos a fim de evitar dúvidas e equívocos durante o desenvolvimento de pesquisas científicas. Atualmente, diversas ferramentas são utilizadas com o objetivo de se atingir um consenso taxonômico a partir da integração de dados fenotípicos, genotípicos e filogenéticos que fornecem uma definição da verdadeira posição de estirpes dentro de um táxon.

As informações fenotípicas, como por exemplo análises morfofisiológicas, sorologia, perfil de ácidos graxos celulares e exopolissacarídeos (EPS), fornecem dados complementares às informações genéticas e filogenéticas (GILLIS et al., 1995; VANDAMME et al., 1996) e, apesar destas características não fornecerem informações sobre o genoma, elas contribuem para a rápida identificação de um gênero ou um grupo determinado de espécies.

As informações genotípicas, como por exemplo as análises de ácidos nucleicos (DNA e RNA), porcentagem de G+C e sequenciamento de genes, são consideradas mais confiáveis (STACKEBRANDT et al., 2002). Pode-se dizer que, uma revolução biotecnológica aconteceu, após o desenvolvimento da metodologia da reação em cadeia polimerase (PCR - do inglês *Polymerase Chain Reaction*), da hibridação DNA-DNA e do sequenciamento por Sanger, que foram sendo aperfeiçoadas e se tornaram indispensáveis para a taxonomia bacteriana (DALL’AGNOL, 2016).

Além dessas análises, a obtenção de perfis genéticos através de técnicas de *fingerprinting*, como a BOX-PCR, também são utilizadas em estudos de classificação e taxonomia. A metodologia de BOX-PCR é reconhecida pelo seu eficaz poder de discriminação, a amplificação dos elementos *box*, especialmente a subunidade *boxA*, de 54pb e aproximadamente 25 cópias no genoma (HUNGRIA et al., 2008; KOEUTH et al., 1995) é realizada através de um único primer, o BOX-A1R. Isto é possível, porque as sequências desses elementos estão em orientações invertidas no genoma (RADEMAKER et al., 2004).

Atualmente, uma abordagem polifásica, ou seja, que integra informações de dados fenotípicos e genotípicos, tem sido muito utilizada em estudos taxonômicos de microrganismos e tem contribuído, por exemplo, para a identificação de novas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio.

3.4.1 Breve histórico da taxonomia dos rizóbios

Inicialmente, as bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio em simbiose com leguminosas, eram representadas apenas pelo gênero *Rhizobium*, o qual foi descrito pela primeira vez por Kircher em 1896, com base somente em características fenotípicas. Fred et al. (1932) descreveram seis espécies através de experimentos de inoculação cruzada entre a bactéria e a planta hospedeira, pois acreditava-se que cada espécie de *Rhizobium* era específica para uma determinada espécie de leguminosa. Posteriormente, características fisiológicas, bioquímicas e genéticas passaram a ser consideradas, permitindo a divisão dos rizóbios em dois grupos: os de crescimento lento e os de crescimento rápido, porém ainda faziam parte do mesmo gênero: *Rhizobium* (JORDAN & ALLEN, 1974; BUCHANAN, 1980). Em 1982, houve uma reclassificação da espécie *Rhizobium japonicum* em um novo gênero, o *Bradyrhizobium* (brady = lento), este nome faz referência às taxas de crescimento desta bactéria (JORDAN, 1982; 1984).

Entre as décadas de 1980 e 1990, o emprego das técnicas de biologia molecular representou um grande avanço na taxonomia procariótica, pois estudos filogenéticos passaram a ser realizados com os genes ribossomais (RNAr). Os resultados obtidos pela análise do gene ribossomal 16S, resultou na escolha desta molécula para conjecturar relações filogenéticas e assim auxiliar a taxonomia em procariotos (GARRITY & HOLT, 2001).

Os genes ribossomais apresentam características favoráveis em estudos filogenéticos, pois: são encontrados em todos os organismos vivos; são os principais componentes da estrutura dos ribossomos, e por isso, abundantes na célula; e possuem regiões que tem taxas de evolução diferentes, permitindo que as análises filogenéticas sejam realizadas em vários níveis de resolução taxonômica (WOESE, 1987; 1990; DELONG et al., 1989; GARRITY & HOLT, 2001). Devido a essas características, as sequências do gene ribossomal 16S, passaram a ser utilizadas para comparar organismos e para compreender filogenias (WEISBURG et al., 1991; GARRITY & HOLT, 2001).

Pela definição de taxonomia, a sequência completa do gene ribossomal 16S possibilita classificar os procariotos até o nível de gênero (GARRITY & HOLT, 2001). Uma eficaz ferramenta utilizada pela taxonomia atual para a determinação de espécie, tem sido o estudo da filogenia, ou seja, o estudo das relações evolutivas entre os organismos, indicando seu possível grupo, suas afinidades com outros grupos e seu lugar nas famílias e reinos (GARRITY & HOLT, 2001). Estes estudos de filogenia se beneficiaram pela técnica de PCR, que possibilita a amplificação de sequências de DNA previamente conhecidas (SAIKI et al., 1988) e que também facilitou as análises do 16S rRNA. Outros genes capazes de fornecer um embasamento para as relações filogenéticas entre procariotos, além dos genes ribossomais, também foram descobertos, como por exemplo: *gyrB*, *rpoD*, *dnaK* e *recA* (COENYE & VANDAMME, 2003).

Gevers et al (2005) indicaram uma tendência que refina a taxonomia e a filogenia bacteriana e, a partir deles, foi desenvolvida a metodologia chamada *Multilocus Sequencing Analysis* (MLSA), que consiste no sequenciamento e análise conjunta de genes conservados, que atuam como marcadores filogenéticos, os chamados genes *housekeeping* (STACKEBRANDT et al., 2002). Os estudos de diversidade e classificação bacteriana têm se beneficiado com esta metodologia e, a partir disso, têm fornecido informações cada vez mais precisas acerca das relações filogenéticas existentes entre os microrganismos.

3.4.2 O gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* abrange mais de 100 espécies de bactérias que habitam diversos ecossistemas (LPSN, 2018). Este gênero ocupa vários nichos ecológicos e pode ser encontrado em diversos ambientes como água doce e salgada, no solo, na rizosfera de plantas e no interior de nódulos de leguminosas.

A capacidade do gênero *Burkholderia* de prosperar em ambientes completamente diferentes é notável e comparável à de outros gêneros versáteis, como *Pseudomonas* e o grupo das enterobactérias (ESTRADA DE LOS SANTOS, 2015). Existem duas explicações possíveis para esta diversidade, que são: a probabilidade de transferência horizontal de genes entre as espécies (BLAHA et al., 2006) e a prevalência de sequências de inserção em genomas de *Burkholderia* que modulam a expressão gênica (LESSIE et al., 1996; MICHÉ et al., 2001), sendo que esta última característica foi analisada quase que exclusivamente em espécies patogênicas.

As espécies do complexo *Burkholderia cepacia* (BCC) e do grupo *B.pseudomallei* são patogênicas oportunistas e podem ser encontradas em ambientes hospitalares, trato respiratório humano e acometem, geralmente, pacientes com a imunidade comprometida (COENYE et al., 2001; DOWSON, 2008). A variedade de interações entre *Burkholderia* e seus hospedeiros é considerada complexa e diversa, algumas espécies parecem interagir estritamente com um tipo de hospedeiro, enquanto outras possuem maior abrangência: a interação pode ser de natureza patogênica, endofítica, de vida livre na rizosfera ou simbiótica (COENYE et al., 2001).

3.4.3 Reclassificação das espécies ambientais de *Burkholderia* no gênero *Paraburkholderia*

Yabuuchi et al. (1992) descreveram o gênero *Burkholderia* com o objetivo de reclassificar sete espécies de *Pseudomonas* (atualmente classificadas como: *B. cepacia*, *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. gladioli*, *B. caryophylli*, *B. pickettii* e *B. solanacearum*) que faziam parte de um grupo separado das demais espécies em análises do gene 16S rRNA, que era o denominado grupo II (KARPATI; JONASSON, 1996; SHELLY et al., 2000). No entanto, em análises filogenéticas realizadas ao longo dos anos, era possível identificar ainda subgrupos que separavam espécies ambientais (que colonizam locais como solo, água e rizosfera), de espécies patogênicas e, com base também em filogenias do gene 16S rRNA o grupo das espécies ambientais foi denominado “Grupo A” e o de espécies patogênicas “Grupo B” (ESTRADA DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001; CABALLERO-MELLADO et al. 2004).

Gyaneshwar et al. (2011) propuseram para o grupo chamado de “benéfico ambiental” – Grupo A – o gênero *Caballeronia*, após análises utilizando a técnica de MLSA com vários genes *housekeeping* e um número grande de espécies de *Burkholderia*. Já Sawana et al. (2014) realizaram estudos filogenéticos baseados em proteínas conservadas do cromossomo e propuseram para o Grupo A o nome *Paraburkholderia*. Ambos os nomes foram validados, e as espécies agrupadas no clado ambiental foram transferidas para o gênero *Paraburkholderia*; aquelas que apresentaram características distintas das demais foram consideradas no gênero *Caballeronia* (OREN; GARRITY, 2015; DOBRITSA; SAMADPOUR, 2016).

Uma das questões levantadas na literatura especializada, é se as espécies ambientais podem ser patogênicas ou não. Diante disso, Angus et al. (2014) estudaram um grupo representativo de *Burkholderia* e constataram que proteínas relacionadas à virulência (T3SS-3 e T6SS-5) eram ausentes nas espécies ambientais. Chen et al. (2014) verificaram ainda que, algumas espécies ambientais que possuíam sequências codificadoras de proteínas relacionadas à patogênese não possuíam reguladores requeridos para a invasão celular.

Estrada de los Santos et al. (2015) fizeram um estudo de revisão abordando a distribuição das espécies de “*Burkholderia* ambientais”. Eles afirmaram que é preciso saber mais sobre a troca de genes entre as espécies simbióticas e patogênicas e questionaram a divisão do gênero em alguns aspectos, apesar de também comentarem sobre o potencial biotecnológico destas bactérias e a possível aplicação das mesmas na agricultura. Eles identificaram neste estudo, o que chamaram de “Grupo de transição I”, que contém espécies nodulantes como a *Paraburkholderia symbiotica* (SHEU et al., 2012) junto com outras espécies que previamente foram alocadas no Grupo B, como *B. endofungorum*, *B. rhizoxinica*, *B. caryophylli*, dentre outras. Eles comentaram ainda que, não será surpreendente caso espécies nodulantes de *Burkholderia* sejam descobertas fora do grupo das espécies ambientais, visto a sua grande diversidade e o número cada vez maior de espécies descritas.

3.4.4 O gênero *Paraburkholderia*

O gênero *Paraburkholderia* abrange atualmente 65 espécies (LPSN, 2018) e encontra-se dentro do Domínio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, Classe *Beta-proteobacteria*, Ordem *Burkholderiales*, Família *Burkholderiaceae* (GARRITY et al., 2005a; SAWANA et al., 2014; OREN; GARRITY, 2015). Dentro desta família, encontra-se outro gênero denominado *Cupriavidus*, que abrange atualmente 16 espécies (LPSN, 2018), duas delas capazes de formar nódulos em leguminosas, o *C. tawaiianensis* e o *C. necator* (CHEN et al., 2001; da SILVA et al., 2012).

Moulin et al. (2001) e Chen et al. (2001) descreveram a capacidade de algumas espécies de β -proteobactérias em nodular leguminosas, e isso foi considerada uma grande descoberta pois, até então, esta habilidade havia sido verificada apenas entre espécies de α -proteobactérias. A presença dos genes de fixação e nodulação também foi verificada, tais como o *nifH* e *nodC* (MOULIN et al., 2001; GYANESHWAR et al., 2011) e isso confirmou ainda mais a versatilidade encontrada no gênero *Paraburkholderia*.

3.5 Preferência do gênero *Mimosa* por *Paraburkholderia* no Brasil

Os principais gêneros de plantas hospedeiras que nodulam em simbiose com *Paraburkholderia* são *Mimosa* e *Piptadenia* (BONTEMPS et al., 2010; REIS JUNIOR et al., 2010; BOURNAUD et al., 2013). Bontemps et al. (2010) investigaram a diversidade de simbioses de um grande número de espécies de *Mimosa* em 3 regiões do Brasil Central, que é um importante centro de diversificação do gênero. Eles identificaram as espécies de *Paraburkholderia* como os principais simbioses e provaram a existência de uma associação específica entre esses dois gêneros. Reis Junior et al. (2010) confirmaram, através de uma extensa pesquisa de nodulação em *Mimosa* nos biomas Cerrado e Caatinga, que as estirpes de *Paraburkholderia* são simbioses predominantes e, foram os primeiros a demonstrar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio por beta-rizóbios em condições de campo. Além disso, foram pioneiros em examinar um componente do complexo nitrogenase em *Paraburkholderia*, provando que o gênero é simbioticamente eficaz. A atividade da nitrogenase foi observada através de microscopia dentro dos bacterióides das espécies estudadas, como por exemplo, em nódulos de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. Outra grande coleta foi realizada por Bournaud et al. (2013), neste caso no estado do Rio de Janeiro (Bioma Mata Atlântica), com o objetivo de avaliar a diversidade de *Paraburkholderia* em plantas do grupo *Piptadenia* e gêneros associados. Neste estudo, eles também verificaram que espécies de *Paraburkholderia* eram os simbioses prevalentes nas plantas e que a diversidade era maior do que a encontrada em outros biomas, como Cerrado (BONTEMPS et al., 2010; REIS JUNIOR et al., 2010) e Caatinga (REIS JUNIOR et al., 2010).

Bontemps et al. (2010) relatam ainda que, a distribuição de espécies de *Paraburkholderia* reflete o ambiente ao invés do hospedeiro. Eles afirmam que ao invés de se especializar em grupos de hospedeiros, as espécies deste gênero parecem ter nichos distintos influenciados por fatores físicos. Eles relatam também que a simbiose *Paraburkholderia-Mimosa* é generalizada em vários sentidos: abrange uma ampla área geográfica, uma ampla diversidade taxonômica em ambos os gêneros parceiros e uma ampla diversidade de sequências de genes de simbiose.

Estudos recentes também mostraram uma alta diversidade de espécies do gênero *Paraburkholderia* no Bioma Mata Atlântica (DALL'AGNOL et al., 2017) e que características geográficas e ecológicas influenciam no padrão de simbioses (BOURNAUD et al., 2013; BONTEMPS et al., 2016) além das características dos solos (LEMAIRE et al., 2016; PIRES et al., 2017).

Bontemps et al. (2016) verificaram que espécies nativas e endêmicas de alguns estados centrais no México não foram noduladas por *Paraburkholderia*, mas sim pelos gêneros da classe das α -proteobactérias: *Rhizobium* e *Ensifer*. Estes autores também atribuíram a diferença dos simbioses a uma evolução “separada” dos grupos de espécies do gênero *Mimosa* em solos com características muito distintas, ou seja, as espécies do Brasil são endêmicas de solos ácidos, que sustentam uma população de *Paraburkholderia* adaptadas e tolerantes, enquanto que as do México são endêmicas para solos principalmente neutro-alcalinos, que suportam uma gama mais ampla de simbioses potenciais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos isolados

Foram selecionados 83 isolados que foram obtidos a partir de amostras de solo inoculadas em “plantas-isca” e/ou diretamente de nódulos de sabiá de diferentes municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, além de 4 estirpes “BR” (estirpes de referência já caracterizadas) presentes no Centro de Recursos Biológicos – Johanna Dobereiner (CRB-JD) da Embrapa Agrobiologia localizada em Seropédica-RJ, totalizando 87 isolados (a origem das culturas obtidas e os responsáveis pelos isolamentos foram descritos na Tabela 2A - anexo A).

Estes isolados foram estocados no Laboratório de Leguminosas Florestais da Embrapa Agrobiologia e cultivados em meio 79 (FRED & WAKSMAN, 1928) até que fossem purificados (processo realizado para a eliminação da contaminação até que seja possível se obter apenas colônias puras).

4.2 Caracterização morfofocultural

Os isolados foram cultivados em meio 79 (FRED & WAKSMAN, 1928), a 28°C, e caracterizados de acordo com suas características culturais, que foram organizadas na Tabela 3B. As características culturais levadas em consideração foram: alteração do pH do meio, produção de goma (polissacarídeos extracelulares), taxa de crescimento e características das colônias (tamanho, formato, borda, elevação, superfície, transmissão de luz e coloração das colônias).

As culturas foram visualizadas durante sete dias e a caracterização foi realizada no oitavo dia após a inoculação do meio de cultura. As estirpes “BR” (3405, 3407, 3424 e 3446) não foram caracterizadas morfológicamente no presente estudo e, por isso, não foram incluídas na Tabela 3B – anexo B.

4.3 Experimento de autenticação

O experimento de autenticação foi realizado com o objetivo de verificar a formação de nódulos em plantas de sabiá inoculadas com as bactérias selecionadas para o estudo. Para isto, as sementes de sabiá foram previamente germinadas para que sua qualidade fisiológica pudesse ser avaliada. Antes de serem desinfestadas, as sementes passaram pelo processo de escarificação química e foram imersas em ácido sulfúrico a 98% por 4 minutos para a quebra da dormência.

As sementes foram esterilizadas superficialmente e passaram pelas seguintes etapas: quebra da tensão superficial em álcool 70%, por 30 segundos; lavagem com água estéril; desinfestação superficial com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) concentrado por 2 minutos e por fim, foram lavadas novamente de forma abundante com água destilada estéril e colocadas em placas de Petri esterilizadas, contendo papel de filtro e algodão umedecido.

As sementes foram germinadas em câmara B.O.D. sob temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 h, durante 5 dias, sendo avaliada a percentagem de germinação, até que a radícula alcançasse um centímetro de comprimento. Foram utilizadas 4 repetições com 25 sementes em cada.

O experimento foi montado em garrafas de vidro de 350 mL, que foram preparadas com duas fitas de papel de germinação, de 20 cm x 2,0 cm (comprimento x largura), posicionadas ao centro e lacradas ao gargalo, de forma que a solução nutritiva pudesse ficar em contato com as raízes das plantas. As garrafas foram envoltas com papel pardo e, antes de serem lacradas com papel alumínio, um pedaço de algodão foi posicionado “na boca da

garrafa” para servir de apoio para as sementes pré-germinadas. Foram utilizados 200 mL de solução de Norris (GRUZMAN e DÖBEREINER, 1968) em cada garrafa e depois elas foram esterilizadas em autoclave.

Para o preparo do inóculo, as bactérias foram cultivadas em meio 79 líquido (FRED & WAKSMAN, 1928) sob agitação horizontal orbital (150 rpm) até apresentarem crescimento. A inoculação foi realizada no momento do plantio adicionando 1 mL por plântula.

O experimento foi montado em casa de vegetação em condições estéreis na Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ) com duas garrafas para cada bactéria (replicatas). Como controle negativo foram plantadas em duas garrafas sementes não inoculadas e, como controle positivo, foram utilizadas as estirpes de referência BR 3405 e BR 3407 ambas anteriormente descritas (*Paraburkholderia sabiae*).

Após o plantio e inoculação, sacos de polietileno foram colocados em cima de cada garrafa, para funcionarem como uma proteção para as sementes e fornecer umidade. Após sete dias, os sacos foram retirados e a boca da garrafa foi selada com uma película flexível com ação aderente (Parafilm).

Para se ter a certeza de que a visualização dos nódulos aconteceria após o tempo necessário para a formação dos mesmos, foram realizadas duas coletas prévias das plantas inoculadas com os controles positivos. A primeira coleta foi realizada 21 dias após o plantio, onde já foi possível detectar a presença de pequenos nódulos e a segunda coleta foi realizada 30 dias após o plantio, onde foi possível detectar a presença de nódulos bem desenvolvidos e ativos. A coleta de todo o experimento aconteceu 15 dias depois, ou seja, o mesmo foi conduzido em casa de vegetação por 45 dias no total.

4.4 Análises Moleculares

4.4.1. Extração de DNA

Após os resultados do experimento de autenticação, o DNA genômico dos isolados que nodularam foi extraído com o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) conforme as instruções do fabricante. A extração do DNA foi realizada a partir de uma cultura de células crescidas em Meio 79 líquido, a 28°C, em agitação constante de 150 rpm. O DNA foi quantificado por espectrometria em um equipamento QUBIT (Invitrogen) e a concentração foi ajustada para 10 ng.µL⁻¹.

4.4.2. Análise de BOX-PCR

O oligonucleotídeo iniciador BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG- 3') foi utilizado em reações de 25 µL de acordo com protocolo descrito por BRUIJN et al. (1996). A amplificação foi realizada com uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por cinco minutos, seguida de 30 ciclos, sendo cada ciclo composto por mais uma etapa de desnaturação a 94°C por um minuto, uma etapa de anelamento a 53°C por um minuto e uma etapa de extensão a 65°C por oito minutos. Para garantir que a amplificação completa dos produtos de PCR fosse alcançada, procedeu-se uma etapa de extensão final a 65°C por 16 minutos.

Os produtos das reações de BOX-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo e fotografados em um Fotodocumentador *Kodak Gel Logic 100 Imaging System*®. Os perfis obtidos foram analisados através do programa Bionumerics 6.6 (Applied Maths BVBA, Belgium), onde foram alinhados e utilizados para o cálculo de matrizes de similaridade com base no índice de Dice e para construção de um dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*).

O dendograma foi analisado e os isolados foram comparados dentro de cada grupo (locais de isolamento). Esta análise comparativa foi realizada visualmente, ou seja, o padrão de bandas de cada isolado foi levado em consideração como critério de seleção: dentre dois que apresentaram o mesmo padrão de bandas foi escolhido somente um para as etapas posteriores.

4.4.3. Amplificação dos genes 16S rRNA, *recA* e *nifH*

Os isolados selecionados foram submetidos à PCR para amplificação de fragmentos dos genes: 16S rRNA (cerca de 1500 pb), *recA* BUR1 e BUR2 para *Burkholderia* (cerca de 869 pb), *recA* 6F e 555R para *Rhizobium* (cerca de 549 pb) e *nifH* Chen (cerca de 658 pb). A sequência dos *primers* utilizados, a concentração dos reagentes, as condições de amplificação e as referências estão descritos na Tabela 1.

Os produtos das reações de amplificação de cada gene foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo e fotografados em um Fotodocumentador *Kodak Gel Logic 100 Imaging System*® e, posteriormente, foram preparados para o sequenciamento conforme descrito no próximo item (4.4.4).

Tabela 1: *Primers* utilizados no estudo e condições das reações de amplificação.

Primers	Reação	Ciclos	Referência
16S rRNA- Amp1 5'-GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG-3' Amp2 5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3'	Tampão 1X; MgCl ₂ , 3 mM; dNTPs, 0.3 mM; Primer Amp1, 0.1 μM; Primer Amp2, 0.1 μM; 0.05 U Taq por μL.	Desnaturação inicial a 95°C, por 5 min.; 30 ciclos de 95°C, 1 min.; 55°C, por 1.5 min.; 72°C, por 1.5 m; e Extensão final a 95°C por 3 min.	Wang et al. (1996)
<i>recA</i> Bur1F- 5'-GATCGARAAGCAGTTCGGCAA-3' Bur2R- 5'-TTGTCCTTGCCCTGRCCGGA-3'	Tampão 1X; MgCl ₂ , 1.5 mM; dNTPs, 0.3 mM; Primer recA BUR1F, 0.8 μM; Primer recABUR2R, 0.8 μM; 0.05 U Taq por μL.	Desnaturação inicial a 95°C, por 5 min.; 35 ciclos de 95°C, 1 min.; 63°C, por 1min; 72°C, por 2min; e Extensão final a 95°C, por 3 min.	Payne et al. (2005)
<i>nifH</i> ChenF- 5'- CGCIWTYTACGGIAARGGIGG-3' ChenR- 5'-GGIKCRTAYTSGATIACIGTCAT-3'	Tampão 1X; MgCl ₂ , 1.5 mM; dNTPs, 0.3mM; Primer nifHChenF, 0.8 μM; Primer nifHChenR, 0.8 μM; 0.05 U Taq por μL.	Desnaturação inicial a 95°C, por 5 min.; 35 ciclos de 95°C, 1 min.; 58°C, por 1min; 72°C, por 2min; e Extensão final a 95°C, por 3 min.	Chen et al. (2005b)
<i>recA</i> 6F- 5'-CGKCTSGTAGAGGAY AAATCGGTGGA-3' 555R 5'-CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT-3'	Tampão 1X; MgCl ₂ , 1.5 mM; dNTPs, 0.3 mM; Primer recA6F, 0.8 μM; Primer recA555R, 0.8 μM; 0.05 U Taq por μL.	Desnaturação inicial a 95°C, por 5 min.; 30 ciclos de 95°C, 1 min.; 55°C, por 1min; 72°C, por 1.5 m; e extensão final a 95°C, por 3 min.	Gaunt et al. (2001)

4.4.4 Sequenciamento e montagem de contigs

Para o sequenciamento, duas alíquotas dos produtos de PCR foram separadas: uma alíquota de 2 µL para a quantificação do DNA e outra de 10 µL para a purificação com as enzimas EXO/FastAP (ThermoFisher Scientific). O mix de purificação enzimático foi preparado e aquecido a 37°C, por 15 minutos, e a 85°C, por 20 minutos.

Após esse tratamento, as amostras foram marcadas utilizando-se o *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1* (Applied Biosystems, EUA) em uma placa contendo 96 poços. Este mix foi preparado com o DNA da amostra, água ultrapura para PCR, *primers* dos genes de interesse, o tampão da reação e o Big Dye (o volume total da reação foi de 10 µL). As reações foram preparadas para as duas porções de cada gene, ou seja, para a fita líder e para a fita reversa.

A placa foi levada ao termociclador e passou pelos seguintes estágios: desnaturação inicial a 96° por 1 minuto, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 96° por 15 segundos, anelamento a 50° por 15 segundos e extensão final a 60° por 4 minutos. Após estas etapas, foi realizada uma purificação pós-reação (precipitação) com Acetato de Sódio, EDTA e Etanol, que foi encaminhada para aplicação no sequenciador ABI3500 (Applied Biosystems), pelo método Sanger, no Laboratório de Genoma da Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ).

Após o sequenciamento, as sequências da fita líder e da fita reversa de cada gene foram utilizadas para a montagem de contigs com o programa ChromasPro (Technelysium). As regiões de baixa qualidade foram removidas manualmente e os contigs avaliados individualmente para garantir a qualidade da montagem.

Os contigs montados foram submetidos à análise com o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) para busca de sequências de alta similaridade no banco de dados público NCBI *GenBank*®. A base de dados de pesquisa utilizada foi a *Nucleotide collection – (nr/nt)* e os parâmetros de análise utilizados foram os *default* do BLASTn. As sequências que apresentaram alta identidade com as amostras estudadas foram selecionadas para servirem como sequências de referência. Os contigs serão descritos como “sequências” nos tópicos a seguir.

4.4.5 Alinhamentos e análises filogenéticas

As sequências do gene 16S rRNA foram comparadas e alinhadas com sequências de alta similaridade através da ferramenta *seqmatch* do *Ribosomal Database Project* (COLE et al., 2007). Já as sequências dos genes *nifH* e *recA* foram submetidas a análises de similaridade no *Genbank*® através da ferramenta BLASTn, como mencionado anteriormente. As sequências de proteínas correspondentes foram alinhadas com o programa MEGA6 (KUMAR et al., 2013).

As árvores de cada gene foram geradas utilizando-se o programa MEGA 6 (KUMAR et al. 2013) com as sequências do presente estudo mais as sequências das estirpes de referência obtidas no *Genbank*®. O melhor modelo de substituição para o cálculo das distâncias utilizadas na análise filogenética, definido com base na análise de modelos calculada e disponibilizada no MEGA 6, foi o Tamura 3 parâmetros (T92) para *recA* e *nifH* e o Tamura-Nei (TN93) para o gene 16S rRNA. O método utilizado para construção das filogenias foi o de máxima verossimilhança.

O suporte estatístico para os diferentes clados formados nas árvores foi calculado pela análise de amostragem *bootstrap* (SWOFFORD et al., 1996), onde o valor calculado indica a confiabilidade do agrupamento.

5. RESULTADOS

5.1 Experimento de autenticação

Os isolados que induziram a nodulação do sabiá foram confirmados como rizóbios. Dos 87 inoculados no total, 33 nodularam e foram selecionados para a etapa posterior.

Os códigos de 29 isolados que nodularam no experimento de autenticação estão destacados em negrito na Tabela 2A em anexo. As estirpes BR3405, BR 3407, BR3424 e BR3446 nodularam, porém não estão inseridas na tabela acima citada pois não foram caracterizadas morfológicamente no presente estudo.

5.2 Análises Moleculares

5.2.1 BOX-PCR

A técnica de *fingerprinting* BOX-PCR foi realizada com os 33 isolados selecionados no experimento de autenticação (destacados em negrito na Tabela 3B em anexo), e o principal objetivo desta etapa foi comparar os perfis genotípicos obtidos para selecionar representantes para a análise de sequenciamento multilocus.

A análise dos perfis de BOX-PCR separou os isolados em 3 grupos a 30% de similaridade, além de um ramo externo contendo o isolado 19AP3 (Fig.1). De forma geral, pode-se perceber que os grupos representam a região de origem dos isolados, a saber: o Grupo 1 é formado apenas por bactérias isoladas de municípios da região Sudeste, valendo ressaltar que o isolado 14P1 encontra-se em um ramo mais externo dentro dele; o Grupo 2 é formado predominantemente por bactérias isoladas de municípios da região Nordeste e dentro dele há um subgrupo formado por estirpes tipo e referência (“BRs”) e o isolado PM2-1 da região Sudeste; já o Grupo 3 é misto, formado por duas bactérias da região Sudeste (13P1 e 9P4) e duas da região Nordeste (09RN e 11RN) que são os perfis genotípicos que mais se diferenciam das demais.

A partir disto, foram selecionadas para o sequenciamento dos genes 16S rRNA, *recA* e *nifH* 22 bactérias no total, levando-se em consideração os locais de origem, que são representados pelos códigos: “P1”, “P3”, “P4”, “PM/SAB”, “JUA”, “CPATSA” e “RN” (Tabela 2A).

Os selecionados foram: SAB QD6, BR3407, BR3424, 4BP1, 13P1, 14P1, PM2-1, PM3-1, 12P3II, 19AP3, 19BP3, 1BP4, 8P4, 9P4, 18P4, 11-RN, JUA1-7A, JUA2-8, JUA3-1, JUA3-4, CPATSA 848 e CPATSA 877 (Tabela 4C).

BOX ISOLADOS DE SABIÁ

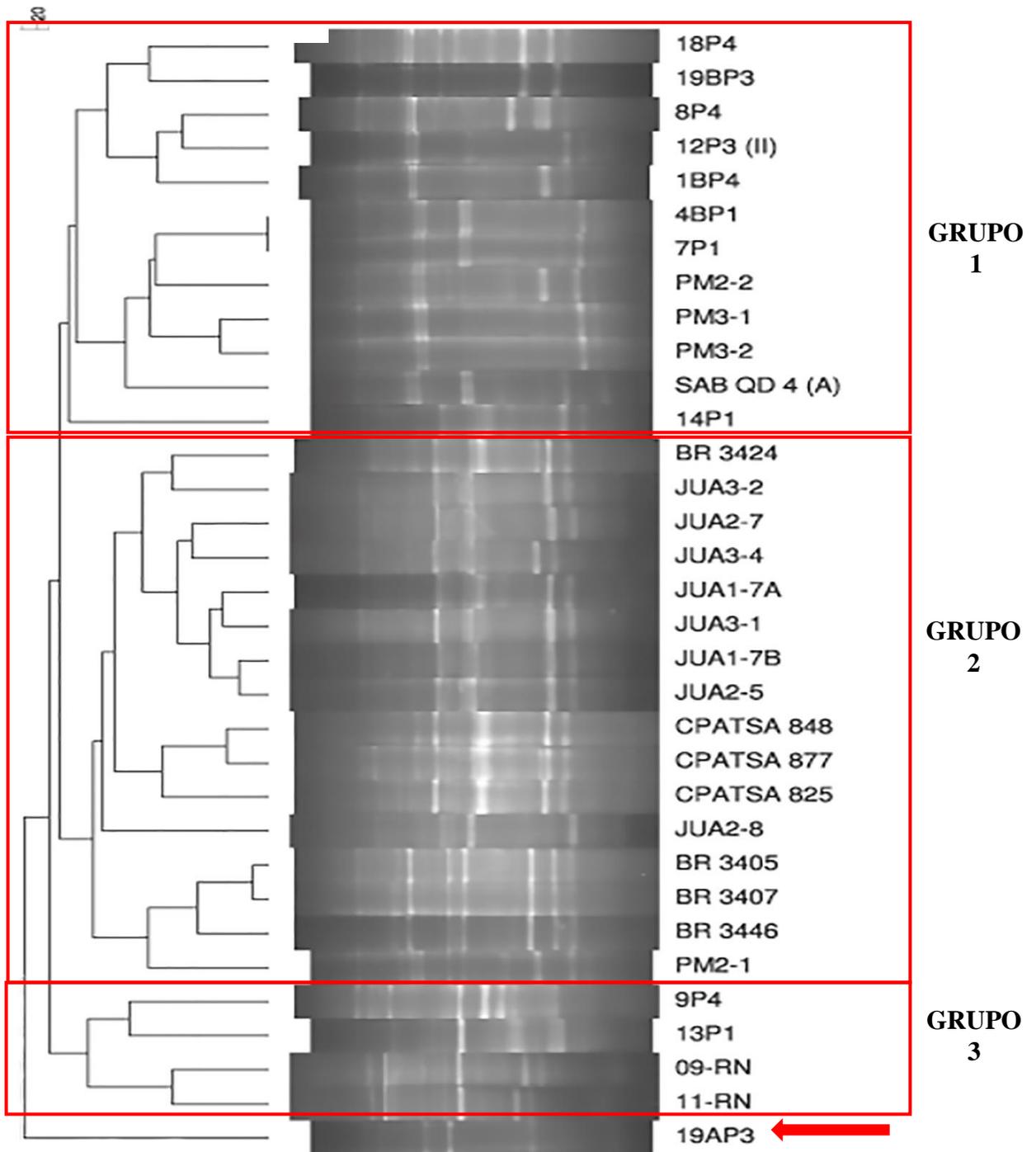


Figura 1: Dendrograma de similaridade dos perfis dos produtos obtidos na análise de BOX-qPCR de 33 bactérias isoladas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. de municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. O dendrograma foi construído utilizando-se o índice de Dice e o método UPGMA. As delimitações em vermelho indicam os grupos formados e a seta vermelha indica o ramo mais externo. Códigos: SAB e P1 (Seropédica-RJ); P3 (Itaguaí-RJ); PM e P4 (Mangaratiba-RJ); JUA (Juazeiro-BA); CPATSA (Embrapa Semi-Árido-Petrolina-PE); RN (Natal-RN).

5.2.2 Filogenia dos genes 16S rRNA, *recA* e *nifH*

A árvore filogenética construída com base nas sequências do gene 16S rRNA (Fig.2) divide os isolados em dois grupos: o grande grupo das β -proteobactérias e o grupo das α -proteobactérias.

Dentro do grande grupo das β -proteobactérias há 3 subgrupos que serão denominados a seguir de Clados I, II e III. O Clado I é formado por bactérias isoladas de municípios da região Sudeste do Brasil (Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba-RJ) identificadas pelos códigos: 12P3II, 19BP3, 8P4, 1BP4, BR3407, SAB QD6, PM2-1, 4BP1, 18P4 e PM3-1. Todas elas, com exceção do isolado PM3-1, se agruparam com a estirpe tipo de *Paraburkholderia sabiae* e uma estirpe de *Burkholderia* sp. com um suporte de 82%. O isolado PM3-1 se agrupou com a estirpe tipo de *Paraburkholderia phymatum*, com um suporte de 89%.

O Clado II é formado predominantemente por bactérias isoladas de municípios da região Nordeste do Brasil (Juazeiro-BA, Petrolina-PE e Fortaleza-CE) identificadas pelos códigos: JUA3-4, CPATSA 848, CPATSA 877, BR 3424, JUA1-7A e JUA3-1 que formaram um grupo com uma estirpe de *Paraburkholderia diazotrophica*, com um valor de *bootstrap* de 86%. Dentro deste grupo também se encontra um único isolado da região Sudeste, o 14P1, mais especificamente de Seropédica-RJ. Também fazem parte deste clado as estirpes tipo de *Paraburkholderia tuberum*, *Paraburkholderia acidipaludis* e *Paraburkholderia diazotrophica*. Já o Clado III é formado somente pelo isolado 11-RN, que se agrupou com a estirpe tipo de *Paraburkholderia symbiotica*, com um valor de *bootstrap* de 99%.

Além dos subgrupos denominados como clados, ainda no grande grupo das β -proteobactérias, há dois ramos mais externos das estirpes tipo de *Paraburkholderia soli* e *Paraburkholderia caryophylli*, ou seja, elas não foram agrupadas diretamente com nenhuma das bactérias isoladas. Duas estirpes de *Burkholderia vietnamiensis* (entre elas a estirpe tipo) formaram, juntas, um grupo mais externo aos demais.

O grupo das α -proteobactérias é formado por 3 bactérias isoladas de municípios da região Sudeste e que foram identificadas como *Rhizobium*. O isolado 19AP3 foi agrupado com duas estirpes ainda não identificadas no nível de espécie (*Rhizobium* sp.) e com uma estirpe de *Rhizobium mongolense*, com um valor de *bootstrap* de 87%. Próximo deste grupo há um ramo mais externo contendo a estirpe tipo de *Rhizobium etli*.

A bactéria 9P4 foi agrupada com uma estirpe de *Rhizobium* sp. e a estirpe tipo de *Rhizobium miluonense*, com um valor de *bootstrap* de 90%. Já a 13P1 se agrupou com as estirpes tipo de *Rhizobium hainanense*, *Rhizobium multihospitium*, *Rhizobium tropici* e *Rhizobium freirei* com valores de *bootstrap* variando de 38 a 62%.

É interessante notar que, a bactéria 11-RN e as estirpes de *Rhizobium* (13P1, 19AP3 e 9P4) são as mesmas que aparecem em grupos separados no dendograma do BOX-PCR (Fig.1), demonstrando coerência com a análise anterior.

Devido a baixa qualidade da sequência do gene 16SrRNA da estirpe JUA2-8, esta não foi incluída nesta análise.

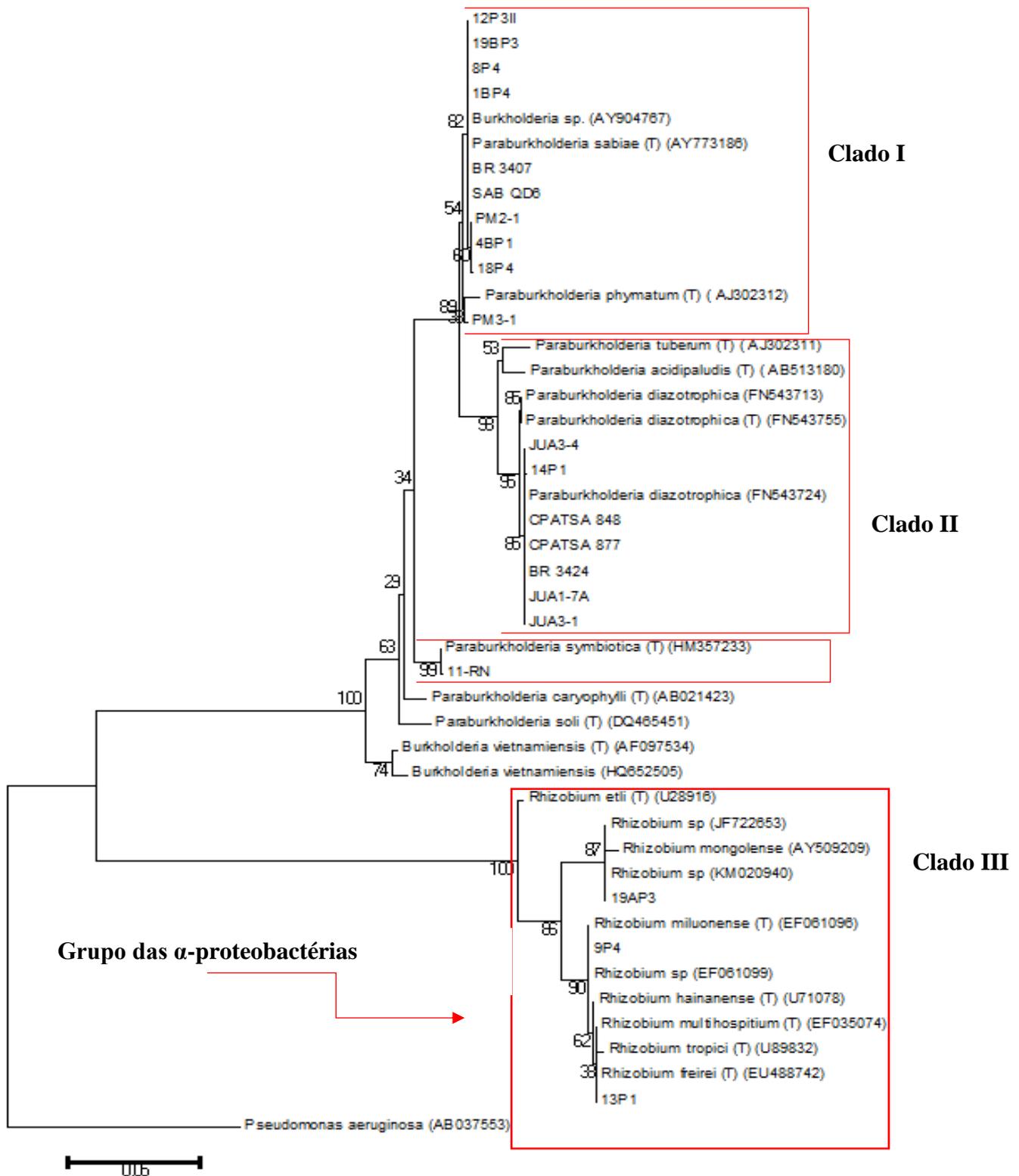


Figura 2: Árvore filogenética baseada em seqüências do gene 16S rRNA de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. em municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. O método utilizado para a construção da árvore foi o de Máxima Verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros (1992). As delimitações em vermelho indicam os Clados dentro do grupo das β -proteobactérias e o grupo formado pelas α -proteobactérias. Códigos: SAB e P1 (Seropédica-RJ); P3 (Itaguaí-RJ); PM e P4 (Mangaratiba-RJ); JUA (Juazeiro-BA); CPATSA (Embrapa Semi-Árido-Petrolina-PE); RN (Natal-RN).

A árvore filogenética construída com base nas sequências do gene *recA* (Fig.3) também dividiu os isolados em dois grupos: o grande grupo das β -proteobactérias e o grupo das α -proteobactérias. Vale ressaltar que, após a identificação de 3 isolados do gênero *Rhizobium* na árvore do 16S rRNA, *primers* do gene *recA* específicos para o gênero e equivalentes às regiões anteriormente amplificadas foram utilizados. As sequências foram analisadas em conjunto para que uma única árvore filogenética fosse gerada.

Dentro do grande grupo das β -proteobactérias há 3 subgrupos que também serão denominados a seguir de Clados I, II e III. O Clado I é formado por bactérias isoladas de municípios da região Sudeste do Brasil, identificadas pelos códigos: 1BP4, PM2-1, 18P4, 19BP3, SAB6QD, 8P4, 4BP1, 12P3II e PM3-1 que formaram um grupo com estirpes de *P. sabiae* e *Burkholderia* sp. e com a estirpe tipo de *P. sabiae*. Neste clado, ainda, há um ramo mais externo de uma estirpe de *P. phymatum*, que se encontra novamente mais próxima do isolado PM3-1, assim como na árvore do 16SrRNA. Os valores de *bootstrap* variaram de 42 a 96%.

O Clado II é formado predominantemente por bactérias isoladas de municípios da região Nordeste do Brasil, identificadas pelos códigos: BR3424, CPATSA 848, CPATSA 877, JUA1-7A, JUA2-8, JUA3-1 e JUA3-4. Estas formaram um grupo com uma estirpe de *P. diazotrophica*, com um valor de *bootstrap* de 99%. Dentro deste grupo ainda se encontra um único isolado da região Sudeste: o 14P1, mais especificamente de Seropédica-RJ.

Já o clado III, é formado pela bactéria 11-RN com a estirpe tipo de *P. symbiotica*, com um suporte de 99%. A *P. soli* ficou em um ramo mais externo, do mesmo modo que na árvore do gene 16S rRNA. Pode-se dizer que, a bactéria 11-RN, única representante do Rio Grande do Norte no presente estudo, é a "*Paraburkholderia*" que mais se diferencia das demais da região Nordeste.

Além dos subgrupos denominados como clados, ainda no grande grupo das β -proteobactérias, formou-se um grupo mais externo contendo estirpes de *P. acidipaludis*, *Burkholderia vietnamiensis* e a estirpe tipo de *P. caryophilli*, que não se agruparam diretamente com nenhum dos demais isolados. As sequências destas bactérias foram incluídas na análise da filogenia do gene *recA*, após serem observadas na análise anterior, com o intuito de ver onde elas seriam agrupadas.

No grupo das α -proteobactérias a 19AP3 foi agrupada com *R. etli* e, novamente, *R. mongolense*, que apareceu em um ramo mais externo no mesmo grupo assim como uma estirpe de *R. multihospitium*, os valores de *bootstrap* variaram de 31 a 40%. A bactéria 13P1 e uma estirpe de *R. hainanense* formaram um grupo com um valor de suporte de 88%. Já a 9P4 está em um ramo mais externo de um grupo formado com as espécies *R. tropici*, *R. freirei* e *R. miluonense*. O suporte para esse subgrupo foi baixo (*bootstrap* de 23%).

Pode-se dizer que as filogenias dos genes 16S rRNA e *recA* dos isolados de sabiá foram congruentes, o que denota a confiabilidade dos resultados observados.

As sequências de PM2-1 e BR 3407 não estavam com uma boa qualidade e por isso não foram incluídas na árvore do *recA*.



Figura 3: Árvore filogenética baseada em sequências do gene *recA* de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa caesalpinifolia* Benth em municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. O método utilizado para a construção da árvore foi o de Máxima Verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura 3-parâmetros (1992). As delimitações em vermelho indicam os Clados dentro do grupo das β -proteobactérias e o grupo formado pelas α -proteobactérias. Códigos: SAB e P1 (Seropédica-RJ); P3 (Itaguaí-RJ); PM e P4 (Mangaratiba-RJ); JUA (Juazeiro-BA); CPATSA (Embrapa Semi-Árido-Petrolina-PE); RN (Natal-RN).

A árvore filogenética construída com base nas sequências do gene *nifH* (Fig.4) inclui somente as estirpes das β -proteobactérias, pois as tentativas de amplificar o gene para as bactérias do gênero *Rhizobium* (13P1, 19AP3 e 9P4) não foram bem-sucedidas. Sendo assim o grupo das α -proteobactérias não foi analisado para a filogenia do gene *nifH*. Além disso, as sequências das bactérias PM2-1 e 4BP1 também não puderam ser analisadas devido a baixa qualidade das mesmas.

Neste caso, o grande grupo das β -proteobactérias se subdivide em 4 clados que também serão representados a seguir da seguinte forma: I, II, III, IV. O Clado I é formado pelos isolados dos municípios da região Nordeste: JUA3-4, JUA3-1, JUA1-7A, CPATSA 877, CPATSA 848 e JUA2-8 mais o isolado 14P1 e estirpes de *P. phymatum*, uma *Burkholderia* sp. e a estirpe tipo de *P. diazotrophica*, com um suporte de *bootstrap* de 100%. O Clado II é formado pelos isolados dos municípios da região Sudeste: 18P4, 8P4, 1BP4, BR3407, PM3-1, 12P3II, 19BP3, SAB6QD e a estirpe tipo de *P. sabiae*, com valores de *bootstrap* que variaram de 43 a 98%.

O Clado III é formado pela bactéria 11-RN e a estirpe tipo de *P. symbiotica*, com 99% de suporte. Já o Clado IV é o grupo mais externo aos demais, formado por uma estirpe de *Burkholderia* sp. e uma estirpe de *B. vietnamiensis*, que foram agrupadas com um valor de *bootstrap* de 100%, além de uma estirpe de *P. caryophylli*.

Não foi possível incluir na árvore filogenética do gene *nifH* as sequências das estirpes de *P. tuberum*, *P. acidipaludis* e *P. soli*, pois as mesmas não se encontravam disponíveis no *GenBank*.

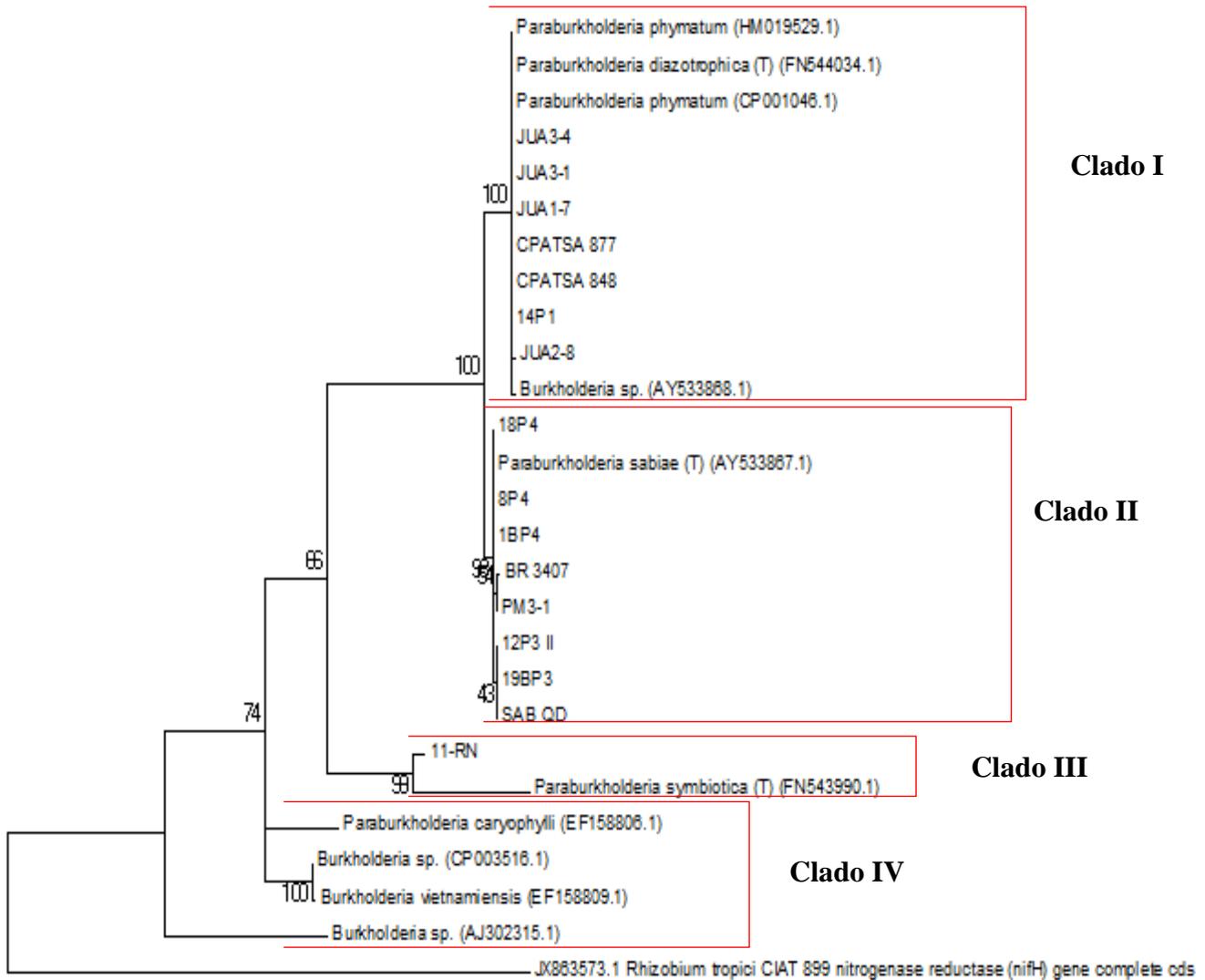


Figura 4: Árvore filogenética baseada em sequências do gene *nifH* de bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa caesalpinifolia* Benth em municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. O método utilizado para a construção da árvore foi o Máxima Verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*. O modelo evolucionário utilizado foi o Tamura-Nei (1993). As delimitações em vermelho indicam os Clados. Códigos: SAB e P1 (Seropédica-RJ); P3 (Itaguaí-RJ); PM e P4 (Mangaratiba-RJ); JUA (Juazeiro-BA); CPATSA (Embrapa Semi-Árido-Petrolina-PE); RN (Natal-RN).

6. DISCUSSÃO

6.1 Distribuição de simbioses de sabiá entre municípios das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil

Os resultados estão de acordo com alguns estudos que mostraram que o simbiote bacteriano prevalente em *Mimosa* spp. no Brasil é *Paraburkholderia* (SAWANA et al., 2014) (anteriormente classificados no gênero *Burkholderia*) (CHEN et al., 2008b; BONTEMPS et al., 2010; BOURNAUD et al. 2013) e corroboram a conclusão de Martins et al. (2015) de que este é o principal gênero simbiote da espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., o sabiá. Estes estudos sugerem a influência da localização geográfica no padrão de distribuição dos simbioses, o que também foi sugerido pelas análises do presente trabalho, que apontam a maioria dos isolados de municípios da região Sudeste, bioma Mata Atlântica, como *P. sabiae* (CHEN et al., 2008b) e os de municípios da região Nordeste, bioma Caatinga, como *P. diazotrophica* (SHEU et al., 2013). As exceções encontradas foram um isolado da região Sudeste, o 14P1 (Seropédica-RJ), que não se agrupou com as estirpes da mesma origem, além de três isolados (códigos 13P1, 19AP3 e 9P4) identificados no gênero *Rhizobium*, todos provenientes do Sudeste.

A diversidade dos simbioses em *Mimosa* spp. é bem relatada na literatura (BONTEMPS et al., 2010; REIS JUNIOR et al., 2010) e está geralmente associada a fatores geográficos, como localização e altitude (BONTEMPS et al., 2010; 2016), e aos atributos do solo (PIRES et al., 2017). Martins et al. (2015) estudaram, através da técnica de BOX-PCR e filogenia do gene 16S rRNA, a diversidade de rizóbios isolados de sabiá de cinco locais diferentes com mais de 300 km de distância entre si e de diferentes condições ecológicas do Nordeste Brasileiro. Eles encontraram isolados com alta similaridade provenientes dos municípios: Serra Talhada-PE, Gravatá-PE e Mossoró-RN, assim como no presente estudo, que visualizou o agrupamento dos isolados dos municípios da região Sudeste com *P. sabiae*, com exceção de um único isolado de Seropédica (RJ) que ficou filogeneticamente próximo dos isolados da região Nordeste.

Martins et al. (2015) identificaram também três isolados nos municípios de Mossoró-RN, Crato-CE e Itambé-PE com alta similaridade (97 a 99%) com *P. sabiae*, apontado aqui como o principal simbiote na região Sudeste e que foi originalmente isolado de nódulos de sabiá (CHEN et al., 2008b). No entanto, eles ressaltam que uma destas bactérias não se agrupou diretamente com a estirpe tipo de *P. sabiae*, incluída na análise, e indicam a existência de diferenças nucleotídicas entre elas, eventualmente influenciadas pelas condições do local de ocorrência das mesmas. Segundo Lemaire et al. (2016) ao se utilizar distâncias geográficas como padrão de estudo da conectividade populacional, espera-se que variação genética se correlacione positivamente com as distâncias do local de amostragem.

Dentre os isolados identificados no trabalho de Martins et al. (2015), três provenientes de Serra Talhada-PE, Crato-PE e Gravatá-PE, tiveram alta similaridade com *P. diazotrophica*, que foi a espécie identificada como sendo filogeneticamente mais próxima dos isolados do Nordeste (Juazeiro, Ceará e Pernambuco) analisados no presente estudo. É curioso notar que dois isolados de sabiá enviados pela Embrapa Semi-Árido em 1993 (CPATSA 848 e 877) se agruparam com *P. diazotrophica* e, diante deste fato, fica evidente a “antiga parceria” entre essas espécies no Nordeste, já que “CPATSA 848 e 877” foram obtidas de nódulos de sabiá há 25 anos atrás.

Martins et al. (2015) viram também que um dos simbioses coletados de nódulos de sabiá em Mossoró-RN teve alta similaridade com *P. sabiae*. Já, nas presentes análises, o único representante do Rio Grande do Norte teve alta similaridade com *P. symbiotica* (SHEU

al.,2012). Pode-se dizer que mesmo que a coleta das amostras de solo não tenha sido realizada exatamente no mesmo local, isto indica que no mesmo estado, dependendo da distância e das condições ecológicas, o padrão das espécies de simbioses pode ser diferente, ou ainda, que uma amostragem com um número maior de isolados de sabiá, em ambos os estudos, forneceria uma comparação mais esclarecedora e, conseqüentemente, mais precisa.

6.2 Árvores filogenéticas dos genes 16SrRNA, *recA* e *nifH*

No presente estudo, três marcadores moleculares foram utilizados e as filogenias dos genes 16S rRNA e *recA* foram congruentes formando grupos bem suportados. No grupo das β -proteobactérias (na árvore do 16S rRNA) as estirpes tipo de *P. sabiae* e *P. phymatum* fazem parte do Clado I (Fig.2) juntamente com as bactérias da região Sudeste, o que é coerente pois as duas são filogeneticamente próximas (SAWANA et al., 2014). No Clado II (Fig.2) as estirpes tipo de *P. diazotrophica*, *P. tuberum* e *P. acidipaludis* se agrupam com as bactérias isoladas da região Nordeste, isso também pode ser considerado coerente pois elas possuem similaridades e, apesar de não formarem diretamente um grupo, esta similaridade pode ser vista na análise de 16SrRNA publicada por Sawana et al. (2014).

Ainda no estudo acima citado, onde propuseram a reclassificação das espécies não patogênicas e ambientais de “*Burkholderia*” em “*Paraburkholderia*”, é possível ver na árvore do gene 16S rRNA o agrupamento das estirpes tipo de: *P. symbiotica* e *P. caryophili* que no Clado III (Fig.2) apresentaram similaridade com as bactérias 11RN e *P. soli*, que são claramente diferentes das demais presentes nos outros clados. No entanto, o trabalho de Estrada de Los Santos et al. (2015), que questiona alguns aspectos da divisão do gênero *Burkholderia*, classifica o grupo dessas mesmas bactérias como “Grupo de Transição I” afirmando que elas são uma exceção a nova reclassificação do gênero.

De fato, nas filogenias do gene 16S rRNA publicadas nos estudos citados acima e no presente estudo, foi observado que elas têm características nucleotídicas diferentes que não as colocam nos mesmos grupos ou clados das demais “*Paraburkholderias*”. É interessante levantar esta questão, mesmo que brevemente, pois uma das bactérias isoladas do presente estudo ficou próxima justamente das bactérias que formam este “grupo de transição I” e, caso ele venha a ser reclassificado novamente ou nomeado de algum outro jeito, sabe-se que a 11RN estará incluída nas novas definições. No mais, sobre a reclassificação atual destas bactérias em “*Paraburkholderia*” ou não, deixa-se claro que o objetivo não é detalhar isso e que a nomenclatura aqui utilizada está em consonância com os nomes validados.

Já a filogenia do gene *nifH*, que é o responsável por codificar a enzima nitrogenase e é essencial a todos os organismos que fixam nitrogênio, apresentou algumas diferenças com relação às demais. Isso também foi visto no trabalho de Bontemps et al. (2010). As diferenças observadas na árvore do *nifH* com relação as outras duas do presente estudo, consiste no agrupamento de bactérias isoladas da região Nordeste com *P. phymatum* e *P. diazotrophica*, além de um grupo mais externo contendo uma estirpe de *Burkholderia vietnamiensis*, que faz parte do complexo “BCC” (traduzido como “Complexo *Burkholderia cepacia*”), ou seja, apresenta patogenicidade. Vale ressaltar que *B. vietnamiensis*, isolada da rizosfera de *Oryza sativa* L. no Vietnã, foi a primeira evidência relatada de fixação de nitrogênio por um membro do gênero *Burkholderia* (GILLIS et al., 1995). Cabe destacar que, nas árvores dos genes 16S rRNA e *recA*, a *P. phymatum* se apresentou evolutivamente mais próxima de *P. sabiae* do que de *P. diazotrophica*, enquanto na árvore do gene *nifH*, ela é mais próxima de *P. diazotrophica*, o que pode indicar uma transferência horizontal de genes entre essas duas espécies.

Bontemps et al. (2010) identificaram exceções na filogenia do *nifH*, porém não afirmaram ser suficiente para dizer que houve transferência horizontal de genes. Eles relataram ainda que a congruência geralmente alta destes de marcadores moleculares indica uma estrutura genética

bastante estável e com poucas transferências entre as diferentes espécies avaliadas. De forma geral, pode-se dizer que as filogenias do presente estudo foram coerentes e bem suportadas, mas ainda assim, seria interessante incluir na análise do *nifH* as sequências dos representantes do gênero *Rhizobium*.

Além disso, tentativas de amplificar outro gene simbiótico relacionado à nodulação, o *nodC*, foram mal-sucedidas. Segundo Bontemps et al. (2010), a nodulação é uma função ecológica estável e importante que tem origem antiga e é encontrada na maioria das linhagens de *Paraburkholderia*, no entanto eles também não obtiveram sucesso na amplificação de um fragmento de *nodC* para dois complexos de espécies que formaram nódulos quando testados em laboratório e presumiram, então, que estas espécies possuem o gene *nodC* mas suas sequências são muito divergentes. Isto também pode acontecer com a grande maioria dos isolados analisados no presente estudo, pois apenas os que nodularam foram submetidos às análises moleculares e, ainda assim, a amplificação não foi observada.

6.3 Ocorrência de α -proteobactérias do gênero *Rhizobium* em simbiose com o sabiá no bioma Mata Atlântica

O caráter simbiótico em *Mimosa* spp. é considerado generalizado e, no Brasil, as estirpes de *Paraburkholderia* são predominantes nos dois principais centros de diversificação do gênero, os biomas Cerrado e Caatinga (BONTEMPS et al., 2010; REIS JUNIOR et al., 2010). No presente estudo, ao se comparar as bactérias isoladas de sabiá tanto provenientes de seu ambiente nativo quanto adaptados em locais onde predomina o bioma Mata Atlântica, notou-se a presença quase que exclusiva de estirpes próximas a *P. diazotrophica* no clado dos isolados do Nordeste e de *P. sabiae* no clado dos isolados do Sudeste. No entanto, como mencionado anteriormente, três isolados do Rio de Janeiro foram identificados como *Rhizobium*: 13P1 (Seropédica-RJ), 19AP3 (Itaguaí-RJ) e 9P4 (Mangaratiba-RJ).

Este fato mostra que o sabiá teve a capacidade, fora de seu ambiente nativo, de se associar à bactérias do gênero *Rhizobium* que se encontravam em solos do bioma Mata Atlântica. Não foram encontrados relatos desta espécie nodulando com bactérias deste gênero em solos da Caatinga, o que indica uma “plasticidade simbiótica” que favorece sua adaptação a novos ambientes. Bontemps et al. (2010) e Reis Junior et al. (2010) mostraram em seus estudos que, outra espécie de *Mimosa*, a *Mimosa xanthocentra* Mart., endêmica do Cerrado e Caatinga, se associou com estirpes do gênero *Rhizobium* e apontaram a preferência da mesma por estes simbiontes em solos nativos.

Nas filogenias do 16S rRNA e *recA* o grupo das α -proteobactérias foi formado pelo gênero *Rhizobium*, que abrange várias espécies e estirpes de alta importância agrônômica como o *R. tropici* e o *R. freirei*, que são utilizados com sucesso como inoculantes em culturas de feijão comum no Brasil (DALL’AGNOL et al. 2016). Diante disto, falando sobre a coerência das similaridades encontradas no grupo dos α -rizóbios em comparação àquelas publicadas na literatura, a bactéria 19AP3 formou, na árvore do gene 16S rRNA, um grupo isolado com duas estirpes de *Rhizobium* sp. e ficou próxima de *R. mongolense*. Na árvore do *recA*, ela se agrupou também com *R. mongolense* e *R. etli*, o que é congruente com a filogenia vista no trabalho de Van Berkum et al. (1998). Vale comentar que, Wang et al. (1999) propuseram uma nova variante dentro da espécie *R. etli*, pois verificaram sua capacidade simbiótica em associação com a espécie de leguminosa *Mimosa affinis*, nativa do México.

Já a bactéria 9P4 ficou próxima de *R. miluonense* na filogenia do gene 16S rRNA e de *R. tropici* na do *recA*. A bactéria 13P1 se agrupou com *R. hainanense*, *R. multihospitium*, *R. tropici* e *R. freirei* na árvore do 16S rRNA e de *R. hainanense* na do *recA*, o que também é considerado coerente pois elas formam um grupo bem suportado na filogenia publicada por

Dall'Agnol et al. (2013). Não foram encontrados, até então, relatos de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. nodulando com estas espécies de α -rizóbios.

Bontemps et al. (2010) investigaram a diversidade de simbioses de um grande número de espécies de *Mimosa* em três regiões do Brasil Central, onde também foram isoladas estirpes de α -proteobactérias do gênero *Rhizobium* e a espécie hospedeira em questão foi a *Mimosa xanthocentra* Mart., como já mencionado anteriormente. Segundo Bournaud et al. (2013) a capacidade das leguminosas de formar simbiose com o gênero *Paraburkholderia* não é antagônica a presença de α -rizóbios, uma vez que eles também encontraram os dois tipos de simbioses em seis espécies do grupo *Piptadenia*. Eles afirmam também, que as condições ambientais (especialmente as características do solo) desempenham papel crucial na sobrevivência e biogeografia dos simbioses.

6.4 Características do solo influenciam o padrão de distribuição dos simbioses em *Mimosa spp*

O estudo de Pires et al. (2017) comparou a predominância das espécies das duas classes (α e β -rizóbios) em solos com diferentes características. Eles afirmaram que a ocorrência de certas espécies em nódulos de *Mimosa* depende diretamente das propriedades do solo, e cultivaram três “espécies-isca” de *Mimosa* em três tipos de solos quimicamente diferentes. Os resultados mostraram que em solos de baixa fertilidade e baixo pH (mais ácidos) predominam bactérias do gênero *Paraburkholderia* e no solo caracterizado como fértil e com o pH neutro predominam bactérias do gênero *Rhizobium*. Uma única estirpe de *Paraburkholderia* foi identificada no solo mais neutro e fértil analisado por eles. As conclusões do trabalho acima citado, corroboram a ideia de que o gênero *Rhizobium* prefere solos menos ácidos e mais férteis (BARAÚNA et al. 2016; BONTEMPS et al. 2016). Vale ressaltar que, no presente estudo, foram identificados α e β -rizóbios nodulando o sabiá nos municípios de Seropédica (P1), Itaguaí (P3) e Mangaratiba (P4), onde foram identificadas tanto bactérias do gênero *Paraburkholderia* quanto do gênero *Rhizobium* (mesmo que em menor quantidade).

Dall'Agnol et al. (2017) coletaram amostras de solo da Mata Atlântica e inocularam em duas espécies consideradas promíscuas: a *Mimosa pudica* (L.) e *Phaseolus vulgaris* (L.), com o objetivo de capturar e identificar a diversidade dos simbioses. Curiosamente eles isolaram *P. sabiae* e bactérias do gênero *Cupriavidus*, ambos β -rizóbios, de amostras de solo de Seropédica (RJ) com o pH próximo da neutralidade (pH = 6,8), o que não é muito comum visto que estes gêneros preferem solos mais ácidos (BONTEMPS et al., 2010; REIS JUNIOR et al., 2010; PIRES et al., 2017). Apesar disso, o simbiote predominante nas amostras de solo coletadas de Seropédica (RJ) foi identificado como *Mesorhizobium plurifarum*, onde o pH variou de 6,8 a 7. No estudo acima citado, a bactéria *P. sabiae* também foi isolada de nódulos de *P. vulgaris* (pH do solo = 6,4) e *M. pudica* (pH do solo = 5,1) inoculados com solos de Rio das Ostras (RJ), o que demonstra a capacidade de adaptação deste simbiote com outros hospedeiros e em condições diferenciadas.

No presente trabalho, os atributos dos solos coletados não foram determinados, mas sabe-se que a maioria dos isolados avaliados da região sudeste agruparam-se com *P. sabiae*. Os resultados de Dall'Agnol et al. (2017) indicam a ocorrência natural desta bactéria em amostras de solo da Mata Atlântica, tanto em condições ácidas quanto neutras. Além disso, eles descobriram que a maioria das espécies simbióticas isoladas dos solos da Mata Atlântica também pertencem ao gênero *Paraburkholderia*, como os resultados aqui mostraram. Diante disso, pode-se dizer que há necessidade de se estudar mais profundamente a relação entre os atributos do solo e a distribuição das espécies de rizóbios. Isto poderia explicar a ocorrência de espécies do gênero *Rhizobium* em simbiose com espécies de *Mimosa* na Mata Atlântica, como verificado no presente estudo.

Lemaire et al. (2016), que também relataram a forte influência do solo nas associações simbióticas avaliadas e sobre o crescimento de leguminosas em solos não nativos, como é o caso do sabiá na região Sudeste, afirmaram que a formação de nódulos só acontece, nesses casos, quando populações naturalizadas de rizóbios compatíveis estão disponíveis no solo. O fato de *P. sabiae* ter sido isolada de nódulos de sabiá no bioma Mata Atlântica, já seria um indício de que este seria o simbiote predominante nas condições de solo encontradas nesse bioma, mas isso não anula o fato dessa bactéria ter sido encontrada nodulando também outras espécies inoculadas em solos mais ácidos ou neutros do mesmo bioma (DALL'AGNOL et al.,2017) e nodulando sabiá no bioma Caatinga (MARTINS et al.,2015).

7. CONCLUSÕES

- Pode-se concluir que, em associação com o sabiá, *Paraburkholderia sabiae* foi prevalente em solos do Bioma Mata Atlântica e *Paraburkholderia diazotrophica* foi prevalente em solos do Bioma Caatinga;
- O sabiá tem a capacidade de se associar com bactérias do gênero *Rhizobium* em solos do Bioma Mata Atlântica, fora de sua região de origem, o que denota sua capacidade de adaptação a diferentes simbioses.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, E.K. & ALLEN, O.N. **The Leguminosae: A Source Book of Characteristics Uses and Nodulation.** Wisconsin, University of Wisconsin Press. 812 p. 1981.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. E LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology** 215:403-410. 1990.
- ANGUS AA; AGAPAKIS C.M; FONG S.; YERRAPRAGADA S.; ESTRADA DE LOS SANTOS P.; YANG P.; SONG N.; KANO S.; CABALLERO-MELLADO J.; DE FARIA S.M.; DAKORA F.D.; WEINSTOCK G.; HIRSCH A.M. Plant Associated Symbiotic *Burkholderia* Species Lack Hallmark Strategies Required in Mammalian Pathogenesis. **PloS One**; v. 9, e83779, 2014.
- ARDLEY, J.K.; PARKER M.A.; DE MEYER S.E.; TRENGOVE R.D.; O'HARA G.W.; REEVE W.G.; YATES R.J.; DILWORTH M.J.; WILLEMS A.; HOWIESON J.G. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2579-2588, 2012.
- AZANI, N.; BABINEAU, M.; BAILEY, C. D. et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77. 2017.
- BABIC, K.H; SCHAUSS, K; HAI, B.; SIRORA, S.; REDZEPOVIC, S., RADL, V.; SCHLOTTER, M. Influence of diferente *Sinorhizobium melioli* inocula on abundance of genes involved in nitrogen transformations in the rhizosphere of alfafa (*Medicago sativa* L.). **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2903 – 3185, 2008.
- BALBINO, E., CARNEIRO, J.G.A., BARROSO, D.G., PAULINO, G.M., LAMÔNICA, K.R. Crescimento inicial e fertilidade do solo em plantios puros e consorcioados de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.38, n.85, p.27-37, 2010.
- BARAÚNA A.C.; ROUWS L.F.M.; SIMOES-ARAÚJO J.L.; dos REIS JUNIOR F.B.; IANNETTA P.P.M.; MALUK M.; GOI S.R.; REIS V.M.; JAMES E.K.; ZILLI J.E. *Rhizobium altiplani* sp. nov. isolated from effective nodules on *Mimosa pudica* growing in untypically alkaline soil in Central Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 4118-4124, 2016.
- BLAHA D.; PRINGENT-COMBARET C.; MIRZA M.S.; Moënné-Loccoz MOENNE-LOCCOZ Y. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. **FEMS Microbiol Ecology**, v.56, P. 455–470, 2006.
- BONTEMPS C.; ELLIOT G.N.; SIMON M.F.; DOS REIS JÚNIOR F.B.; GROSS E.; LAWTON R.C.; NETO N.E.; LOUREIRO M.F.; DE FARIA S.M.; SPRENT J.I.; JAMES E.K.; YOUNG J.P.W. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 44–52, 2010.

BONTEMPS C.; ROGEL M.A.; WIECHMANN A.; MUSSABEKOVA A.; MOODY S.; SIMON M.F.; MOULIN L.; ELLIOT G.N.; LACERCAT-DIDIER L.; DA SILVA C.; GREYER R.; CAMARGO-RICALDE S.L.; CHEN W.; SPRENT J.I.; MARTÍNEZ ROMERO E.; YOUNG J.P.W.; JAMES E.K. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. **New Phytologist** v. 209:319, p.333, 2016.

BOURNAUD C.; DE FARIA S.M.; DOS SANTOS J.M.F.; TISSEYRE P.; SILVA M.; CHAINTREUIL C.; GROSS E.; JAMES E.K.; PRIN Y.; MOULIN L. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the Piptadenia group (tribe Mimoseae). **PLoS One**, v.8, e63478, 2013.

BROUGHTON W.J.; HANIN M. RELIC B.; KOPCŃSKA J.; GOLINOWSKI S.S.; REUHS O.; REUHS B.; MARIE C.; KOBAYASHI H.; BORDOGNA B.; LE QUÉRÉ A.; JABBOURI S.; FELLAY R.; PERRET X.; DEAKIN W.J. Flavonoid- inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3654-3663, 2006.

BRUIJN, F. J. de; RADEMAKER, J.; SCHNEIDER, M. Rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacteria and Computer-Assisted Phylogenetic Analyses. In: **Biology of Plant-Microbe Interaction**; Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions (G. Stacey, B. Mullin and P. Gresshoff, Eds.) APS Press, p. 497-502, 1996.

BRUNEAU A.; MERCURE M.; LEWIS G.P.; HERENDEEN P.S. Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes. **Botany**, v. 86, p. 697–718, 2008.
BUCHANAN, R.E. Approved lists of bacterial names. In: SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A., eds. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.30,p.225-240. 1980.

CANNON, F.C.; DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R.; PRIMROSE, S.B. Chromosomal integration of Klebsiella nitrogen fixation genes in Escherichia coli. **Journal of General Microbiology**, v.80, n.1, p. 227-239, 1974.

CARDOSO D.; PENNINGTON R.T.; DE QUEIROZ L.P.; BOATWRIGHT J.S.; VAN WYK B.E.; WOJCIECHOWSKI M.F.; LAVIN M. Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. **South African Journal Botany**. v.89, p. 58–75, 2013b.

CARVALHO, P.E.R. **Sabiá – *Mimosa caesalpinifolia***. Colombo-PR, 2007. 10p. (Embrapa Florestas: Comunicado Técnico, 135).

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

CHEN, W.M.; JAMES, E.U.; 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 Phytologist**, v.168, p.661–675, 2005b.

CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; CHOU, J.H.; JAMES, E.K.; ELLIOT, G.N.; SPRENT, J.I.; BONTEMPS, C. YOUNG, J.P.W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58,n.9,p.2174-2179, 2008b.

CHEN, W.-M.; LAESENS, S.; LEE, T.-M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1729-1735, 2001.

CHEN, W.-M.; WU, C.H.; JAMES, E. K.; CHANG, J.-S. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 151, n. 2-3, p. 364-371, 2008a.

COENYE T.; VANDAMME P.; GOVAN J. R. W.; LIPUMA J.J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3427-3436, 2001.

COENYE, T. & VANDAMME, P. Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects the lactic acid bacteria as a test case. **Microbiology**, v.149, p.3507-3517, 2003.

COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARREL, D. M.; BANDELA, A. M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, v. 35, D169-D172, 2007.

COWAN, S.T. A dictionary of microbial taxonomic usage. **Oliver & Boyd**, Edinburgh, 1968.
DA SILVA K.; FLORENTINO L.A.; DA SILVA K.B.; BRANDT E.; VANDAMME P.; MOREIRA F.M.S. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 175–182, 2012.

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

DALL'AGNOL R.F. **Taxonomia e Filogenia de Alfa e Beta rizóbios provenientes de solos dos Cerrados e da Mata Atlântica**. 2016. 217f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Londrina – Londrina, PR.

DALL'AGNOL, R. F.; PLOTTEGHER, F.; SOUZA, R. C.; MENDES, I. de C.; REIS JUNIOR, F. B. dos; BÉNA, G.; MOULIN, L.; HUNGRIA, M. *Paraburkholderia nodosa* is the main N₂-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian 'Cerradão'. **FEMS Microbiology Ecology**, 2016, v. 92, n. 8, 14 p., nov. 2016.

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; LINDSTRÖM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M.

Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 369-382, 1998.

DELONG, E.F.; WICKHAM, G.S.; PACE, N.R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. **Science**, v.243, p.1360-1363, 1989.

DIXON, E.; EADY, R.R.; ESPIN, G. Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster with gene fusions. **Nature**, v.286, p.128-132, 1980.

DOBRITSA A.P.; SAMADPOUR M. Transfer of eleven *Burkholderia* species to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov., a new genus to accommodate twelve species of *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. **International Journal System Evolutionary Microbiology**, v.66, p.2836-2846, 2016.

ELLIOT 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.; JAMES E.K. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, v.11, p.762-778, 2009.

ELLIOT, G.N.; CHEN, W.M.; CHOU, J.H.; WANG, H.C.; SHEU, S.Y.; PERIN, L.; REIS, V.M.; MOULIN, L.; SIMON, M.F.; BONTEMPS, C.; SUTHERLAND, J.M.; BESSI, R.; FARIA, S.M.; TRINICK, M.J.; PRESCOTT, A.R.; SPRENT, J.I. JAMES, E. K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist** [S.I.], v.173, n.1, p.168-180, 2007.

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**, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

ESTRADA DE LOS SANTOS P.; ROJAS-ROJAS F.U.; TAPIA-GARCÍA E.Y.; VÁSQUEZ-MURRIETA M.S.; HIRSCH A.M. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. **Ann Microbiol**, v.66, p. 1303–1314, 2015.

FELFILI, J.M.; SILVA JUNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; MACHADO, J.W.B.; WALTER, B.M.T.; SILVA, P.E.N.; HAY, J.D. Análise comparativa da florística e fitossociologia da vegetação arbórea do cerrado sensu stricto na Chapada Pratinha, D.F. Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 6, p. 27-46, 1993.

FRANCO, A. A. et al. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: Embrapa CNPDS, 8 p. 1992 (Embrapa. CNPDS. Comunicado Técnico, 9).

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin Press, 1932. 343 p.

FRED, E.B.; WAKSMAN S.A. Yeast extract-manitol agar. **Laboratory manual of general microbiology**. McGraw-Hill, New York, p 145, 1928.

GARRITY G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. *Alphaproteobacteria* class. nov. In Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published

Outside the IJSB, List no. 107. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1-6, 2006.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. Class II. *Betaproteobacteria* class. nov. In: BRENNER, D. J. (editors), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed., v. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, p. 575, 2005a.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. Family IX. *Methylobacteriaceae* fam. nov. In: D.J. BRENNER (editors). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, p. 567, 2005b.

GARRITY, G.M. & HOLT, J.G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9th ed., v.1, The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria 2nd ed. New York: The Williams & Wilkins, Springer-Verlag, 2001, p.119-154.

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

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

GILLIS, M.; TRAN, V.V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.45, p. 274–289, 1995.

GOMES, P. **Forragens fartas na seca**. 4 ed. São Paulo: Nobel, 1977, 238p.

GRUZMAN, I; DOBEREINER, J. IN: **Anais da IV reunião latino americana sobre inoculantes para leguminosas**. Porto Alegre, p. 84, 1968.

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A.M.; MOULIN, L.; CHEN, W.M.; ELLIOT, G.N.; BONTEMPS, C.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; GROSS, E.; DOS REIS JUNIOR F.B.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W; JAMES, E.K. Legume-nodulating betaproeteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.24, p. 1276–1288, 2011.

HAO, B., LI, W., MU, L. C., LI, Y., ZHANG, R., TANG, M., X., BAO, W., K. A study of conservation genetics in *Cupressus chengiana*, na endangered endemic of China, Using ISSR Markers. **Biochemical Genetics**, v.44, p.29-43, 2006.

HUNGRIA M.; VARGAS M.A.T.; ARAUJO R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Ed.) **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997, p.189-295.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. (Embrapa Soja. Circular Técnica 35/ Embrapa Cerrados. Circular Técnica 13). 48p.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M.O.; MENNA, P.; BANGEL, E.V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 79).

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 819-830, 1997.

JORDAN, D. C. *Rhizobium*. In: KRIEG, N. R. e HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 235-242. 1984.

JORDAN, D.C. & ALLEN, N.O. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In: BUCHNAN, R.E.; GIBBONS, N.E , eds. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. v.1 Baltimore London: Williams & Wilkins Co., 1974. p.235-244.

JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.136-139, 1982.

KAJITA, T.; OHASHI, H.; TATEISHI, Y.; DOYLE, J.J. rbcL and legume phylogeny with particular reference to Phase-oleae, Millettieae and allies. **Systematic Botany**, v.26, p.515–536, 2001.

KARPATI, F.; JONASSON, J. Polymerase chain reaction for the detection of *Pseudomonas eruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* in sputum of patients with cystic fibrosis. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, p. 397–403, 1996.

KOCHIEVA, E.Z.; RYZHOVA, N.N., LEGKOBIT, M.P., KHADEEVA, N.V. RAPD and ISSR analyses of species and populations of the genus *Stachys*. **Russel J Genet**, v.42. p.723–727, 2006.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Res**, v.5p.408-418, 1995.

KUZNETSOVA, O.I., ASH, O.A., HARTINA, G.A. GOSTIMSKIJ, S.A. RAPD and ISSR analyses of regenerated pea *Pisum sativum* L. plants. **Russel Journal Genetics**, v.41, p.60-65, 2005.

LARANJO, M.; ALEXANDRE, A.; OLIVEIRA, S. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. **Microbiological Research**, v.169, n.1, p. 2–17, 2014.

LAVIN, M.; HERENDEEN, P.S.; WOJCIECHOWSKI, M.F. Evolution-ary Rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. **Systematic Biology**, v.54, p.575–594, 2005.

LEMAIRE, B.; CHIMPHANGO, S.B.M.; STIRTON, C.; RAFUDEEN, S.; HONNAY, O.; SMETS, E.; CHEN, W.M.; SPRENT, J.; JAMES, E.K.; MUASYA A.M. Biogeographical patterns of legume-nodulating *Paraburkholderia*: from African Fynbos to continental scales. **Applied and Environmental Microbiology**, v.82, p.5099–5115, 2016.

LESSIE, T.G.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B.D.; DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiol Lett**, v.144, p. 117–128, 1996.

LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens. 577 p. 2005.

LI, Y.Y., CHEN, X.Y., ZHANG, X. Genetic Differences between Wild and Artificial Populations of *Metaseqoia glyptostroboides*: Implications for Species Recovery, **Conversation Biology**, v.19, p.224-231, 2005.

LIN, D.X.; WANG, E.T.; TANG, H.; HAN, T.X.; HE, Y.G.; CHEN W.X. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1409-1413, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. V. 1. 351p.

LPSN. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em: 05 Fev.2018.

LPWG, Legume Phylogeny Working Group. Towards a new classification system for legumes: Progress report from the 6th International Legume Conference. **South African Journal of Botany**, v.89, p.3–9, 2013b.

MAHENTHIRALINGAM E.; BALDWIN A.; DOWSON C.G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1539–1551, 2008.

MARTINS, P.G.S.; LIRA JUNIOR, M.A.; FRACETTO, G.G.M.; BASTOS DA SILVA, M.L.R.; VINCENTIN, R.P.; PEREIRA DE LYRA, M.C.C. *Mimosa caesalpiniiifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, v.197, p. 459-469, 2015.

MAYNAUD, G.; WILLEMS, A.; SOUSSOU, S.; VIDAL, C.; MAURÉ, L.; MOULIN, L.; CLEYET-MAREL, J.C.; BRUNEL, B. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legumenodulating bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 65-72, 2012.

MCKEY, D. **Legume and nitrogen**: The evolutionary ecology of a nitrogen demanding lifestyle. In: SPRENT, J. I.; MCKEY, D. (Ed.). *Advances in legume systematic*. 5. The nitrogen factor. Kew: Royal Botanic Gardens, 1994. p. 211-228.

MENDES, B.V. **Plantas das Caatingas**: umbuzeiro, juazeiro e sabiá. Mossoró: Fundação Vingt-Unt Rosado, 2001. 110p. (Coleção Mossoroense).

MENDES, B.V. **Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.)**: valiosa forrageira arbórea e produtora de madeira das caatingas. Mossoró: ESAM, 1989. 31p. (Coleção Mossoroense, 660, Série B).

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene a of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-32, 2006.

MICHÉ, L.; FAURE, D.; BLOT, M.; CABANNE-GIULI, E.; BALANDREAU, J. Detection and activity of insertion sequences in environmental strains of Burkholderia. **Environmental Microbiology**, v.3, p.766–773, 2001.

MOREIRA, F.M.S., SILVA, M.F., DE FARIA, S.M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **The New Phytologist**, London , v. 121, p. 563- 570, 1992.

MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 729 p. 2006.

MORGANTE, P. G. **Fixação biológica e assimilação de nitrogênio**. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/3319817/Fixacao-Biologica-e-Assimilacao-de-Nitrogenio>, 2003>. Acesso em: 02 Fev.2018.

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

MOUSAVI, S.A., OSTERMAN, J., WAHLBERG, N., NESME, X., LAVIRE, C., VIAL, L., PAULIN, L., DE LAJUDIE, P., LINDSTROM, K. Phylogeny of the *Rhizobium*–*Allorhizobium*–*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. **Syst. Appl. Microbiol.** 37, 208–215. 2014.

MOUSAVI, S.A.; WILLEMS, A.; NESME, X.; DE LAJUDIE, P.; LINDSTROM, K. Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 84-90, 2015.

ODUM, E.P. **Fundamentos de ecologia**. 6ª ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 976p.

OLIVEIRA, L.M.; DAVIDE, A.C.; CARVALHO, M.L.M. Avaliação de métodos para quebra de dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel)) Taubert. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.27, n.5, p597-603. 2003.

OREN, A.; GARRITY, G.M. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 2028-2029, 2015.

PASSOS, M.A; TAVARES, K.M.P; ALVES, A.R. Germinação de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** [S.I], v.2, n.1, p.51-56, 2007.

PAYNE, G.W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S.H.; LIPUMA, J.J.; CONYE, T.; WEIGHTMAN, A.J.; JONES, T.H.; MAHENTHIRALINGAN, E. Development of a *recA* Gene-Based Identification Approach for the Entire *Burkholderia* Genus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.3917-3927, 2005.

PIRES, R.C.; DOS REIS JÚNIOR, F.B.; ZILLI, J.E.; FISCHER, D.; HOFMANN, A.; JAMES, E.K.; SIMON, M.F. Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of *Mimosa* in central Brazil. **Plant and Soil**. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3521-5>. 2017.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; VERSALOVIC J.; DE BRUIJN, F. J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. **Molecular Microbial Ecology Manual**. v.2, p.1-26, 2004.

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

RIBASKI, J.; LIMA, P.C.F.; OLIVEIRA, V.R; DRUMOND, M.A. **Sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*)** Árvore de Múltiplo uso no Brasil. Colombo PR, 2003. 4p. (Embrapa Florestas: Comunicado Técnico, 104).

RICKFLES, R.E. **A economia da natureza**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. 503p.
RIVAS, R.; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. **Microbiology Insights**, v. 2, p. 51-69, 2009.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; SUBBA-RAO, N.S; MATEOS, P.F.; DAZZO, F.B.; KROPPESTEDT, R.M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁZQUEZ, E. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 47-53, 2003.

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. 2 ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 1995. 294p.

RIZZINI, C.T.; MORHS, W.B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo, EPU/EDUSP, 1976. 235p.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, E.T.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1988.

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

SHELLY, D. B.; SPILKER, T.; GRACELY, E.J.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.J. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3112–3115, 2000.

SHEU, S.Y.; CHOU, J.H.; BONTEMPS, C.; ELLIOT, G.N.; GROSS, E.; DOS REIS JÚNIOR, F.B.; MELKONIAN, R.; MOULIN, L.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; CHEN, W.M. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 435-441, 2013.

SHEU, S.Y.; CHOU, J.H.; BONTEMPS, C.; ELLIOT, G.N.; GROSS, E.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; CHEN, W.M. *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2272-2278, 2012.

SIMON, M.F.; GREYER, R.; DE QUEIROZ, L.P.; SKEMA, C.; PENNINGTON, R.T.; HUGHES, C.E. Recent assembly of the Cerrado, a Neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.106, p. 20359–20364, 2009.

SOLBRIG, O.T. The diversity of the savanna ecosystem. In: SOLBRIG, O.T.; MDEINA, E.; SILVA, J.A. (Ed.). **Biodiversity and savanna ecosystem processes**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. p. 1-27.

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

SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G.J.; WADDELL, P.J.; HILLIS, D.M. Phylogenetic Inference. In Hillis, D.M.; MORTIZ, D.; MABLE, B.K.; editors, **Molecular Systematics**, p.407-514. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. **Molecular Biology and Evolution** 9: 678-687. 1992.

TORRES, A.R.; ARAÚJO, W.L.; CURSINO, L.; HUNGRIA, M.; PLOTEGHER, F.; MOTASSO, F.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic enterobacteria associated with diferente host plants. **The Journal of Microbiology**, v.46, n.4, p.373-379, 2008.

TRUJILLO, M.E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A.M.; RIVAS, R.; LUDEÑA, D.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁSQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v, 71, p. 1318-1327, 2005.

TRUPER, H.G. & SCHLEIFER, K.H. Prokaryote characterization and identification. In: Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H., (Eds.), **The Prokaryotes**, Springer, New York, 2nd edn, 1, pp. 126-148, 1991.

VANDAMME, P.; GILLIS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

WANG, E.T.; ROGEL, M.A.; GARCÍA DE LOS SANTOS, A.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; CEVALLOS, M.A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1479-1491, 1999.

WANG, R-F.; CAO, W-W; CERNIGLIA, C. E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 341-343. 1996.

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

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, v.51, p.221-271, 1987.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.87, p.4576-4579, 1990.

XAVIER, G.R; MARTINS, L.M.V.; RIBEIRO, J.R.A.; RUMJANEK, N.G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, v.19, n.01, p. 25-33, 2006.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov., **Microbiology Immunology**, v. 36, p.1251-1275, 1992.

ZHANG, D.F; CHEN, S.L.; CHEN, S.Y.; ZHANG, D.J; GAO, Q. Patterns of genetic variation in *Swertia przewalskii*, na endangered endemic species of the Qinghai-Tibet plateau. **Biochemical Genetics**, v.45, p.33-50, 2007.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 2A: Discriminação da origem dos isolados e/ou amostras de solo, número de isolados selecionados no início do estudo, seus respectivos códigos e coordenadas geográficas (quando informada).

ORIGEM DO SOLO	RESPONSÁVEL PELA COLETA DO SOLO E/OU ISOLAMENTO	NÚMERO DE ISOLADOS	CÓDIGOS	COORDENADA GEOGRÁFICA
FORTALEZA – CE	Cultura enviada pelo Laboratório de Microbiologia do Solo – DENAE à coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ)	01	BR 3424 (UFC 813.35)	Não informada
NATAL – RN	Isolados de solo coletado pelo Mestrando Felipe Ferreira e cedidos para o atual estudo	05	RN	5° 15' 28'' S; 36° 34' 49'' O
PETROLINA – PE	Cultura enviada pela Embrapa Semi-Árido (CPATSA) ao Laboratório de Leguminosas Florestais da Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ)	10	CPATSA	Não informada
JUAZEIRO – BA	Amostra de solo enviada pela Pesquisadora Dr. Lindete Martins da Universidade do Estado da Bahia e isolados capturados pelo bolsista Jairo Tenório	15	JUA	9° 25' 19.76'' S; 40° 29' 16.05'' O
ITAGUAÍ – RJ	Coleta de solo e isolamento realizados pelo bolsista Jairo Tenório	10	P3	Não informada
MANGARATIBA – RJ	Coleta de solo e isolamento realizados pelo bolsista Jairo Tenório	14	P4 e PM	K 0600256 UTM 7464349
SEROPÉDICA – RJ	Coleta de solo e isolamento realizados pelo bolsista Jairo Tenório	30	P1 e SAB	22° 45' 33'' S; 43° 40' 17'' O

*Marcados em cinza claro: isolados de municípios da região Nordeste do Brasil; *Marcados em cinza escuro: isolados de municípios da região Sudeste do Brasil

ANEXO B

Tabela 3B: Descrição das características morfológicas em meio de cultivo 79 com azul de bromotimol de 83 isolados de nódulos de sabiá de diferentes localidades entre as regiões Nordeste e Sudeste do Brasil.

Código do isolado ¹	Tempo de crescimento ²	pH ³	Produção de muco ⁴	Massa de crescimento ⁵	Forma e Tamanho da colônia ⁶	Elevação da colônia ⁷	Borda da colônia ⁸	Superfície da colônia ⁹	Transparência ¹⁰	Cromogênese ¹¹
SAB6 QD 4 (A)*	Rápida	Alcalino	Pouca	Consistente	Circular - (3 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
SAB6 QD	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular - (3 mm)	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme
SAB11 QD 4	Rápida	Alcalino	Pouca	Consistente	Circular - (3 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme
SAB 8B QD 3 (C1)	Rápida	Alcalino	Escassa	Seca	Circular- (1,5 mm)	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
SAB 8C QD (B2)	Muito rápida	Ácido	Moderada	Consistente	Irregular- (3 mm)	Plana	Ondulada	Lisa	Opaca	Amarelo
SAB 6 QD 1 (A)	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular- (2 mm)	Plana	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme
PM1-2	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular- (Tamanho 2,5 mm)	Plana	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme
PM2-1;	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Circular- (2,5 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme
PM2-2	Rápida	Ácido	Moderada	Consistente	Irregular- (3 mm)	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme
PM3-1;	Rápida	Ácido	Moderada	Consistente	Irregular- (3 mm)	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme
PM3-2	Rápida	Ácido	Moderada	Consistente	Irregular- (3 mm)	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme
JUA1-2	Rápida	Neutro	Escassa	Seca	Irregular- (2,5 mm)	Plana	Lobada	Lisa	Opaca	Amarelo
JUA1-3	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Circular- (2mm)	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Amarelo
JUA1-5A	Rápida	Neutro	Escassa	Seca	Circular- (2mm)	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Amarelo
JUA1-6; JUA1-7A	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Circular – (2 mm)	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Creme

Continua...

TABELA 3B,
Continuação.

JUA1-7C	Muito rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Circular – (3 mm)	Convexa	Inteira	Lisa	Opaca	Laranja
JUA1-8A	Muito rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular – (4mm)	Plana	Lobada	Lisa	Opaca	Creme
JUA2-6	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Circular – (2,5 mm)	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
JUA2-7	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular – (3 mm)	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme
JUA2-8	Rápida	Ácido	Moderada	Consistente	Circular – (3mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
JUA 3-2	Rápida	Ácido	Moderada	Consistente	Circular – (3 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme
JUA3-4	Rápida	Neutro	Escassa	Seca	Irregular – (2 mm)	Plana	Lobada	Lisa	Opaca	Branco
JUA1-7B	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Puntiforme (até 1 mm)	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
JUA2-5	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Puntiforme (até 1 mm)	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
JUA3-1	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Puntiforme (até 1 mm)	Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Branca
CPATSA 800	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular- (2 mm)	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Creme
CPATSA 803	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Circular - (3,5 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Creme
CPATSA 806	Rápida	Neutro	Moderada	Consistente	Circular – (3 mm)	Convexa	Inteira	Lisa	Translúcida	Branco
CPATSA 825	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular – (2,5 mm)	Plana	Lobada	Lisa	Opaca	Creme

Continua...

TABELA 3B, Continuação.											
CPATSA 832	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Circular (1,5 mm)	– Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Branco	
CPATSA 848; 885	Rápida	Ácido	Moderada	Consistente	Circular (3,5 mm)	– Convexa	Inteira	Lisa	Opaca	Branco	
CPATSA 853	Rápida	Ácido	Escassa	Seca	Irregular (3 mm)	– Plana	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco	
CPATSA 870	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Puntiforme (até 1mm)	– Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Branco	
CPATSA 877	Rápida	Ácido	Moderada	Consistente	Circular (2 mm)	– Convexa	Inteira	Lisa	Opaca	Creme	
5P1 (5B)	Muito rápida	Neutro	Moderada	Consistente	Circular (2 mm)	– Convexa	Inteira	Lisa	Opaca	Laranja	
11P1; 12P1 (I); 25AP1	Rápida	Ácido	Abundante	Consistente	Circular (3,5 mm)	– Convexa	Inteira	Lisa	Transparente	Incolor	
15A2P2 (II)	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Irregular (3 mm)	– Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Laranja	
15BP1	Rápida	Neutro	Moderada	Consistente	Circular (3 mm)	– Pulvionada	Ondulada	Lisa	Translúcida	Laranja	
15A1P1; 27BP1 (II)	Rápida	Neutro	Escassa	Seca	Circular (2 mm)	– Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Branco	
10P1; 18AP1; 19P1	Muito rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular (2,5 mm)	– Convexa	Ondulada	Lisa	Opaca	Laranja	
6P1; 13P1 ; 27BP1 (I)	Rápida	Ácido	Abundante	Aquosa	Circular (5 mm)	– Pulvionada	Inteira	Lisa	Transparente	Incolor	
4BP1; 7P1	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Circular (1,5 mm)	– Plana	Inteira	Lisa	Opaca	Branco	
8P1 (I); 14P1	Rápida	Alcalino	Pouca	Consistente	Circular (2,5 mm)	– Plana	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco	

Continua...

TABELA 3B, Continuação.										
1P2	Rápida	Neutro	Abundante	Consistente	Circular – (3 mm)	Convexa	Inteira	Lisa	Translúcida	Creme
4P2	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Circular – (1,5 mm)	Convexa	Inteira	Lisa	Opaca	Amarelo
6P2	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular – (3 mm)	Lenticular	Ondulada	Rugosa	Translúcida	Branco
2AP2; 2CP2	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular – (2 mm)	Convexa	Ondulada	Lisa	Opaca	Amarelo
8DP3; 15P3	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Circular – (3 mm)	Lenticular	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco
8C1P3	Rápida	Alcalino	Pouca	Consistente	Puntiforme (até 1 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Translúcida	Incolor
12P3 (II)	Rápida	Alcalino	Pouca	Consistente	Circular – (2,5 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
11P3	Rápida	Neutro	Moderada	Aquosa	Circular – (2 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Translúcida	Incolor
19BP3	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Circular – (2 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
19AP3	Rápida	Ácido	Abundante	Aquosa	Circular – (4 mm)	Pulvionada	Inteira	Lisa	Translúcida	Incolor
8BP3; 19P3;21P3	Rápida	Ácido	Abundante	Consistente	Circular – 4 mm)	Pulvionada	Inteira	Lisa	Transparente	Incolor
1AP4	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Circular – (4 mm)	Plana	Inteira	Lisa	Translúcida	Incolor
5AP4	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Circular – (2 mm)	Convexa	Inteira	Lisa	Opaca	Amarelo
8P4	Rápida	Neutro	Pouca	Consistente	Circular – (2 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco

Continua...

TABELA 3B,
Continuação.

12P4	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular – (3 mm)	Convexa	Ondulada	Lisa	Opaca	Amarelo
9P4	Rápida	Ácido	Moderada	Aquosa	Circular – (5 mm)	Convexa	Ondulada	Rugosa	Transparente	Incolor
1BP4; 18P4	Rápida	Ácido	Pouca	Consistente	Circular – (2 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
9P4; 13BP4	Rápida	Ácido	Abundante	Aquosa	Circular – (3 mm)	Convexa	Inteira	Lisa	Transparente	Incolor
RN-02	Lenta	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular – (2 mm)	Convexa	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco
RN-04	Intermediário	Ácido	Pouca	Consistente	Circular – 2 mm)	Lenticular	Inteira	Lisa	Opaca	Branco
RN-09; RN-11	Intermediária	Ácido	Pouca	Consistente	Circular – (2,5 mm)	Convexa	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco
RN-16	Intermediária	Ácido	Pouca	Consistente	Irregular – (2,5 mm)	Convexa	Ondulada	Lisa	Opaca	Branco

¹Tempo de crescimento em dias: Muito rápida-1 dia; Rápida-2 a 3 dias; Intermediária-4 a 5 dias; Lenta-6 a 10 dias; Muito lenta- acima de 10 dias. ²pH visualizado através do indicador azul de bromotimol contido no meio, sensível à mudança de pH: Ácido- meio de cultura amarelo; Neutro- meio de cultura verde; Alcalino- meio de cultura azul. ³Produção de muco – níveis de classificação: Escassa; Pouca; Moderada; Abundante. ⁴Massa de crescimento – níveis de classificação: Seca; Aquosa; Consistente. ⁵Forma da colônia: Puntiforme (até 1 mm); Circular; Irregular. ⁶Elevação da colônia – níveis de classificação: Plana; Lenticular; Convexa; Pulvinada. ⁷Borda da colônia – níveis de classificação: Inteira; Ondulada; Lobada; Denteada. ⁸Superfície da colônia- níveis de classificação: Lisa; Rugosa; Papilada. ⁹Transparência- níveis de classificação: Transparente; Translúcida; Opaca. ¹⁰Cromogênese (cor da colônia): Incolor; Branco; Creme; Amarelo; Laranja. Códigos: SAB e P1 (Seropédica-RJ); P2 (PESAGRO-Seropédica-RJ); P3 (Itaguaí-RJ); PM e P4 (Mangaratiba-RJ); JUA (Juazeiro-BA); CPATSA (Embrapa Semi-Árido-Petrolina-PE); RN (Natal-RN); *Os códigos que estão destacados em negrito indicam as bactérias que nodularam no experimento de autenticação.

ANEXO C

Tabela 4C: Discriminação dos 22 isolados que foram selecionados após a análise de BOX-PCR agrupados de acordo com o local de origem, com exceção das duas estirpes de referência, que foram utilizados nas análises filogenéticas dos genes 16SrRNA, *recA* e *nifH*.

SEROPÉDICA -RJ	ITAGUAÍ-RJ	MANGARATIBA-RJ	JUAZEIRO-BA	PETROLINA-PE	NATAL-RN	ESTIRPES DE REFERÊNCIA (BR)
SAB QD6	12P3II	1BP4	JUA1-7A	CPATSA 848	11-RN	BR 3407
4BP1	19AP3	8P4	JUA2-8	CPATSA 877		BR 3424
13P1	19BP3	9P4	JUA3-1			
14P1		18P4	JUA3-4			
		PM2-1				
		PM3-1				