

**Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Departamento de Agronomia  
Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas**

**FILOGENIA E DIVERSIDADE MOLECULAR DE SABIÁ (*Mimosa caesalpinifolia*  
Benth.) E DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

**PAULO GEOVANI SILVA MARTINS**

**RECIFE, 2011**

**PAULO GEOVANI SILVA MARTINS**

**FILOGENIA E DIVERSIDADE MOLECULAR DE SABIÁ (*Mimosa caesalpinifolia*  
Benth.) E DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia - Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

**MÁRIO DE ANDRADE LIRA JUNIOR**

**Orientador**

**MARIA DO CARMO CATANHO PEREIRA DE LYRA**

**Co-orientadora**

**MÁRCIO VIEIRA CUNHA**

**Co-orientador**

**RECIFE, 2011**

**PAULO GEOVANI SILVA MARTINS**

**Banca Examinadora**

---

**Orientador: Dr. Mário de Andrade Lira Junior**  
Departamento de Agronomia/UFRPE

---

**Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas**  
Departamento de Agronomia/UFRPE

---

**Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra**  
Laboratório de Genoma/IPA

---

**Dra. Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva**  
Laboratório de Genoma/IPA

*Aos meus pais, João e Maria  
das Neves, aos meus irmãos e  
amigos e a todos que se fizeram  
presente na realização de mais  
uma conquista em minha vida.*

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, por ter me dado força e coragem para enfrentar as dificuldades que encontrei no caminho e pelo meu maior bem, minha Família.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas, pela oportunidade de realização da dissertação.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) por ter permitido a realização da pesquisa no Laboratório de Genoma.

Ao Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior, pelos ensinamentos, orientação e confiança.

A Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra, pela paciência, pela grande amizade e carinho com que sempre me tratou e pelos valiosos e incalculáveis ensinamentos.

A Dra. Maria Luiza Bastos, pelo carinho, amizade, incentivo e boa convivência no laboratório.

Ao MSc. Jadson Emanuel, pela grande ajuda com os isolados de rizóbios.

Aos amigos do Laboratório de Genômica do IPA: Dra. Adalia Mergulhão, Louise, Carolina, Tulio, Núbia e Sr. Edwardo.

À Rayssa Pereira Vincentin, pela enorme amizade, carinho, companheirismo, pela aproximação nas horas de tristeza, pelas horas de alegrias que passamos juntos e pela grande ajuda no início dos experimentos.

À Karla Silva pelo carinho, amizade e bons momentos.

À Marcondes Rodrigues de Oliveira, pela grande amizade, boa convivência e pela força que sempre me deu nos momentos difíceis.

Aos grandes e amados amigos deixados em Campina Grande-PB, porém, jamais esquecidos: Andréa, Cledson, Karine, Lorena, Tiago, Mitshuia e Raissa.

Aos meus Pais, João e Maria das Neves, pelo grande carinho, exemplos de vida e honestidade, apoio emocional e financeiro, por entenderem mesmo sentindo a ausência. A minha mãe de forma especial pelas palavras e consolo ao perceber minha tristeza ao telefone. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

A meu irmão e melhor amigo Fabrício, pelo apoio e exemplo profissional.

A meu irmão Hamilton e a sua esposa Myrna pelo carinho.

A meus sobrinhos Alexandre e Maria Clara.

A minha avó e tias.

A todos que de forma direta e indireta estiveram juntos para que eu pudesse vencer mais uma etapa da minha vida com êxito.

**Meu muito obrigado!**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS E QUADROS</b> .....	xii
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS</b> .....	xvii
<b>RESUMO</b> .....	xix
<b>ABSTRACT</b> .....	xxi
<b>1. Introdução Geral</b> .....	23
<b>2. Revisão de Literatura</b> .....	26
2.2 Leguminosas .....	26
2.3 <i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth. (sabiá) .....	27
2.3.1 Caracterização da espécie .....	27
2.3.2 Importância e uso do sabiá .....	28
2.4 Rizóbio .....	30
2.5 Fatores que interferem na Fixação Biológica de Nitrogênio .....	31
2.5.1 Fatores abióticos .....	31
2.5.2 Fatores bióticos .....	33
2.5.3 Especificidade entre os simbioses .....	34
2.6 Diversidade de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas .....	35
2.7 Marcadores moleculares .....	37
2.7.1 Marcadores filogenéticos.....	38
2.7.2 Marcadores <i>fingerprint</i> .....	42
2.8 Métodos de análises de filogenia e diversidade .....	43
2.9 Referências .....	45
<b>3. CAPÍTULO 1</b> .....	66
<b>FILOGENIA DE SABIÁ (<i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth.) EM CINCO MUNICÍPIOS DO NORDESTE BRASILEIRO</b>	
<b>RESUMO</b> .....	666

<b>ABSTRACT</b> .....	67
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	68
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	70
Amostragem .....	70
Extração e Amplificação do DNA .....	71
Purificação dos amplicons, sequenciamento de DNA e análise de dados .....	71
Análise de dados .....	72
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	76
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
<b>APÊNDICE I</b> .....	80
<b>4. CAPÍTULO 2</b> .....	85

**DIVERSIDADE E FILOGENIA RIZOBIANA DE ISOLADOS DO SABIÁ (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) DE DIFERENTES REGIÕES DO NORDESTE BRASILEIRO**

<b>RESUMO</b> .....	85
<b>ABSTRACT</b> .....	86
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	87
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	90
Amostragem .....	90
Obtenção de rizóbios nativos .....	91
Isolamento e caracterização cultural dos rizóbios .....	92
Extração de DNA e PCR .....	92
Purificação dos amplicons, sequenciamento de DNA .....	94
<b>ANÁLISES</b> .....	94
Características morfofisiológicas e elementos BOX, ERIC e REP .....	94
<b>16S DNAr</b> .....	95
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	96
Caracterização morfofisiológica dos isolados.....	96

<i>Fingerprint</i> (REP, ERIC e BOX PCR).....	100
Sequenciamento do gene 16S DNAr .....	109
<b>CONCLUSÕES</b> .....	113
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	113
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	114
<b>APÊNDICE II</b> .....	132

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1:** Árvore Bayesiana de consenso de 75 acessos de sabiá, oriundos de cinco municípios nordestinos, gerada pelo programa Mr. Bayes a partir do sequenciamento dos amplicons dos espaçadores *atpB-rbcL*..... 75

### CAPÍTULO 2

**Figura 1:** Dendrograma das características morfofisiológica dos 47 isolados bacterianos oriundos da cultura do sabiá usando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J)..... 99

**Figura 2:** Dendrograma dos perfis dos produtos obtidos na análise de REP-PCR dos 47 isolados bacterianos oriundos da cultura do sabiá em cinco municípios nordestinos usando o UPGMA e coeficiente de Simple Matching (SM) ..... 102

**Figura 3:** Dendrograma dos perfis dos produtos obtidos na análise de ERIC-PCR dos 47 isolados bacterianos oriundos da cultura do sabiá em cinco municípios nordestinos usando o UPGMA e coeficiente de Simple Matching (SM) ..... 104

**Figura 4:** Dendrograma dos perfis dos produtos obtidos na análise de BOX-PCR dos 47 isolados bacterianos oriundos da cultura do sabiá em cinco municípios nordestinos usando o UPGMA e coeficiente de Simple Matching (SM) ..... 106

**Figura 5:** Dendrograma compilado dos 47 isolados bacterianos oriundos da cultura do sabiá em cinco municípios nordestinos usando o UPGMA e coeficiente de Simple Matching (SM) ..... 108

**Figura 6:** Árvore filogenética construída a partir do gene 16S DNAr dos isolados de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.), utilizando o método de Neighbor-Joining, com

distâncias calculadas pelo método de Jukes-Cantor. Os valores de cada rama representam as porcentagens de 1000 réplicas bootstrap. ID significa identidade do isolado em função da homologia encontrada no NCBI e tamanho do fragmento blastado que está entre parêntesis ..... 112

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1:** Caracterização química dos solos de Crato, Gravatá, Itambé, Mossoró e Serra Talhada.....91

**Tabela 2:** Valores relativos as características culturais dos isolados utilizados na construção do dendrograma de similaridade.....95

**Quadro 1:** Resultados da busca por similaridade no GenBank com o programa BLAST de 44 isolados provenientes da inoculação de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth) com amostras de solo coletado em cinco municípios da região Nordeste..... 124

## LISTA DE APÊNDICES

### APÊNDICE I

**Figura 1:** Imagem de satélite mostrando os pontos de coleta. ....81

**Tabela 1:** Características de acúleos dos acessos de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) coletados em cinco cidades de três Estados do Brasil .....82

### APÊNDICE II

**Figura 1:** Imagem de satélite mostrando os pontos de coleta ..... 133

**Tabela 3:** Características morfofisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos do município de Gravata-PE, 42 horas após a repicagem em meio YM com Azul de Bromotimol ..... 134

**Tabela 4:** Características morfofisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos do município de Itambé-PE, 42 horas após a repicagem em meio YM com Azul de Bromotimol ..... 135

**Tabela 5:** Características morfofisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos do município de Mossoró-RN, 42 horas após a repicagem em meio YM com Azul de Bromotimol ..... 136

**Tabela 6:** Características morfofisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos do município de Serra Talhada-PE, 42 horas após a repicagem em meio YM com Azul de Bromotimol..... 137

**Tabela 7:** Características morfofisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos do município de Crato-CE, 42 horas após a repicagem em meio YM com Azul de Bromotimol ..... 138

**Figura 2:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos REP-1 e REP-2 dos isolados do Crato e Itambé. Poço M – Marcador 1Kb plus ..... 139

**Figura 3:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos REP-1 e REP-2 dos isolados de Mossoró e Serra Talhada. Poço M – Marcador 1Kb plus. .... 139

**Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos REP-1 e REP-2 dos isolados de Gravatá. Poço M – Marcador 1Kb plus..... 140

**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos ERIC-1 e ERIC-2 dos isolados do Crato e Itambé. Poço M – Marcador 1Kb plus ..... 140

**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos ERIC-1 e ERIC-2 dos isolados de Mossoró e Serra Talhada. Poço M – Marcador 1Kb plus ..... 141

**Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos ERIC-1 e ERIC-2 dos isolados de Gravatá. Poço M – Marcador 1Kb plus ..... 141

**Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo BOX-AR1 dos isolados do Crato e Itambé. Poço M – Marcador 1Kb plus ..... 142

**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo BOX-AR1 dos isolados de Mossoró e Serra Talhada. Poço M – Marcador 1Kb plus. .... 142

**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo BOX-AR1 dos isolados de Gravatá. Poço M – Marcador 1Kb plus ..... 143

**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação do 16S rDNA utilizando os oligonucleotídeos fD1 e rD1 dos isolados de Serra Talhada, Mossoró e Gravatá. Poço M – Marcador 1Kb plus. .... 143

**Figura 12:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação do 16S rDNA utilizando os oligonucleotídeos fD1 e rD1 dos isolados de Gravatá, Crato e Itambé. Poço M – Marcador 1Kb plus ..... 144

**Figura 13:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação do 16S rDNA utilizando os oligonucleotídeo fD1 e rD1 dos isolados de Mossoró, Crato, Itambé, Serra Talhada, e Gravatá. Poço M – Marcador 1Kb plus..... 144

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

AFLP – Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição

ARDRA – Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado

*atpB* - ATP- $\beta$ -sintetase

BOX - Sequências Repetitivas Interspaçados de DNA

DGGE - Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DNAcp - DNA do cloroplasto

DNAmt - DNA mitocondrial

dNTP – Dinucleotídeo

ERIC - Consensos Intergênicos de Bactérias Entéricas

FBN - Fixação Biológica de Nitrogênio

IGS - Espaçador Intergênico

ISSR - Sequência Simples Repetida Interna

ITS - Espaçador Intergênico

Kb - Tamanho do fragmento de DNA por 1000 pares de base

NCBI - Nacional Center for Biotechnology Information

pb - Pares de bases, correspondendo ao comprimento do DNA

PCR - Reação em Cadeia da DNA Polimerase

PCR-SSCP - Polimorfismo de Conformação de Fita Simples

RAPD – Polimorfismo do DNA Amplificado Randomicamente

*rbcl* - Carboxilase do difosfato 1,5 da ribose

DNAr- DNA ribossomal

REP - Elementos Repetitivos Extragênicos Palindrômicos

RFLP - Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição

rpm - Rotações por minuto

SSR - Sequência Simples Repetida

TGGE - Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura

tRNA - RNA Transportador

TBE - Tris base, ácido bórico e EDTA

$\mu$ l - Microlitro

## FILOGENIA E DIVERSIDADE MOLECULAR DE SABIÁ (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) E DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

### RESUMO

A família Leguminosae é a terceira maior família de angiospermas com aproximadamente 700 gêneros, dos quais a subfamília Mimosoideae compreende 78 gêneros, destacando-se *Acacia*, *Mimosa* e *Inga*. A espécie *Mimosa caesalpinifolia* Benth., conhecida como sabiá ou sansão do campo, é considerada uma das espécies arbóreas nativas mais importantes do semiárido brasileiro por apresentar múltiplo uso e grande potencial para recuperação de áreas degradadas por fixar nitrogênio em simbiose com bactérias diazotróficas. A taxonomia das bactérias diazotróficas vem mudando pela utilização em conjunto de aspectos fenotípicos e fisiológicos e de ferramentas moleculares. Objetivou-se avaliar a filogenia de plantas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e a diversidade e filogenia de suas bactérias simbióticas em cinco municípios nordestinos. O trabalho foi conduzido de abril de 2010 a março de 2011, na Universidade Federal Rural de Pernambuco e no Laboratório de Genoma do Instituto Agrônomo de Pernambuco. Para os estudos filogenéticos do sabiá, folhas de plantas nativas ou naturalizadas foram coletadas em Crato, Gravatá, Itambé, Mossoró e Serra Talhada, e tiveram o DNA genômico extraído utilizando-se kit comercial. Foram realizadas amplificações da região espaçadora intergênica *atpB-rcbL* do genoma cloroplastidial que foram usadas para construir a Inferência Bayesiana da filogenia entre os acessos. Amostras de solo foram coletadas à mesma época das coletas das folhas e plantas de sabiá foram usadas como plantas-isca para obtenção de nódulos de rizóbios utilizando-se Vasos de Leonard, em casa de vegetação. As bactérias presentes nos nódulos foram isoladas e purificadas em meio YMA com Vermelho Congo e a caracterização morfofisiológica dos isolados foi realizada em meio YMA com Azul de Bromotimol. Posteriormente os isolados foram crescidos em meio TY líquido para extração do DNA com kit comercial. Foram realizadas amplificações com os oligonucleotídeos BOX, ERIC e REP e amplificação e sequenciamento do 16S DNA. As sequências do espaço intergênico cloroplastidial *atpB-rcbL* não

corresponderam com qualquer outra sequência depositada no NCBI. Os acessos CRATO 4 e SERRA TALHADA 20 formaram um grupo externo indicando que podem ser as mais próximas geneticamente. A alta taxa de segregação da espécie influenciou na diversidade dentro e entre as diferentes áreas estudadas e a origem geográfica não determina a variação dos observados nos acessos das plantas estudadas. Os *fingerprints* genômico dos 47 isolados utilizando os elementos BOX, ERIC e REP apresentaram padrões de ampliações distintos, porém a compilação dos resultados criou o dendrograma com maior número de grupos. As sequências 16S DNAr foram comparadas no GenBank através do programa BLAST, e os isolados apresentam identidade variando entre 68 e 99% com estirpes do gênero *Burkholderia*. A árvore filogenética construída com as sequências da região 16S DNAr dos isolados, juntamente com as sequências da região 16S DNAr de estirpes tipo recomendadas para inoculação de leguminosas, indica que os isolados obtidos são geneticamente distintos das estirpes recomendadas. Os isolados PE-MO01, PE-MO02 e PE-MO04 destacaram-se por serem os mais distintos dentro do grupo de isolados. A escassez de dados de filogenia molecular da espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. revela a necessidade da utilização de outros marcadores taxonômicos para conhecimento da filogenia e da diversidade desta espécie e as sequências do gene 16S DNAr confirmam a preferência de simbiose entre espécies de leguminosas do gênero *Mimosa* com bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*.

**Palavras-Chave:** Leguminosa, fixação biológica do nitrogênio, espaçador cloroplastidial, gene *rbcl*, gene *atpB*, rep-PCR, 16S DNAr, diversidade, filogenia.

## PHYLOGENY AND MOLECULAR DIVERSITY OF *Mimosa caesalpinifolia* (Benth.) AND OF DIAZOTROPHIC BACTERIA

### ABSTRACT

Leguminosae is the third largest angiosperm family, with around 700 genera, of which the Mimosoideae subfamily comprehends 78 genera, with emphasis to *Acacia*, *Mimosa* and *Inga*. *Mimosa caesalpinifolia* Benth., known as “sabiá” or “sansão do campo” is considered to be one of the most important native tree species of the Brazilian semiarid due to its multiuse capability, and high potential for degraded area recovery, since it fixes nitrogen in symbiosis with diazotrophic bacteria. Diazotrophic bacteria taxonomy has been changing due to joint use of phenotypic, physiologic and molecular tools. This work aimed to evaluate “sabiá” and its symbiotic bacteria diversity in five Northeastern municipalities. It was conducted from April, 2010 to March, 2011, at Pernambuco Federal Agricultural University and the Genome Laboratory of the Pernambuco Agronomic Institute. For “sabiá” phylogenetic studies, leaves from native or naturalized plants were collected at Crato, Gravatá, Itambé, Mossoró and Serra Talhada, with their genomic DNA extracted with a commercial kit. The intergenomic *atpB-rcbL* region of chloroplastic DNA was amplified and used to construct Bayesian Inference phylogenesis of the accesses. Soil samples were collected at the same time of plant collection, and “sabiá” plants were used as bait for rhizobial nodules using Leonard jars, at a greenhouse. Nodule bacteria were isolated and purified in YMA media with Congo Red, and morpho-physiologically characterized on YMA media with Bromothymol Blue. The isolates were later grown in liquid TY media for DNA extraction with a commercial kit. Amplifications were conducted with REP, ERIC and BOX primers, and 16S rDNA was amplified and sequenced. Intergenic *atpB-rbcL* chloroplast DNA sequences did not match any NCBI entry. CRATO 4 and SERRA TALHADA 20 accesses formed an external group indicated they may be genetically closer to a *Mimosa* ancestor. The high segregation of the species affected diversity within and among the different areas, and plant biogeography was not confirmed. Genomic fingerprinting of the 47 isolates had different patterns for REP, ERIC and BOX elements, but compilation of the results created the dendrogram with the most groups. The 16S rDNA sequences were

blasted in GenBank, and the isolates had 68 to 99% similarity with *Burkholderia* strains. The phylogenetic tree constructed with the 16S rDNA, combined with sequences from strains recommended for legume inoculation, show these isolates to be diverse from the currently recommended. Isolates PE-MO01, PE-MO02 and PE-MO04 were the most different among the isolates. The lack of molecular phylogeny data for “sabiá” shows the need of using other taxonomic markers to evaluate this species diversity, and the 16S rDNA sequences confirm the *Mimosa* symbiosis preference for *Burkholderia* strains.

**Keywords:** legume, biological nitrogen fixation, chloroplast spacer, *rbcL* gene, *atpB* gene, rep-PCR, 16S rDNA, diversity, phylogeny

## 1. Introdução Geral

A família Leguminosae possui cerca de 20.000 espécies e apresenta grande potencial de utilizações econômicas e ambientais, como exploração de madeira, celulose, forragem, adubação verde, lenha e carvão, como também, na recuperação de áreas degradadas por meio do estabelecimento de determinadas espécies em solos de baixa fertilidade natural (FLORENTINO e MOREIRA, 2009).

O sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) é uma espécie leguminosa nativa da região Nordeste do Brasil caracterizando-se pelo rápido crescimento, alta capacidade de regeneração e resistência à seca; além de ser considerada uma espécie de uso múltiplo, destacando o seu emprego como fonte de alimento para o gado, especialmente durante a época seca no semiárido, e na obtenção de madeira resistente apropriada para mourões e estacas; demonstra também grande potencial para recuperação de áreas degradadas devido a sua capacidade simbiótica com bactérias diazotróficas (PASSOS, TAVARES e ALVES, 2007; FERREIRA et al., 2007; BABIC et al., 2008).

As bactérias diazotróficas que formam nódulos e fixam nitrogênio em leguminosas são tradicionalmente chamadas de rizóbio. Embora as raízes históricas do nome já não sejam mais aceitáveis, a tradição faz com que ainda seja um termo aceito pela maioria da comunidade científica. Este grupo de organismos é o principal grupo de diazotróficos, em particular do ponto de vista de importância agrônoma pela Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). A FBN é um processo que ocorre no interior de estruturas específicas, denominadas de nódulos, nos quais as bactérias convertem o nitrogênio atmosférico em amônia que é incorporada em diversas formas de N orgânico para utilização da planta (ARAÚJO e CARVALHO, 2006).

A nodulação e a FBN são afetadas por fatores bióticos e abióticos (GUALTER et al., 2008; RUFINI et al., 2011). Dentre os fatores bióticos, as características genótípicas do macro e microsimbionte são importantes e influenciam a troca de sinais moleculares, refletindo nas diferentes respostas em relação ao espectro de hospedeiros, especificidade e eficiência simbiótica. Neste sentido, a otimização da FBN está relacionada à seleção conjunta do

macro e microssimbionte, através do conhecimento da variabilidade genética dos parceiros (XAVIER et al., 2006). Para estudos envolvendo diversidade genética dos parceiros simbiotes têm sido empregado técnicas e ferramentas biotecnológicas como, por exemplo, o uso de marcadores moleculares (XAVIER et al., 2005, 2006).

A utilização de classes de marcadores moleculares e de suas variantes tem permitido uma grande evolução na análise de perfis de DNA, na biologia de 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).

Para estudos de filogenia em plantas destaca-se o emprego do genoma de cloroplasto (DNAcp), devido a características como estabilidade estrutural e taxa de mutação. A maioria das análises filogenéticas relacionadas a plantas usando genoma de cloroplasto envolve espaçadores intergênicos e o gene *rbcL*, codificador da subunidade maior da Rubisco, por apresentar boa resolução ao nível de família, para angiospermas (APG II, 2003; SALAMIN, HODKINSON e SAVOLAINEN, 2005). Marcadores moleculares também são ferramentas utilizadas para estudos taxômicos e de diversidade em micro-organismos, destacando-se para estes fins a amplificação e o sequenciamento do gene 16S DNAr que tem demonstrado ser confiável para a separação de gêneros e espécies de bactérias (GEVERS et al., 2005; THOMAS et al., 2008).

O *fingerprint* (impressão digital) genômico utilizando os oligonucleotídeos específicos BOX (*Box Element*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) é outra técnica evidenciada em estudos de diversidade genética de micro-organismos em especial de bactérias diazotróficas (TORRES et al., 2008). No entanto, em pesquisas de diversidade de bactérias diazotróficas é aplicada normalmente a abordagem polifásica, combinando as informações genéticas geradas pela utilização dos elementos BOX, REP e ERIC e das sequências de genes como o 16S DNAr, com aspectos fenotípicos e fisiológicos para uma melhor discriminação genética (HUNGRIA et al., 2006; PINTO, HUNGRIA e MERCANTE, 2007; CHAGAS JUNIOR, OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2010).

Assim, este trabalho teve como objetivos principais: avaliar filogeneticamente plantas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) de áreas

nativas ou naturalizadas em três estados brasileiros usando a região espaçadora não codificante do genoma cloroplastidial e estudar a filogenia e a diversidade de bactérias diazotróficas originárias das mesmas localidades utilizando abordagem polifásica.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.2. Leguminosas

A família Leguminosae compreende cerca de 700 gêneros (LEWIS e SCHRIRE, 2003) e é constituída pelas subfamílias; Mimosoideae, Papilionoideae e Caesalpinioideae (LEWIS e SCHRIRE, 2003; AGP II, 2003; SOLTIS et al., 2005). Destas, a Mimosoideae possui 78 gêneros e aproximadamente 3.270 espécies, em geral arbóreas, com quase dois terços das espécies conhecidas pertencendo aos gêneros *Acacia*, *Mimosa* e *Inga* (DOYLE e LUCKOW, 2003).

Grande parte das leguminosas arbóreas é capaz de produzir elevada quantidade de biomassa com significativo aporte de serapilheira ao solo, constituindo uma via importante do ciclo biogeoquímico, especialmente em solos altamente intemperizados. A serapilheira devolve os nutrientes ao solo, tornando-se fundamental para a manutenção da fertilidade e para a auto-sustentabilidade dos ecossistemas florestais (BRUN, 2004; SILVEIRA et al., 2007; VOGEL, SCHUMACHER e TRUBY, 2007).

As espécies arbóreas apresentam características atrativas para serem usadas em sistemas silvipastoris, devido à fixação simbiótica de nitrogênio e deposição de matéria orgânica com teores elevados de nitrogênio ao solo. Incorporação de espécies arbóreas fixadoras de nitrogênio pode contribuir com a diversidade, estabilidade e persistência das pastagens e assegurar a qualidade e a quantidade de alimentos para os animais.

O nordeste brasileiro possui grande diversidade de espécies de leguminosas forrageiras, porém, a maioria ainda não é domesticada (LIMA et. al., 2008). Entre as espécies, merece destaque o sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.), em especial por ser uma planta nativa e considerada endêmica da caatinga (MAIA, 2004).

## **2.3 *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (sabiá)**

### **2.3.1 Caracterização da espécie**

Ocorrendo naturalmente nos estados do Rio Grande do Norte, Piauí e Ceará (RIBASKI et al., 2003), o sabiá é uma espécie pioneira, com alta capacidade de regeneração e resistência à seca (BALBINO et al., 2010), além de ser encontrada em povoamentos artificiais do Maranhão à Bahia (RIZZINI, 1995) bem como em regiões úmidas dos Estados da Paraíba (Brejo Paraibano), 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, principalmente em solos de textura arenosa (CARVALHO, 2007). Ocorre espontaneamente em áreas de caatinga semi-úmidas com precipitações variando de 600 a 1.000 mm; também sendo encontrada em áreas mais secas, onde as temperaturas médias estão entre 20° C e 28° C, e o déficit hídrico entre 200 e 1.000 mm. Nesse caso, apresenta forma mais arbustiva, com tronco polifurcado (RIBASKI et al., 2003).

Geralmente apresenta à forma de arbusto a árvore perenifólia, com as árvores maiores na idade adulta atingindo dimensões próximas a 10 m de altura por 30 cm de diâmetro a 1,30 m do solo. Tem aspecto entouceirado e apresenta boa capacidade de rebrota (LORENZI, 2000). O tronco geralmente é dotado de acúleos em maior ou menor grau e o caule espinhoso na idade jovem vai perdendo os espinhos à medida que a casca engrossa (CARVALHO, 2007).

A planta possui folhas bipinadas, geralmente com seis pinas opostas, cada pina com 4 a 8 folíolos ovais, glabros, com 3 a 8 cm de comprimento. As flores são brancas, monóclinas, pequenas e axilares, reunidas em espigas cilíndricas de 5 a 10 cm de comprimento (RIZZINI e MORHS, 1976). Na região Nordeste do Brasil, a floração geralmente ocorre de março a junho com as plantas normalmente florescendo antes de completar um ano de idade (MENDES, 1989; BARBOSA, SILVA e BARROSO, 2008). O fruto é um

craspédio plano com 7 a 10 cm x 10 a 13 mm x 1,0 a 1,2 mm (comprimento x largura x espessura) dividido em 5 a 9 artículos quadrangulares, presos por dois filamentos fibrosos laterais (CARVALHO, 2007).

As sementes são lisas, duras e pequenas, medindo 5-8 mm de diâmetro (TIGRE, 1976; RIZZINI, 1995; LORENZI, 2000), com o peso médio de 100 sementes no segmento do fruto sendo de 7,2 g e quando nuas 3,8 g (MARTINS, 1992). Altos níveis de dormência tegumentar são observados o que exige tratamentos específicos, tais como a imersão das sementes em água quente (OLIVEIRA, DAVIDE e CARVALHO, 2003) e imersão, sem envoltório, em ácido sulfúrico concentrado (PASSOS, TAVARES e ALVES, 2007).

As raízes são axiais, com raízes secundárias longas, finas, bem ramificadas e coloração castanho claro (FELICIANO, 1989). O sistema radicular do sabiá é radial e concentrado nos primeiros vinte centímetros de profundidade do solo. A planta tem raízes espessas, longas e numerosas, que podem atingir os seis metros de comprimento, o que favorece a absorção de águas das chuvas e a produção de folhagem antes das outras espécies da Caatinga, e apresenta associação preferencialmente com bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* e com fungos micorrízicos (QUEIROZ, 1985; MENDES, 2001; CHEN et al., 2008). A associação com bactérias diazotróficas permite ao sabiá figurar entre as principais espécies utilizadas em recuperação de áreas degradadas e em projetos de reflorestamento (MENDES, 2001; BARBOSA et al., 2008).

### **2.3.2 Importância e uso do sabiá**

A espécie é considerada como uma das principais fontes de estacas para cercas no Nordeste, em especial no Estado do Ceará. A madeira se destaca por ser dura, pesada, compacta, e de alta resistência (> 20 anos) ao ataque de cupins, insetos e fungos, mesmo em ambiente úmido e quente do solo (LORENZI, 2000; MENDES, 2001; MAIA, 2004). Segundo Gonçalves, Fernandes e Andrade (1999), a madeira não é indicada para produção de celulose em função do seu baixo teor de alfa-celulose (28,40%), alto teor de lignina (32,40%) e elevada densidade ponderada (0,80 g cm<sup>-3</sup>). No entanto, o

alto teor de lignina e a alta densidade conferem à madeira o potencial para produção de carvão.

A folhagem do sabiá é nutritiva (até 17% de proteína bruta) e palatável (MENDES, 2001; MAIA, 2004). Alguns autores recomendam o uso da forragem do sabiá, na forma de feno, como alimento alternativo para ruminantes no período seco (PEREIRA, 1998; VIEIRA, 2000; FERREIRA et al., 2007).

O sabiá é largamente utilizado para a construção de cercas vivas, destaca-se o seu emprego na proteção e delimitação de pomares na citricultura, em especial, as que apresentam grande quantidade de acúleos (LARANJEIRA, 1997; GARCIA, DUARTE e FRASSETO, 2002).

O sabiazeiro é amplamente utilizado para tutorar plantações de videiras - *Vitis vinifera* nas áreas irrigadas do Vale do Rio São Francisco (RIBASKI e LIMA, 1997) e pelo aspecto entouceirado, crescimento rápido e formato de copa, pode ser empregado no paisagismo em geral (LORENZI, 2000; MAIA, 2004).

Na medicina caseira, a casca do sabiá é empregada como cicatrizante na forma de unguento, e a parte interna da casca é usada para os males estomacais e das vias respiratórias superiores na forma de chá (ANDRADE, 1989; LIMA, 1996; MENDES, 2001). As flores ganham especial atenção por serem melíferas, produzindo mel de alta qualidade (MAIA, 2004).

O sabiá ganha destaque como espécie promissora para o reflorestamento por ser pioneiro e apresentar rápido crescimento (LORENZI, 2000; FERREIRA et al., 2007). Em função do rápido crescimento, as culturas leguminosas; além das forrageiras e das gramíneas, têm sido utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas por proporcionar a melhoria do solo através da deposição de matéria orgânica, reciclagem de nutrientes e pela capacidade de gerar aporte de N e C (FAVARETTO et al., 2000; SILVA et al.; 2009).

O sabiazeiro possui a capacidade de associar-se simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, de diversos gêneros e espécies diferentes. A simbiose ocorre com vários membros da família Rhizobiaceae e atualmente membros de  $\beta$ -Proteobactérias como a *Burkholderia sabiae* que foi isolada a partir de nódulos dessa planta; evidencia que o sabiá associa-se

preferencialmente com bactérias deste gênero, quando em seu ambiente natural (ELLIOTT, 2007; CHEN et al., 2007, 2008).

## 2.4 Rizóbio

Rizóbios são bactérias Gram-negativas encontradas normalmente no solo, estritamente aeróbias, quimiorganotróficas, em forma de bastonetes, não formadoras de esporo e com tamanho variando entre 0,5 e 0,9 µm por 1,2 a 3,0 µm. A mobilidade dos rizóbios é dada por um flagelo polar único ou de dois a seis flagelos peritríqueos (SOMASEGARAN e HOBEN, 1994).

Inicialmente os rizóbios foram agrupados em um único gênero *Rhizobium* identificado por Frank em 1889; posteriormente; Jordan em 1982 propôs a separação taxonômica baseada na curva de crescimento para diferenciar os rizóbios de crescimento rápido dos com crescimento lento, respectivamente; *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984). Com o aprofundamento dos estudos novos gêneros foram propostos, e atualmente além de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, os rizóbios estão distribuídos nos gêneros *Mesorhizobium* (JORDAN, 1984; JARVIS et al., 1997), *Sinorhizobium* (*Ensifer*) (CHEN, YAN e LI, 1988; DE LAJUDIE et al., 1994), *Azorhizobium* (DREYFUS, GARCIA e GILLIS, 1988; PERRET et al., 2000; ANDRADE, MURPHY e GILLER, 2002; WILLEMS et al., 2003a) e *Allorhizobium* (SESSITSCH et al., 2002). Anteriormente usado para designar bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, o termo rizóbio vem sendo usado para todas as bactérias capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio em associação com leguminosas (WILLEMS, 2006), incluindo-se, portanto nesta denominação, bactérias dos gêneros *Methylobacterium* (SY et al., 2001), *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001), *Ralstonia* (CHEN et al., 2001), *Devosia* (RIVAS et al., 2003), *Phyllobacterium* (VALVERDE et al., 2005), *Ochrobactrum* (TRUJILLO et al., 2005), *Cupriavidus* (BARRETT e PARKER, 2006) e *Pseudomonas* (SHIRAISHI, MATSUSHITA e HOUGETSU, 2010).

Tradicionalmente, a classificação fenotípica compreende dados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos que permitem a distinção de diferentes *taxa*. Os gêneros de rizóbios podem ser diferenciados em meio de cultura

(MEDEIROS et al., 2009; LIMA et al., 2009), tendo como parâmetros o tempo de crescimento em meio de cultura, reação ácida ou básica em meio, diâmetro de colônia, produção de polissacarídeos extracelulares (muco), tamanho e coloração da colônia (MELLONI et al., 2006).

A partir da década de 80, a caracterização dos gêneros de rizóbio passou a considerar as ferramentas da genética molecular como a hibridização DNA-DNA e o sequenciamento do gene ribossomal 16S DNAr, que em conjunto com técnicas moleculares mais modernas como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) levaram à modificação, reorganização taxonômica e a descrição de novos gêneros (WILLEMS et al, 2003b). A sequência completa do gene 16S DNAr, por exemplo, consegue definir a posição das bactérias em nível de gênero e, em alguns casos, em nível de espécie (GARRITY e HOLL, 2001) por ser considerado conservado entre as bactérias, mas ao mesmo tempo, suficientemente variável e com quantidades de informações capazes de revelar relações filogenéticas entre as espécies (WEISBURG et al., 1991; CHUEIRE et al., 2000). Com o auxílio de técnicas moleculares aproximadamente 30 espécies foram caracterizadas como *Rhizobium*; entre as mais recentes estão *Rhizobium giardinii* (ZHAO et al., 2010) e *B. yuanmingense*, (CHANG et al., 2011).

## **2.5 Fatores que interferem na Fixação Biológica de Nitrogênio**

A fixação biológica de nitrogênio depende de fatores ambientais que afetam a sobrevivência da planta e da bactéria e de fatores intrínsecos do processo de simbiose bactéria-leguminosa.

### **2.5.1 Fatores abióticos**

Fatores como acidez do solo, toxidez de alumínio, salinidade e baixa fertilidade, disponibilidade de N mineral, deficiência de nutrientes como fósforo e molibdênio, temperatura e estresse hídrico são determinantes na nodulação e fixação de N<sub>2</sub> por leguminosas (MACCIÓ, FABRA e CASTRO, 2002; QUAGGIO

et al., 2004; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; ARAÚJO, 2007; CHAGAS JUNIOR, OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2009).

Solos ácidos podem determinar problemas para a planta, a bactéria e para simbiose (HARA e OLIVEIRA, 2005); com o microssimbionte sendo geralmente a parte mais sensível ao efeito do pH. Há variações quanto à tolerância à acidez, porém o pH ótimo geralmente fica entre 6,0 e 7,0 (JORDAN, 1984) e poucas crescem bem em pH menor que 5,0 (RODRIGUES, LARANJO e OLIVEIRA, 2006; ALI et al., 2009). O alumínio, por sua vez, reduz a atividade das células bacterianas próximo a ocorrer à divisão celular, aumentando o tempo de geração de células e provocando a queda na população dos rizóbios; conseqüentemente observa-se uma baixa frequência de nódulos. Para as plantas, altos teores de alumínio trocável prejudicam o desenvolvimento e a infecção radicular pelos rizóbios (WATKIN, O'HARA e GLENN, 2003; JESUS et al., 2005).

Várias causas podem interferir nos passos iniciais da infecção bacteriana no pelo radicular como salinidade (BOUHMOUCH et al., 2005) e nitrogênio mineral que pode interferir negativamente sobre diversos aspectos da simbiose leguminosa-rizóbio (STREETER, 1988). Quanto à nodulação, o fósforo apresenta um papel importante no metabolismo energético das células e sua deficiência afeta negativamente o status energético dos mesmos (CHAUDHARY e FUJITA, 1998; STRALIOTTO, 2002), podendo também reduzir a biomassa do hospedeiro e deste modo comprometer o funcionamento dos nódulos (FREIRE FILHO, LIMA e RIBEIRO, 2005).

Dentro do processo de fixação biológica de nitrogênio, o molibdênio (Mo) é constituinte da enzima nitrogenase, que é a responsável pela transformação do N atmosférico em amônia. Esse elemento também participa do complexo enzimático da nitrato redutase, responsável pela assimilação do nitrato pelas plantas, atuando como doador de elétrons (TAÍZ e ZEIGER, 2004). Meschede et al. (2004), relatam que o molibdênio na forma de molibdato (MoO) tende a reduzir a sobrevivência dos rizóbios.

Dos fatores ambientais, as altas temperaturas e o estresse hídrico são considerados os maiores responsáveis pela ausência de nodulação por afetarem todos os estágios da simbiose (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Segundo Hungria e Vargas (2000) e Rumjanek et al. (2005), temperaturas

elevadas podem afetar a síntese da leg-hemoglobina, desnaturar a nitrogenase, acelerar a senescência dos nódulos e reduzir a atividade das enzimas que assimilam a amônia.

### **2.5.2 Fatores bióticos**

Entre os fatores bióticos destacam-se a presença de antagonistas como fungos, bactérias e bacteriófagos, protozoários predadores de nódulos, alta densidade populacional, competitividade de rizóbios nativos e características genótípicas dos simbiosomas (FRANCO e NEVES, 1992; THIES, WOONER e SINGLETON, 1995; TEIXEIRA, COUTINHO e FRANCO, 1996, KAHINDI et al., 1997; XAVIER et al., 2006).

Os fatores bióticos são especialmente observados na utilização da técnica de inoculação com estirpes rizobianas buscando principalmente a redução nas aplicações de fertilizantes nitrogenados. O principal fator limitante é a competitividade de rizóbios nativos, que constitui uma barreira no estabelecimento da inoculação por concorrerem pela ocupação dos sítios de infecção nas raízes das plantas hospedeiras (FRANCO E NEVES, 1992; SANTOS et al., 2007; MEDEIROS et al.; 2009). Segundo Singleton e Tavares (1986), valores superiores a 20 rizóbios nativos por grama de solo, diminuem o estabelecimento de rizóbios inoculados.

De modo geral, quanto maior a população nativa de rizóbio, mais difícil é a introdução com sucesso da estirpe inoculante (XAVIER et al., 2006). Nesse sentido, a observação de características relativas à especificidade é importante na seleção de estirpes para a obtenção de um inoculante que apresente maior afinidade com a planta hospedeira e que seja capaz de colonizar as raízes mais eficientemente do que as estirpes nativas (RUMJANEK et al., 2005), uma vez que o estabelecimento e efetividade da simbiose dependem das características genéticas da planta e da bactéria (KAHINDI et al., 1997; COSTA et al.; 2011), como comprovado nos estudos de Seetin e Barnes (1977) e de Gibson (1962) com cultivares de alfafa e Franco et al. (2002) e Xavier et al. (2006) com cultivares de feijão-caupi.

### 2.5.3 Especificidade entre os simbioss

Dentre os fatores bióticos, as características genóticas do macro e microsimbioss são importantes e influenciam a troca de sinais moleculares, refletindo nas diferentes respostas em relação ao espectro de hospedeiros, especificidade e eficiência simbiótica (HARTWIG, 1998; FRANCO et al., 2002; XAVIER et al., 2006).

Estudos demonstraram que o genótipo da planta pode influenciar o tamanho e a composição da comunidade microbiana através dos exsudatos liberados pelas raízes, que exerce um papel chave no estímulo seletivo dos micro-organismos (BERGAMASCHI et al., 2007). Devido à diversidade de compostos e metabólitos secundários que compõem os exsudatos radiculares, as plantas podem enviar um número bem diverso de sinais que são altamente específicos e possibilitam que os rizóbios simbioss identifiquem seus hospedeiros (BAIS et al., 2004).

De modo geral é observada uma especificidade na formação dos nódulos pelos rizóbios. Algumas bactérias apresentam elevada especificidade ao hospedeiro, tais como *Mesorhizobium huakuii*, que só nodula com a leguminosa *Astragalus sinicus* (CHENG et al., 2006) e *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* que estabelecem simbiose com a soja (*Glycine max*) brasileira (PAVANELLI e ARAÚJO, 2009). A especificidade hospedeira também foi relatada entre rizóbios da espécie *Azorhizobium doebereineriae* com a leguminosa *Sesbania virgata* (syn. *S. marginata*) por Moreira (2006) e Florentino e Moreira (2009). Entretanto, existem rizóbios que apresentam uma baixa especificidade pela leguminosa hospedeira, como observado por Fernandes, Fernandes e Hungria (2003) que relatam rizóbios capazes de nodular e fixar eficientemente o nitrogênio atmosférico em guandu (*Cajanus cajan*), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Zilli et al. (2006) e Zhang et al. (2007) também relataram uma baixa especificidade de estirpes de rizóbios com feijão-caupi.

A existência de bactérias diazotróficas que apresentam baixa especificidade hospedeira também foi observada nos estudos de Granada (2010) com *Desmodium* e Fontoura (2008), com *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus*. Baixa especificidade também foi observada por Simon e Proença

(2000); Bontemps et al. (2010) e Reis Junior et al. (2010), que observaram linhagens de mais de um complexo do gênero *Burkholderia* na mesma espécie de *Mimosa*.

Estudos demonstram que a relação de especificidade/promiscuidade entre hospedeiros e rizóbios pode estar relacionada à evolução dos pares simbiotes. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), por exemplo, é capaz de se associar com as estirpes *Rhizobium tropici* (oriundo da região setentrional da América Central) e *R.etli* (oriundo das regiões andinas na América do Sul), que apresentam preferência em formar nódulos com genótipos de feijoeiro oriundos da mesma região, sugerindo um estreitamento da especificidade por terem sofrido as mesmas pressões de seleção local (AGUILAR, RIVA e PELTZER, 2004). O estabelecimento da associação entre a sabiá, com *Burkholderia sabiae*, bactérias oriundas da mesma região que esta espécie de *Mimosa*, também sugere a ocorrência de um maior estreitamento na capacidade de estabelecer a simbiose entre estes pares (CHEN et al., 2008).

Estudos relacionados à diversidade de rizóbios podem levar ao entendimento da relação referente à especificidade e promiscuidade entre bactérias e hospedeiros e permitir a maximização do processo de FBN pela seleção de pares simbiotes (XAVIER et al., 2006; BORGES et al., 2007).

## **2.6 Diversidade de bactérias formadoras de nódulos em leguminosas**

O primeiro isolamento de bactérias oriundas de nódulos de leguminosas foi realizado por Beijerinck em 1888 que classificou estas bactérias como *Bacillus radicola*, nome alterado em 1887-1890 para *Rhizobium leguminosarum* por Frank (MOREIRA, 2008).

Até o início deste século os rizóbios eram classificados nos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium* que pertencem a quatro famílias da subordem  $\alpha$ -proteobactéria e eram considerados como únicas bactérias com capacidade de nodular leguminosas (WILLEMS, 2006). No entanto dentro do filo  $\alpha$ -Proteobacteria foram descritos os gêneros *Blastobacter* (*B. denitrificans*) isolado a partir de nódulos de *Aeschynomene indica* (VAN BERKUN e EARDLY, 2002);

*Methylobacterium* (*M. nodulans*) de *Crotalaria* spp. (JOURAND et al., 2004); *Devosia* (*D. neptunia*) de *Neptunia natans* (RIVAS et al., 2002); *Ochrobactrum* (*O. lupini*) de *Lupinus onoratus* (TRUJILLO et al., 2005) e espécie do gênero *Shinella* (*S. kummerowiae*) isolado a partir de *Kummerowia stipulaceae* (LIN et al., 2008) apresentando capacidade de nodular leguminosas.

A principal revolução da classificação taxonômica de rizóbio ocorreu a partir de 2001 quando boa parte das bactérias classificadas como rizóbio foram reclassificadas dentro da subordem  $\beta$ -proteobactéria, gênero *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001). Posteriormente foi observada a presença de  $\beta$ -proteobactéria dos gêneros *Ralstonia* (*R. taiwanensis*) em nódulos de *Mimosa* spp. por Chen et al. (2001) e as espécies do gênero *Burkholderia*; *B. tuberum*, *B. phymatum*, *B. caribensis* e *B. cepacia* foram isoladas de cinco leguminosas tropicais por Vandamme et al. (2002). Bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Escherichia* também foram observadas em nódulos de *Hedysarum* spp. (BENHIZIA et al., 2004), no entanto, foi detectada posteriormente a ineficiência da nodulação destas bactérias (MURESU et al., 2008).

A fixação de nitrogênio aparenta ser comum em *Burkholderia*, uma vez que várias espécies desse gênero têm sido encontradas em associação com diversas plantas, a exemplo do arroz e cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2003). As bactérias do gênero *Burkholderia* vêm merecendo destaque pela especial capacidade de nodular espécies de leguminosas do gênero *Mimosa* como destacado nos trabalhos de Barrett e Parker (2005, 2006) com *M. casta*, *M. Pellita*, *M. pigra* e *M. pudica*; Chen et al. (2005) em estudos com várias espécies de *Mimosa*; Chen et al. (2006) e Elliot et al. (2009) com *Mimosa* ssp.; Chen et al. (2007) com *M. bimucronata* e *M. scabrella* e Chen et al. (2008) com isolados de *M. caesalpinifolia*.

O número de espécies de rizóbio descritas tem aumentado pelos inúmeros trabalhos de taxonomia de bactérias isoladas da raiz de leguminosas, especialmente as que apresentam importância agrícola como as produtoras de grãos e com espécies nativas de regiões tropicais. Estas descobertas indicam que a diversidade de procariotos capazes de estabelecer simbiose com leguminosas pode ser muito mais ampla do que o previsto até o momento

(CHEN et al., 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; MOREIRA et al., 2006; CHEN et al., 2008; BONTEMPS et al., 2010; REIS JUNIOR et al., 2010).

Este aumento no entendimento da diversidade dos rizóbios deve-se essencialmente à aplicação de várias técnicas de análise do DNA, como o uso de marcadores moleculares, ampliações de DNA com *primers* específicos e análises de genes ribossomais em estudos de filogenia (KASCHUK et al., 2006; HUNGRIA et al., 2008).

## **2.7 Marcadores moleculares**

Marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou ainda como uma sequência direta da estrutura do DNA (AVISE, 2004).

Com o advento das técnicas bioquímicas e moleculares, baseadas na análise de polimorfismo de proteínas e fragmentos de DNA, uma rápida proliferação da utilização de marcadores foi observada. A primeira classe de marcadores baseava-se no polimorfismo de proteínas, as isoenzimas. Esta classe de marcadores é bastante utilizada, entretanto como o número de sistemas enzimáticos disponíveis para análise é pequeno, a técnica apresenta-se limitada a alguns estudos (DIAS et al., 2003).

Atualmente existem várias técnicas disponíveis que empregam uma estratégia particular para detecção do polimorfismo no DNA; entre estas podem ser citadas: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - Polimorfismo do DNA Amplificado Randomicamente), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) e Microssatélites (SSR: Single Sequence Repeats – Sequências Simples Repetidas; ISSR: Inter Simple Sequence Repeats – Sequência Simples Repetida Interna) (MARTINS, 2006).

Os RFLPs foram os primeiros marcadores utilizados e evidenciam o polimorfismo pela fragmentação do DNA total através do uso de enzimas de restrição e observação da hibridização dos fragmentos com sequências homólogas de DNA, marcadas com radioatividade ou por compostos que

desencadeiam uma reação de luminescência (LOPES et al., 2002; DIAS et al., 2003).

Com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR surgiram novos marcadores moleculares, destacando-se os marcadores RAPD; nos quais o polimorfismo é relevado pela amplificação de locos através de iniciadores (*primers*) compostos de sequências curtas de oligonucleotídeos; e os AFLP, que se baseiam na amplificação de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição que clivam o DNA em sítios específicos (VOS et al., 1995; LOPES et., 2002).

Estes marcadores são sensíveis, rápidos, relativamente simples e revelam vários locos dispersos pelo genoma sem exigir conhecimento prévio da informação genética de sequências-alvo (MEDEIROS, CARDOSO e FERREIRA, 2006), como também se observa no uso de marcadores microssatélites ou SSR (Single Sequence Repeats) que são amplificados em PCR utilizando-se de *primers* específicos de 20 a 30 bases complementares que amplificam sequências únicas repetidas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996; HE et al., 2003; MALONE e ZIMMER, 2005).

A utilização destas classes de marcadores moleculares e de suas variantes tem permitido uma grande evolução na análise de perfis de DNA (CARRIERO et al., 2002; KUZNETSOVA et al., 2005), na biologia de conservação (LI, CHEN e ZHANG, 2005; HAO et al., 2006), na genética de populações (MAMURIS et al., 2002; ZHANG et al., 2007) e em estudos de filogenia (KOCHIEVA et al., 2006).

### **2.7.1 Marcadores filogenéticos**

Os marcadores são considerados uma ferramenta ideal para conservação de recursos genéticos vegetais, fornecendo informações úteis para a filogenia e melhoramento das plantas (ROUT e MOHAPATRA, 2006).

O genoma vegetal é composto por genoma de origem nuclear, mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) e cloroplastidial (DNAcp). Cada um destes genomas

apresentam características úteis para resolver questões evolutivas nos diferentes níveis (WALBOT e CULLIS, 1985; NAHUM, 2001).

O DNA ribossomal (DNAr) é um dos genes nucleares mais utilizados nos estudos filogenéticos de plantas (BAKER, SCHRIRE e KIN, 2000; CHAW et al., 2000; MURPHY et al., 2003; McMAHON e HUFFORD, 2004). O DNAr eucariótico está organizado em *tandem*, com milhares de cópias no genoma sendo composto pela subunidade menor (18S) apresentando aproximadamente 1.800 pares de base com várias regiões conservadas e a subunidade maior (26S). As regiões 18S e 26S são separadas pelo DNAr nuclear 5,8S (JUDD et al., 1999).

Nas análises filogenéticas os íntrons e espaçadores de genes nucleares de DNAr (ITS) também merecem destaque por serem regiões que tendem a acumular mutações mais rapidamente. Estas regiões estão sendo utilizadas em estudos de níveis taxonômicos mais baixos, em geral, gênero e espécie onde existe divergência mais recente (DOYLE e LUCKOW, 2003). A região ITS também provou ser de grande utilidade para estudos filogenéticos em níveis infragenéricos em plantas de várias famílias, devido as suas rápidas taxas de evolução de sequências e sítios de flanqueamento dos *primers* bem conservados (SHAW et al., 2005; BAUMEL et al., 2002; KRESS et al., 2005; LEVIN, MYERS e BOHS, 2006). Esta região possui duas regiões denominadas de ITS-1, entre o 18S e o 5.8S; e ITS-2, entre o 5.8S e o 25-28S. As características tornam estas regiões convenientes para a identificação molecular são: 1) toda a região ITS é frequentemente entre 600 a 800 pares de bases e pode ser amplificada com oligonucleotídeos universais; 2) multicópias naturais de repetição de DNAr fazem a região ITS fácil para amplificar pequenos fragmentos e 3) estudos demonstram que regiões ITS são frequentemente variáveis entre espécies eucariontes (GARDES e BRUNS, 1993).

O genoma de cloroplasto (DNAcp) também é fonte empregada em estudos de filogenia por apresentar estabilidade estrutural e devido ao seu padrão de herança e taxa de mutação, além de apresentar uma sequência altamente conservada em termos de tamanho, estrutura, conteúdo e ordem dos genes (JUDD et al., 2002). O DNAcp é localizada no interior dos cloroplastos de vegetais superiores e apresenta forma circular com tamanho variando entre

120 kb a 220 kb (NAHUM, 2001). Tem-se observado o aumento nos estudos em filogenia molecular nos diferentes níveis taxonômicos, construídas a partir do DNACp (BRUNEAU et al., 2001; LUCKOW et al., 2003; McMAHON e HUFFORD, 2004; HASTON, LEWIS e HAWKINS, 2005; SALAMIN et al., 2005).

A maioria das análises filogenéticas relacionadas a plantas usando genoma de cloroplasto envolve o gene *rbcL* codificador da subunidade maior da Rubisco e que possui uma taxa de evolução lenta, apresentando boa resolução ao nível de família, para angiospermas (SOLTIS et al., 2000; APG II, 2003; SALAMIN et al., 2005). Entre as regiões plastídias não codificadoras melhor estudadas nas análises filogenéticas, encontram-se o íntron *trnL* e os espaçadores intergênicos *trnL-trnF* (MES et al., 2000; HOLT, HOROVAL e BURES, 2004; LLEDÓ et al., 2005). A região do íntron do gene *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-trnF* estão entre as cinco regiões que provém maior número de caracteres potencialmente informativos (SHAW et al., 2005). Deste modo, essas regiões têm sido amplamente utilizadas nas análises filogenéticas nos mais variados níveis taxonômicos, sendo capaz de detectar variação inter e intraespecífica em diversas espécies vegetais (MES et al., 2000; BRUNEAU et al., 2001; MUSCHNER et al., 2003; LEE e WEN, 2004; HASTON, LEWIS e HAWKINS, 2005; TSAI et al., 2006).

Marcadores moleculares também são utilizados para estudos taxonômicos e diversidade de micro-organismos. Neste sentido, sequências do gene DNAr 16S são de grande utilidade para identificação e classificação filogenética de procariontes como apontado nos trabalhos de Sun et al. (2008) e Thomas et al. (2008) baseados neste gene.

As moléculas de DNA 16S e 23S presentes no ribossomo são comumente empregadas na taxonomia de procariotos por serem regiões conservadas e se enquadram nos conceitos de marcadores filogenéticos relatados por Piazza (2006). Em bactérias, o operon DNA ribossomal, é composto por três genes conservados funcional e evolutivamente: o gene da subunidade menor (*rrs*) 16S RNAr, o gene da subunidade maior 23S RNAr, compostos por aproximadamente 1.500 e 3000 nucleotídeos respectivamente; e o gene 5S RNAr com regiões intergênicas 16S-23S DNAr (IGS). As regiões 23S DNAr e os IGSs apresentam maior divergência entre as espécies, diferindo quanto à taxa de evolução; com o 23S DNAr contribuindo de forma especial

para estudos de especiação (VINUESA et al., 1998; VAN BERKUM e FURHMANN, 2000).

A caracterização da sequência do gene 16S DNAr tem sido amplamente utilizada e entre as vantagens dessa abordagem, destacam-se a capacidade de comparação dos produtos gênicos no contexto evolucionário na sistemática molecular e a possibilidade de correlacionar a ocorrência dos genótipos e os ambientes onde são encontrados (VAN BERKUN et al., 2000; CHENEBY et al., 2000).

A utilização do gene 16S DNAr tem demonstrado ser confiável para a separação de gêneros e espécies de bactérias (GEVERS et al., 2005) e tem sido aplicado extensivamente nos estudos de filogenia de rizóbios. Segundo Laguerre et al. (2001), o método de sequenciamento parcial ou total do gene 16S DNAr é um dos mais confiáveis para o agrupamento de estirpes de rizóbio. Chueire et al. (2003), realizaram a classificação taxonômica das estirpes de rizóbios recomendadas para elaboração de inoculantes nas culturas da soja e do feijoeiro no Brasil, baseados no sequenciamento do gene 16S RNAr e Elliott et al. (2009), estudaram as posições filogenéticas de vários rizóbios que foram determinadas através da comparação de sequências dos seus genes 16S DNAr.

Outras variações e combinações de métodos estão sendo utilizadas para estudar a diversidade e verificar a posição taxonômica das bactérias; alguns deles têm mostrado boa correlação com o sequenciamento do gene 16S DNAr, tais como: ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis); DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), PCR-SSCP (Single-Strand-Conformation Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). No entanto, a análise de PCR com oligonucleotídeos específicos REP, ERIC e BOX, destaca-se como um dos métodos que têm mostrado melhor a posição filogenética de bactérias, de forma especial, as fixadoras de nitrogênio (LAGUERRE et al., 1996; FERREIRA e HUNGRIA, 2002; DEPRET et al., 2004; GRANGE et al., 2007).

### 2.7.2 Marcadores *fingerprint*

Uma das aplicações mais úteis da PCR na classificação e identificação de micro-organismos é a técnica de *fingerprint* genômico proposta por Versalovic, Koeuth e Lupski (1991), Versalovic, Schneider e De Bruijn (1994) e De Bruijn (1992) que utiliza *primers* complementares de sequências de DNA repetitivas altamente conservadas, e presentes em múltiplas cópias nos genomas da maioria das bactérias (RADEMAKER, ARTS e VINUESA, 2005).

Estas sequências parecem estar localizadas em distintas posições intergênicas no genoma, e em ambas as orientações; sendo REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e BOX (*Box Element*) as três principais famílias de elementos (HUNGRIA et al., 2008). Segundo Selenska-Pobell (1995), as amplificações com os oligonucleotídeos dos elementos REP ERIC e BOX, geram padrões altamente característicos quando separados em gel de agarose.

Os *primers* BOX (154 pb) são geralmente recomendados por gerar “impressões digitais” mais robustas e produzir um padrão de fragmentos mais complexo. O elemento BOX está subdividido em três subunidades: box A (54 pb), box B (43 pb) e box C (50 pb), com a subunidade box A parecendo ser altamente conservada em bactérias. Estes elementos foram, inicialmente, identificados em micro-organismos Gram-positivos (*Streptococcus pneumoniae*), mas logo também provaram utilidade para a tipagem de espécies Gram-negativas (MARTINS et al., 1992; KOEUTH, VERSALOVIC e LUPSKI, 1995). Segundo Hungria et al. (2008) e Menna et al. (2009), análises por BOX-PCR resultam em perfis com maior número de bandas e menor custo na análise, por requerer um único *primer*.

Os *primers* REP (35-40 pb) geram uma menor complexidade, porém produzem “impressões digitais” reproduzíveis e que permite a diferenciação dos isolados. As sequências REP são encontradas em *clusters*, onde cópias sucessivas são organizadas em orientação alternada, com sua análise se mostrando altamente eficiente para a obtenção de perfis de bactérias diazotróficas endofíticas ou associativas (ALBINO et al., 2006; TORRES et al., 2008).

Entre as três metodologias, o conjunto de *primers* para o ERIC (124-127 pb) é o mais sensível a contaminações durante a reação de PCR, entretanto gera padrões de bandeamento altamente discriminatório (RADEMAKER e DE BRUJN, 1996). Este elemento pode ser amplificado com um único *primer* ou com um par de *primers* denominados ERIC1 e ERIC2, estabelecendo-se como uma metodologia útil para tipificação de genomas bacterianos com grande poder discriminatório e de reprodutibilidade (VERSALOVIC, 1991; LUZZARO et al., 2001; SILBERT et al., 2004; AGARWAL et al., 2002).

A aplicação dos três elementos a uma amostra aumenta o poder de discriminação da técnica, fato que tem sido evidenciado em estudos de diversidade genética com bactérias diazotróficas (ALBINO et al., 2006; HUNGRIA et al., 2008; TORRES et al., 2008).

Abordagens polifásicas combinando informações genéticas através da utilização dos elementos BOX, REP e ERIC e de sequências de genes como o 16S, aliados a aspectos fenotípicos e fisiológicos; são usadas para melhorar a precisão da discriminação genética e têm provado serem úteis em pesquisas de diversidade de rizóbios (LOUWS et al., 1994; DE BRUIJN et al., 1996; HUNGRIA et al., 2000, 2006; MOSTASSO et al., 2002; GEVERS, 2005; PINTO et al., 2007; REIS JUNIOR, 2010).

## **2.8 Métodos de análises de filogenia e diversidade**

Para estudos de filogenia e diversidade existem análises fenéticas e cladísticas que são usadas para a construção de árvores através de dados obtidos pela utilização de marcadores moleculares (EMYGDIO et al., 2003). Para as análises fenéticas que utilizam medidas de distância ou similaridade genética, destaca-se o algoritmo UPGMA (Agrupamento Pareado não Ponderado Baseado na Média Aritimética). Este método é utilizado em trabalhos de diversidade, principalmente com populações silvestres e considera as médias aritiméticas das medidas de dissimilaridade evitando a caracterização por valores extremos entre os indivíduos considerados (CRUZ e ARNEIRO, 2003). Dentro do método de agrupamento UPGMA podem ser considerados coeficientes de similaridade, sendo os mais utilizados o coeficiente de Simple Matching (SM) e o coeficiente de Jaccard (J). Estes

coeficientes são definidos pela razão entre as concordâncias positivas e negativas e o conjunto total das variáveis; com o coeficiente de Simple Matching (SM) considerando as concordâncias positivas e negativas e o coeficiente de Jaccard (J) considerando apenas as concordâncias positivas (GAIA et al., 2004).

Nas análises cladísticas podem ser produzidas árvores para cada caráter. O método de máxima parcimônia para análise cladística, indica a melhor árvore por requerer o menor número de mudança e os métodos de máxima verossimilhança e inferência bayesiana apontam a árvore considerada como mais provável estatisticamente (MAROUELLI, 2009). Comparada a métodos tradicionais de análises de dados moleculares para estudos de filogenia como parcimônia, máxima verossimilhança e Neighbour-Joining, a estatística bayesiana é relativamente nova e bastante interessante por gerar tanto uma árvore estimada, quanto o grau de incerteza de cada grupo que compõe a árvore. A estatística bayesiana é altamente relacionado com a verossimilhança, sendo a hipótese ótima aquela que apresenta máxima probabilidade posterior que é dada pela verossimilhança multiplicada pela probabilidade *a priori* desta hipótese (ANDRADE et al., 2007). O método numérico utilizado para estimar a probabilidade posterior é o algoritmo de Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC) por ser capaz de gerar amostras aleatórias de uma distribuição de interesse sendo a distribuição posterior na inferência filogenética (HOLDER e LEWIS, 2003).

## 2.9 Referências

AGARWAL, G; KAPIL, A.; KABRA, S.K.; CHANDRA, R.; DAS, B.; DIWEDI, S.N. Phenotypic & genotypic variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis in India. **India Journal of Medical Research**, v.11, p.73-81, 2002.

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

ALBINO, U.; SARIDAKIS, D.P.; FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M.; VINUESA, P.; ANDRADE, G. High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. **Plant and Soil**, v.287, n.2, p.199-207, 2006.

ALI, S. F.; RAWAT, L.S.; MEGHVANSI, M.K.; MAHNA, S.K. Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v.4, p.13-18, 2009.

ANDRADE, B.S.; SELBACH-SCHNADELBACH, A.; RÖESSLE, S.C.S.; PEREIRA, G.A.G.; GÓES-NETO, A. Análise filogenética por inferência bayesiana de plasmídeos mitocondriais de fungos. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p. 153-155, 2007.

ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. The diversity of phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.4025-4034, 2002.

ANDRADE, L.D. **Plantas das caatingas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1989. 243p.

APG II, (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, p. 399-436, 2003.

ARAÚJO, A. S. F.; CARVALHO, E.M.S. Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. Contribuindo para o desenvolvimento do meio rural do Piauí. **Comunicado Técnico**, n.11, p.1-4, 2006.

ARAÚJO, A. S. F.; CARVALHO, E. M. S; “**Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas**”; Universidade Federal do Piauí Pró-reitoria de Extensão Centro de Ciências Agrárias; Comunicado técnico, nº11, 1p, 2006.

ARAÚJO, F.F.; CARMONA, F.G.; TIRITAN, C.S.; CRESTE, J.E. Fixação biológica de N<sub>2</sub> no feijoeiro submetido a dosagens de inoculantes e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.29, n.4, p.535-540, 2007.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**, second edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2004.

BABIC, K. H.; SCHAUSS, K.; HAI, B.; SIKORA, S.; REDŽEPOVIC, S., RADL, V.; SCHLOTTER, M. Influence of different *Sinorhizobium meliloti* inocula on abundance of genes involved in nitrogen transformations in the rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2903 – 3185, 2008.

BAIS, H.P.; PARK, S.; WEIR, T.L.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**, v.9, n.1, p.26-32, 2004.

BAKER, N.P.; SCHRIRE, B.D.; KIM, J.H. Generic relationships in the tribe Indigofereae (Leguminosae: Papilionoideae) based on sequence data and morphology. In:HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematics 9**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. p.311-337.

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 consorciados de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.38, n.85, p.27-37, 2010.

BARBOSA, T.R.; SILVA, M.P.S.; BARROSO, D.G. Plantio de sabiazeiro (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth) em pequenas e médias propriedades. Manual Técnico 2, **Programa Rio Rural**, 2008.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, e *Rhizobium* sp. Nodule Bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, n.2, p.1198-1206, 2006.

BARRETT, C.F.; PARKER, M.A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, n.1, p.57-65, 2005.

BAUMEL, A.; AINOUCHE, M.L.; BAYER, R.J.; AINOUCHE, A. K.; MISSET, M. T. Molecular phylogeny of hybridizing species from the genus *Spartina* Schreb. (Poaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.22, p.303-314, 2002.

BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MURESU, R.; GIACOMINI, A.; AQUARTINI, A. Gamma proteobacteria can nodule legumes of genus *Hedysarum*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, n.4, p.426-468, 2004.

BERGAMASCHI, C., ROESCH, L.F.W., QUADROS, P.D.; CAMARGO, F.A.O. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p.727-733, 2007.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVEZ, B.J.R.; REIS, V.M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.252, p.139-149, 2003.

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

BORGES, W.L.; SILVA, C.E.R.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio de acessos de amendoim com estirpes nativas de rizóbios. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** v.2, n.1, p.32-37, 2007.

BOUHMOUCH, I.; SOUAD-MOUHSINE, B.; BRHADA, F.; AURAG, J. Influence of host cultivars and Rhizobium species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v.162, n.10, p.1103-1113, 2005.

BRUN, E.J. **Biomassa e nutrientes na Floresta Estacional Decidual, em Santa Tereza, RS.** 2004. 136p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

BRUNEAU, A.; FOREST, F.; HERENDEEN, P.S.; KLITGAARD, B.B.; LEWIS, G. P. Phylogenetic relationships in Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast trnI íntron sequences. **Systematic Botany**. v.26, p.487-514, 2001.

CALDEIRA, M.V.W. **Determinação de biomassa e nutrientes em uma floresta Ombrófila Mista Montana em General Carneiro, Paraná.** 2003.176 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

CARRIERO, F., FONTANAZZA, G., CELLINIL, F., GIORIO, G. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, p.301–307, 2002.

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

CHAGAS JUNIOR, A.F., OLIVEIRA, L.A., OLIVEIRA, A.N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringa, v.32, n.1, p.161-169, 2010.

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

CHANG, Y.L.; WANG, E.T.; SUI, X.H.; ZHANG, X.X.; CHEN, W.X. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Lablab purpureus* (Linn.)

grown in Southern China. **Systematic & Applied Microbiology**, v.34, n.4, p.276-284, 2011.

CHAW, S.M.; PARKINSON, C.L.; CHENG, Y.; VICENT, T.M.; PALMER, J.D. Seed plants phylogeny inferred from all three plant genomes: monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. **Proceedings of the National Academy of Science**. v.97, p.4086-4061, 2000.

CHAUDHARY, M.; FUJITA, K. Comparison of phosphorus deficiency effects on the growth parameters mashbean, mugbean, and soybean. **Soil Science and plant Nutrition**, Tokyo, v.44, n.1, p.19-30, 1998.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.392-397, 1988.

CHEN, W. M.; LAEVENS, 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 cystic fibrosis patients. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 1729–1735, 2001.

CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; CHOU, J.H.; CHOU, Y.J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.R.; ELLIOTT, G. N., SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; JAMES, E.K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa-nodulating* strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.7461– 7471, 2005.

CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; COENYE, T.; CHOU, J.H.; BARRIOS, E.; FARIA, S.M.; ELLIOTT, G.N.; SHEU, S.Y.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1847–1851, 2006.

CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; LIN, K.Y.; CHOU, J.H.; SHEU, S.Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** [S.I.], v.57, n.5, p.1055-1059, 2007.

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

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J. C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.34, p.121-128, 2000.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; FERREIRA, C.; GRANGE, L.; CAMPO, R. J.; MOSTASSO, F. L.; ANDRADE, D. S.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro. Londrina: Embrapa – Soja, 2000. 32 p. (Boletim de Pesquisa, n. 3).

CHUEIRE, L.M.O.; BANGEL, E.; MOSTASSO, F.L.; CAMPO, R.J.; PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento 56 do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, n.5, p.833–840, 2003.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R.S.A.; MARTINS, L.V.; AMARAL, F.H.C.; MOREIRA, F.M.S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.1, p.1-7, 2011.

CRUZ, C.D.; CERNEIRO, P.C.S. Modelos Biométricos aplicados ao melhoramento genético. v.2, 2003, 585p.

DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2180-2187, 1992.

DE BRUIJN, F.J., RADEMAKER, J., SCHNEIDER, M., ROSSBACH, U., LOUWS, F.J. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses. In: STACEY, G., MULLIN, B., AND GRESSHOFF, P. (Eds.). **Biology of Plant-Microbe Interaction, Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions**. Knoxville - Tennessee, APS Press, 1996.p. 497–502.

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, n.4, p.715-733, 1994.

DEPRET, G.; HOUOT, S.; ALLARD, M.R.; BREUIL, M.C.; NOUAÏM, R., LAGUERRE, G. Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam.v.51, p.87-97, 2004.

DIAS, L.A.S.; MARITA, J.; CRUZ, C.D.; BARROS, E.G.; SALOMÃO, T.M.F. Genetic distance and its association with heterosis in Cacao. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, v.46, p.339-347, 2003.

DOYLE, J.J.; LUCKOW, M.A. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, v.131, p.3, p.900-910, 2003.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem- nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, n.1, p.89-98, 1988.

ELLIOTT, 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.

ELLIOTT, G.N.; CHOU, J.H.; CHEN, W.M.; BLOEMBERG, G.V.; BONTEMPS, C.; MARTINEZ-ROMERO, E.; VELAZQUEZ, 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.

EMYGDIO, B.M.; ANTUNES, I.F.; CHOER, E.; NEDEL, J.L. Eficiência de coeficientes de similaridade em genótipos de feijão mediante marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.2, p.243-250, 2003.

FAVARETTO, N.; MORAIS, A.; MOTTA, A.C.V.; PREVEDELLO, B.M.S. Efeito da revegetação de área degradada na fertilidade do solo e nas características da palhada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**; Brasília, v.35, n.2, p.289-297, fev. 2000.

FELICIANO, A.L.P. **Estudo da germinação de sementes e desenvolvimento de muda, acompanhado de descrições morfológicas, de dez espécies arbóreas ocorrentes no Semiárido nordestino**. 1989. 114 f. Tese (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros do Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.7, p.835-842, 2003.

FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, Reading, v.79, p. 139–152, 2002.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília, EMPRABA-CENARGEN, 1996, 220p.

FERREIRA, R.L.C.; JUNIOR, M.A.L.; ROCHA, M.S.; SANTOS, M.V.F.; LIRA, M.A.; BARRETO, L.P. Deposição e acúmulo de matéria seca e nutrientes em serrapilheira em um bosque de Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.31, n.1, p.7-12, 2007.

FLORENTINO, L.A.; MOREIRA, F.S. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereineriae*, microsimbiote de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, v.33, n.2, p.215-226, 2009.

FONTOURA, R. **Selação de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para Lotus glaber e Lotus subbiflorus**. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 2008.

FRANCO, A.A.; NEVES, M.C.P. Fatotes limitantes à fixação biológica de nitrogênio. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Ed.) **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBCS, 1992, p.219-230.

FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R.; VIEIRA, C.; TSAI, S.M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.08, p.1145-1159, 2002.

FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. **Feijão-caupi: Avanços tecnológicos**. Brasília, Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. 519 p.

FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; PEER, Y. van de; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.3, p.733-739, 2005.

GAIA, J.M.D.; MOTA, M.G.C.; COSTA, M.R.; MARTINS, C.S.; POLTRONIERI, M.C. Análise comparativa de fenogramas gerados por dois coeficientes de similaridade baseados em isoenzimas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). **Revista Ciência Agrária**, n.42, p.9-23, 2004.

GARCIA, J., DUARTE, J.B., FRASSETO, E.G. SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EM SEMENTES DE SANSÃO-DO-CAMPO (*Mimosa caesalpiniaefolia* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.32, n.1, p.29-31, 2002.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, Oxford, v.2, p.113-118, 1993.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: The Williams & Wilkins/Springer-Verlag, 2001. p.119-154.

GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENYE, T.; GIBSON, A.H. Genetic variation in the effectiveness of nodulation of Lucerne varieties. **Australian Journal of Agricultural Research**, n.13, p.388- 399, 1962.

GOMES, P. **Forragens fartas na seca**. 4 ed. São Paulo: Nobel, 1977. 468p.

GONÇALVES, C.A.; FERNANDES, M.M.; ANDRADE, A.M. Celulose e carvão vegetal de *Mimosa Caesalpiniaefolia* Benth (Sabiá). **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v.6, n.1, p.51-58, 1999.

GRANADA, C.E. **Seleção de rizóbios e estudo da compatibilidade simbiótica em *Desmodium intanun* e *Lotus spp.*** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e Ambiental, p.70, 2010.

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

GUALTER, R.M.R.; LEITE, F.F.C.; ARAÚJO, A.S.F.; ALCANTRA, R.M.C.; COSTA, D.B. Inoculação e adubação mineral em feijão-caupi: efeitos na nodulação, crescimento e produtividade. **Scientia Agraria**, v.9, n.4, p.469-474, 2008.

GUTTERIDGE, R.C. The potential of nitrogen fixing trees in livestock production systems. In: International Workshop, 1998, Morrilton. Proceedings... Morrilton: Nitrogen Fixing Trees for Fodder Production, 1998. p.1-16.

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*, an endangered endemic of China, Using ISSR Markers. **Biochemical Genetics**, v.44, p.29–43, 2006.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.7, p.667-672, 2005.

HARTWIG, U.A. The regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v.1, n.1, p.92-120, 1998.

HASTON, M.E.; LEWIS, G.P.; HAWKINS, J.A. A phylogenetic reappraisal of the Peltophorum group (Caesalpinieae: Leguminosae) based on the chloroplast trnL-F, rbcL and rps16 sequence data. **American Journal of Botany**, v.92, n.8, p.1359-1371, 2005.

HE, G.; MENG, R.; NEWMAN, M.; GAO, G.; PITTMAN, R.N.; PRAKASH, C.S. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMG Plant Biology**, v.3, n.3, 2003.

HOLDER, M.; LEWIS, P.O. Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian Approaches. **Nature Reviews Genetics**, v.4, p.275-284, 2003.

HOLT, S.D.S.; HOROVA, L.; BURES, P. Indel patterns of the plastid DNA *trnL-trnF* region within the genus *Poa* (Poaceae). **Journal of Plant Research**. v.117, p.393-407, 2004.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M, A.T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.

HUNGRIA, M., ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.M.O., PROBANZA, A., GUTTIERREZ-MAÑERO, F.J., MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.1515–1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M.O., MEGÍAS, M., LAMRABET, Y.; PROBANZA, A., GUTTIERREZ-MAÑERO, F.J.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, v.288, p.343–356, 2006.

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BANGEL E.V.; BARCELLOS, F.G.; GRANGE, L.; PINTO, F.G.S.; RIBEIRO, R.A.; BATISTA, J.S.S.; BINDE, D.R.; PLOTTEGHER, F.; KASCHUK, G.; ALBERTON, A.; LOUREIRO, M.F.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.M.O. Identificação das metodologias mais adequadas para a análise da diversidade genética intra e interespecífica em rizóbios. In: RELARE, 14., Bonito, 2008. **Programa e resumos...** s.l.: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. p.12.

JARVIS, B. D. W.; BERKUM, P. V.; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, n.3, p.895-898, 1997.

JESUS, E.C.; MOREIRA, F.M.S.; FLORENTINO, L.A.; RODRIGUES, M.I.D.; OLIVEIRA, M.S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.8, p.769-776, 2005.

JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae CONN 1938, 321. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: William and Wilkins, 1984. p.235-244.

JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BÉNA, G.; SY, A.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2269-2273, 2004.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. *Plant Systematics a Phylogenetic Approach*. Massachusetts, USA: **Sinauer Associates**, 1999. 464p.

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. 2002. **Plant systematics : a phylogenetic approach**. 2nd.Sinauer Associates, Sunderland, Mass., xvi. 2002. 576p.

KAHINDI, J.H.P.; WOOMER, P.; GEORGE, T.; MOREIRA, F.M.S.; KARANJA, N.K.; GILLER, K.E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam v.6, n.1, p.55-76, 1997.

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

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 Research**, v.5, p.408-418, 1995.

KRESS, W.J.; AI-ZHONG, L.; NEWMAN, M.; QING-JUN, L. The molecular Phylogeny of *Alpinia* (ZINGIBERACEAE): A complex and Poliphyletic Genus of Gingers. **American Journal of Botany**, v.92, n.1, p.167-178, 2005.

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

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR-DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.6, p.2029-2036, 1996.

LAGUERRE, G.; NOUR, S.M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v.147, p.981-993, 2001.

LARANJEIRA, F.F. Infestação de cochonilha pardinha em sansão-do-campo usado como cerca viva em pomares de laranja. **Bragantia**, v.56, n.2, p.289-290, 1997.

LEE, C.; WEN, J.; Phylogeny of *Panax* using chloroplast trnC-trnD intergenic region and the utility of trnC-trnD in interspecific studies of plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.31, p.894-903, 2004.

LEVIN, R.A.; MYERS, N.R.; BOHS, L. Phylogenetic relationships among the "spiny" solanums (*Solanum* subgenus *Leptostemonum*). **American Journal of Botany**, v.93, p.157-169, 2006.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D. Leguminosae or Fabaceae? In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (eds). **Advances in Legume Systematic** 10, Higher Level Systematics. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2003, p.1-3.

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

LIMA, A.S.; NÓBREGA, R.S.A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D.F.; MOREIRA, F.M.S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil** [S.I.], v.319, n.1, p.127-145, 2009.

LIMA, I.C.R.; LIRA, M.A.; MELLO, A.C.L.; SANTOS, M. V. F.; FREITAS, E.V.; FERREIRA, R.L.C. Avaliação de sabiazeiro (*Mimosacaesalpiniaefolia* Benth.) quanto a acúleos e preferência por bovinos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.3, n.3, p.289-294, 2008.

LIMA, J.L.S. de. **Plantas forrageiras das caatingas: usos e potencialidades**. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1996. 43 p.

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

LLEDÓ, M.D.; CRESPO, M.B.; FAY, M.F.; CHASE, M.W. Molecular phylogenetics of *Limonium* (Plumbaginaceae): Biogeographical and systematic implications. **American Journal of Botany**. v.92, p.1189-1198, 2005.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; OLIVEIRA, A.V.; CAMARGO, L.E.A., FUNGARO, M.H.P., CARNEIRO, M.S., VIEIRA, M.L.C. Marcadores Moleculares Dominantes (Rapl e Aflp): Aspectos técnicos e interpretação genética. **Biociencia**, n.29, 2002.

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.

LOUWS, F.J., FULBRIGHT, D.W., STEPHENS, C.T., DE BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprinting of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas pathovars* and strains generated with repetitive sequence and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.2286–2295, 1994.

LUCKOW, L., MILLER, J.T.; MURPHY, D.J.; LIVSHULTZ, T. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. In: KLITGGARD, B. B.; BRUNEAU, A. (eds). Advances in legume Systematics 10, Higher Level **Systematics**. **Royal Botanic Gardens**, Kew, UK, p.197-220, 2003.

LUZZARO, F.; MANTENGOLI, E.; PERILLI, M.; L OMBARDIG., ORLANDI, V., ORSATTI, A.; AMICOSANTE, G., ROSSOLINI, G. M.; TONIOLO, A. Dynamics of a Nosocomial Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.5, p.1865-1870, 2001.

MACCIÓ, D.; FABRA, A.; CASTRO, S. Acidity and calcium interaction affect the growth of *Bradyrhizobium* sp. and the attachment to peanut roots. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.34, n.2, p.201-208, 2002.

MAIA, G.N. **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D e Z Computação Gráfica e Editora, 2004. 413p.

MALONE, G.; ZIMMER, P.D. Marcadores moleculares. In: **Ferramentas da biotecnologia no melhoramento genético vegetal**. Pelotas: UFPel, p.78-114, 2005.

MAMURIS, Z., SFOUGARIS, A.,I., STAMATIS, C., SUCHENTRUNK, F. Assessment of genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations based on variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Biochemical Genetics**, v.40, p.323–338, 2002.

MARQUELLI, L.P. **Análises filogenéticas de acessos do gênero *Heliconia* L. (*Heliconiaceae*) utilizando marcadores moleculares**. 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MARTIN B.; HUMBERT O.; CAMARA M.; GUENZI E.; WALKER J.; MITCHELL T.; ANDREW P.; PRUDHOMME M.; ALLOING G.; HAKENBECK R.; MORRISON D.A.; BOULNOIS G.J.; CLAVERYYS J.P. 1992. A highly conserved

repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.3479–3483, 1992.

MARTINS, C.C., CARVALHO, N.M., OLIVEIRA, A.P. QUEBRA DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE SABIÁ (*Mimosa caesalpiniaefolia* BENTH.) **Revista Brasileira de Sementes**, v.14, n.1, p.5-8, 1992.

MARTINS, W.F.S. **Diversidade genética de populações de *Antonomus grandis* Boheman** (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

McMAHON, M.; HUFFORD, L. Phylogeny of Amorpheae (Fabaceae: Papilionoideae). **American Journal of Botany**, n.91, v.8, p.1219-1230, 2004.

MEDEIROS, C.F.L.; CARDOSO, M.A.; FERREIRA, P.C.G. Uso de microssatélites em estudos de biologia da conservação. **Floresta e Ambiente**, v.13, n.2, p.25 - 36, 2006.

MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C.M.; LIMA, J.A.M.; FERNANDES, Y.T.D.; OLIVEIRA, V.R.; BORGES, W.L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.31, n.3, p.529-535, 2009.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O.; Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.2, p.235-246, 2006.

MENDES, B.V. **Plantas das caatingas**: umbuzeiro, juazeiro e sabiá. Mossoró: Fundação Vingt-Unt Rosado, 2001. 110p.

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

MENNA, P.; PEREIRA, A.A.; BANGEL, E.V.; HUNGRIA, M. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, v.48, p.120-130, 2009.

MES, T.H.; KUPERUS, P.; KIRSCHNER, J.; STEPANEK, J.; OOSTERVELD, P.; STORCHOVA, H. den NIJS, J.C. Hairpins involving both inverted and direct repeats are associated with homoplasious indels in non-coding chloroplast DNA of *Taraxacum* (Lactuceae: Asteraceae). **Genoma**, v.43, p.634-641, 2000.

MESCHEDE, D.K.; BRACCINI, A.L.; BRACCINI, M.C.L.; SCAPIM, C.A.A.; SCHUAB, S.R.P. Rendimento, teor de proteínas nas sementes e características agronômicas de plantas de soja em resposta a adubação foliar e

ao tratamento de sementes com molibdênio e cobalto. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.26, n.2, p.139- 145, 2004.

MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio. In. MOREIRA, F.M.S, SIQUEIRA, J.O.; BRUSSARD, L. (eds). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. UFLA, Lavras. 2008. P.768.

MOREIRA, F.M.S.; CRUZ, L.; FARIA, S.M.; MARSH, T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F.O.; PITARD, R.M.; J. YOUNG, P.W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.1, p.197-206, 2006.

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

MOSTASSO, L., MOSTASSO, F.L., DIAS, B.G., VARGAS, M. A. T. HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v.73, p.121–132, 2002.

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

MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MORI, B.; CALAMASS, R.I.; DAZZO, F.B.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobium with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiol Ecology**, v.63, p.383–400, 2008.

MURPHY, D.J.; MILLER, J.T.; BAYER, R.J.; LADIGES, P.Y. Molecular phylogeny of *Acacia* subgenus *Phyllodineae* (Mimosoideae: Leguminosae) based on DNA sequences of the internal transcribed spacer region. **Australian Systematic Botany**. v.16, p.19-26, 2003.

MUSCHNER, V.C.; LORENZ, A.P.; CERVI, A.C.; BONATTO, S.L.; SOUZA-CHIES, T.T.; SALZANO, F.M.; FREITAS, L.B.; A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**.v.90, p.1229-1238, 2003.

NAHUM, L.A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S. R. (ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 82-96.

OLIVEIRA, J. P. **Investigação da variabilidade genética em rizóbios que nodulam o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes centros de diversidade**. Curitiba: 2009. 97f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.27, n.5, p.597-603. 2003.

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

PAVANELLI, L.E.; ARAÚJO, F.F. Fixação biológica de nitrogênio em soja em solos cultivados com pastagens e culturas anuais do oeste paulista. **Jornal de Biosciências**, v. 25, n.1, p.21-29, 2009.

PEREIRA, V.L.A. Valor nutritivo do “mulch” e do feno de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) inerme e com acúleos. 1998, 67f. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

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

PIAZA, G. **Identificação molecular de bactérias de solo cultivado de Campo Belo do Sul (SC) capazes de nodular feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PINTO, F.G.S., HUNGRIA, M., MERCANTE, F.M. Polyphasic characterization ofrazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil biology and soil biochemistry**, v.39, p.1851–1864, 2007.

QUAGGIO, J. A. et al. Peanut response to lime and molybdenum application in low pH soils. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.28, n.4, p.659- 664, 2004.

QUEIROZ, J.S. **The Acarau Valley in Northeast Brazil: vegetation, soils and land use**. Logan: Utah State University, 1985. Ph.D. Thesis.

RADEMAKER, J.L.W.; ARTS, H.J.M.; VINUESA, P. Molecular typing of environmental isolates. In: OSBORN, A. M.; SMITH, C. J. (Eds). **Molecular Microbial ecology**. New York: Taylor & Francis, 2005. p.97-134.

RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUJN, F.J. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANO – ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. (Eds.). **DNA marker: protocols, applications and overviews**. New York: Wiley, J. & Sons, Inc., 1996, p.1-26.

REIS JUNIOR, F.B.; SIMON, M.F.; GROSS, E.; BODDEY, R.M.; ELLIOTT, G.N.; NETO, N.E.; LOUREIRO, M.F.; QUEIROZ, L.P.; SCOTTI, M.R.; CHEN,

W.; NORÉN, A.; RUBICO, M.C.; 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.

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

RIBASKI, J.; LIMA, P.C.F. Brasil: *Mimosa caesalpiniaefolia*. In: RED LATINOAMERICANA DE COOPERACIÓN TÉCNICA EN SISTEMAS AGROFORESTALES. **Especies arboreas y arbustivas para las zonas aridas y semiaridas de America Latina**. Santiago: FAO, Oficina Regional para America Latina y el Caribe, 1997. p. 107-111. (FAO. Zonas aridas y semiaridas, nº 12). Programa Conjunto FAO/PNUMA de Control de la Desertificación en America Latina y el Caribe.

RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBBA-RAO, N.S.; MATEOS, P.F.; GILLIS, M.; DAZZO, F.B.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.5217-5222, 2002.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; SUBBA-RAO, N.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELAZQUEZ, E. Description of *Devosia neptunia* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. **Systematic & 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.

RODRIGUES, C.S.; LARANJO, M.; OLIVEIRA, S. Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. **Current Microbiology**, v.53, p.1-7, 2006.

ROUT, G.R.; MOHAPATRA, A. Use of molecular markers in ornamental plants: a critical reappraisal. **European Journal of Horticultural Science**, Stuttgart, v.71, .2, p.53- 68, 2006.

RUFINI, M.; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; OLIVEIRA, D.P.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.1, p.81-88, 2011.

RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE, FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V.

Q. (Eds.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, Cap.8, p.281-335, 2005.

SÁ, C.O.; SÁ, J.L. Sistema Agrossilvipastoril como alternativa para reduzir a dependência de insumos externos no semiárido In: Gomide, C. A. M.; Rangel, J. H. A.; Muniz, E. N.; Almeida, S. A.; Sá, J. L.; Sá, C. O. (Eds.) **Alternativas alimentares para ruminantes**. Aracajú: EMBRAPA, 2006. p.195-205.

SALAMIN, N.; HODKINSON, T.R.; SAVOLAINEN, V. Towards building the tree of life: a simulation study for all angiosperm genera. **Systematic Biology**, v.54, p.183-196, 2005.

SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; BORGES, W.L.; NEVES, M.C.P.; RUNJANEK, N.G.; NASCIMENTO, L.R.S.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.; BEZERRA, R.V. Faixa hospedeira de rizóbios isolados das espécies *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p. 20-27, 2007.

SEETIN, M.W.; BARNES, D.W. Variation among alfafa genotypes for rate of acetylene reduction. **Crop Science**, n.17, p.783-787, 1977.

SELENSKA-POBELL, S. Direct and simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. In: ACKERMANS, A. D. L. ; VAN ELSAS, J. D.; BRUIJIN, F. D. (Eds) **Molecular Microbial Ecology Manual**, Kluwer Academic, Dordrech, p.1-17, 1995.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J.G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTINEZ-ROMERO, E. Advances in *Rhizobium* research. Crit. **Reviews in Plant Sciences**, v.21, p.323-378, 2002.

SHAW, J., LICKEY, E.B., BECK, J.T., FARMER, S.B, LIU, W., MILLER, J., SIRIPUN, K.C., WINDER, C. T., SCHILLING, E. E. & SMALL, R. L. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, v.92, n.1, p.142-166, 2005.

SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology** [S.I.], v.33, n.5, p.269-274, 2010.

SILBERT, S.; PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J.; BARTH, A.L.; SADER, H.S. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.25, n.10, p.847-51, 2004.

SILVA, M.B.R.; VIÉGAS, R.A.; NETO, J.D.; FARIAS, S. A. Estresse salino em plantas da espécie florestal sabiá.1 **Caminhos de Geografia**, v.10, n.30, p.120 – 127, 2009.

SILVEIRA, N.D.; PEREIRA, M.G.; POLIDORO, J.C.; TAVARES, S.R.L.; MELO, R. B. Aporte de nutrientes e biomassa via serapilheira em sistemas agroflorestais em Paraty (RJ). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.17, n.2, p.129-136, 2007.

SIMON, M.F.; PROENÇA, C. Phytogeographic patterns of Mimosa (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? **Biological Conservation**, v.96, p.279–296, 2000.

SINGLETON, P.W.; TAVARES, J.W. Inoculation responses of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous Thizobium populations. **Applied Environmental Microbiology**, v.51, p.1013-1018, 1986.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotechnologia do solo: Fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 236 p, 1988.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; CHASE, M.W.; MORT, M.E.; ALBACH, D.C.; ZANIS, M.; SAVOLAINEN, V.; HAHN, W.H.; HOOT, S.B.; FAY, M.F.; AXTELL, M.; SWENSEN, S. M.; PRINCE, L.M.; KRESS, W.J.; NIXON, K.C.; FARRIS, J. S. Angiosperm phylogeny inferred from a combined dataset of 18SrDNA, rbcL an atpB sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v.133, p.381-461, 2000.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; ENDRESS, P.K.; CHASE, M.W.; **Phylogeny and Evolution of Angiosperms**. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, 2005. P. 370.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J.H. Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobium technology. **Springer-Verlag**, New York, 1994, 450p.

STRALIOTTO, R. **A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro**. Embrapa, CNPAB, 2002.

STREETER, J. Inhibition of legume nodule formation and N<sub>2</sub> fixation by nitrate. **CRC Citrical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v.7, p.1-23, 1988.

SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, Rockville, v.55, p.415-424, 2008.

SY, A., GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C. DREYFUS, B. 2001. Methylophobic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **The Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 214–220, 2001.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. Fisiologia vegetal. 3 ed., Porto Alegre: **Artemed**, 2004, p.719.

TEIXEIRA, M.L.F.; COUTINHO, H.C.L.; FRANCO, A.A. Effects of *Cerotoma arcuata* (Coleoptera: *Chrysomelidae*) on predation of nodules and on N<sub>2</sub> of *Phaseolus vulgaris* Row crops, forage and small grains. **Entomological Society of America**, Collige Park, v.89, n.3, p.165-169, 1996.

THIES, J.E.; WOOPER, P.L.; SINGLETON, P.W. Enrichment of *Bradyrhizobium* spp. populations in soil due to cropping of the homologous host legume. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.27, n.4, p.633-636, 1995.

TIGRE C.B. **Estudos de silvicultura especializada do Nordeste**. Mossoró: ESAM, 1976. 176p. (ESAM. Coleção Mossoroense, 41).

THOMAS, P.; SWARNA, G.K.; ROY, P.K.; PATIL, P. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v.93, p.55-63, 2008.

TORRES, A.R.; ARAÚJO, W.L.; CURSINO, L.; HUNGRIA, M.; PLOTTEGHER, F.; MOSTASSO, F.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different 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.; LUDENA, D.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E., VELÁZQUEZ, E.. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1318–1327, 2005.

TSAI, L. C., YU, Y.C., HSIEH, H.M., WANG, J.C., LINACRE, A., LEE, J.C.I. Species identification using sequences of the trnL íntron and the trnL-trnF IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan. **Forensic Science International**, v.164, p.193–200, 2006.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, F.; VIZCAÍNO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** Papers in press, doi: 10.1099/ijs.0.63551–0, 2005.

VAN BERKUM P.; FUHRMANN J. J. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rDNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.50, p.2165–2172, 2000.

VAN BERKUN, P.; EARDLY, B. D. The Aquatic Budding Bacterium *Blastobacter denitrificans* is a Nitrogen-fixing Symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 1132-1136, 2002.

VAN BERKUN, P.; FUHRMANN, J.J.; EARDLY, B.D. Phylogeny of Rhizobia. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. **Nitrogen**

**fixation: from molecules to crop productivity.** Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, 2000. p 3-8.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.M.; DE VOS, P.; WILLEMS, ANNE. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v.25, n.4, p.507-512, 2002.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, n.19, p.6823-31, 1991.

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

VIEIRA, E.L. **Composição química e digestibilidade in situ de forrageiras e seletividade de bovinos em bosque de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia Benth.*), nos períodos chuvoso e seco.** 2000.56f Dissertação (Mestrado em Zootecnia).Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2000.

VINUESA, P. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rDNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16 rDNA sequencing. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p. 096-2104, 1998.

VOGEL, H.L.M.; SCHUMACHER, M. V.; TRUBY, P. Avaliação da devolução de serapilheira em uma floresta estacional decidual, em Itaara, RS, Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.17, n.3, p.187-196, 2007.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, n.23, p.4407-4414, 1995.

WALBOT. V.; CULLIS, C. A. Rapid genomic change in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 36, p. 367-396, 1985.

WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G. W.; GLENN, A. R. Physiological responses to acid stress of an acid-soil tolerant and an acid-soil sensitive strain of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p.621-624, 2003.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, n.2, p.697-703, 1991.

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

WILLEMS, A., MUNIVE, A., LAJUDIE, P., GILLIS, M. In Most *Bradyrhizobium* Groups Sequence Comparison of 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer Regions Corroborates DNA-DNA Hybridizations. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p.203-210, 2003b.

WILLEMS, A.; FERNANDEZ-LOPEZ, N.; MUNOZ-ADELANTADO, E.; GORIS, J.; VOS, P.; MARTINEZ-ROMERO, E.; TORO, N.; GILLIS, M. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1207-1217, 2003a.

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.

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; RUMJANEK, N.G.; FREIRE FILHO, F.R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.4, p.353-359, 2005.

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

ZHANG, W.T.; YANG, J.K.; YUAN, T.Y.; ZHOU, J.C. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, v.44, p.201-210, 2007.

ZHAO, L.; DENG, Z.; YANG, W.; CAO, Y.; WANG, E.; WEI, G. Diverse rhizobia associated with *Sophora alopecuroides* grown in different regions of Loess Plateau in China. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, n.8, p.468-477, 2010.

ZILLI, J.E.; VALICHESKIR, R.; RUMJANEK, N.G.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; FREIRE FILHO, F.R. E NEVES, M.C.P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.5, p.811-818, 2006.

### 3 CAPÍTULO 1

## FILOGENIA DE SABIÁ (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) EM CINCO MUNICÍPIOS DO NORDESTE BRASILEIRO<sup>1</sup>

**Paulo Geovani Silva Martins<sup>2</sup>, Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra<sup>3</sup>,  
Márcio Vieira da Cunha<sup>4</sup>, Marcus Vinicius de Aragão Batista<sup>5</sup>, Mario  
Andrade Lira Junior<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas (PPGMGP), Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

<sup>2</sup> Mestrando do PPGMGP da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Dois Irmãos, s/n, Rua: Dom Manuel de Medeiros, Bairro Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup> Pesquisadora do Laboratório de Genômica, Instituto Agrônomo de Pernambuco

<sup>4</sup> Unidade Acadêmica de Serra Talhada, UFRPE, Serra Talhada, PE, Brasil.

<sup>5</sup> Doutorando do PPGG, UFPE, Recife, Brasil.

<sup>6</sup> Agronomia, UFRPE, Recife, PE, Brasil. Bolsista de produtividade do CNPq. Email: mario.lira@depa.ufrpe.br

### RESUMO

O sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) é uma das espécies arbóreas nativas mais importantes do semiárido brasileiro por apresentar múltiplo uso, mas não existem relatos de pesquisas sobre a diversidade genética desta espécie. Este trabalho teve como objetivo avaliar filogeneticamente plantas de sabiá de áreas nativas ou implantadas em três estados brasileiros usando a região espaçadora não codificante *atpB-rbcL* do genoma cloroplastidial. Folhas de árvores

visualmente representativas foram coletadas em Crato-CE, Gravatá-PE, Itambé-PE, Mossoró-RN e Serra Talhada-PE. A extração do DNA genômico foi realizada com kit comercial e para as amplificações da região intergênica do genoma cloroplastidial foi utilizado o par de *primers atpB-rbcL*. Os produtos da amplificação foram sequenciados e usados para estimar a filogenia por Inferência Bayesiana. As amplificações com os espaçadores intergênicos *atpB-rbcL* apresentaram produtos com aproximadamente 1500 pb em 73 dos 100 acessos de sabiá, nenhum dos quais agrupou com as sequências referências encontradas no NCBI. Os acessos CRATO 4 e SERRA TALHADA 20 formaram um grupo externo indicando que podem ser as mais próximas geneticamente. A alta taxa de segregação influenciou na diversidade dentro e entre as diferentes áreas estudadas e a origem geográfica não determina a variação dos observados nos acessos das plantas estudadas. A escassez de dados de filogenia molecular para sabiá revela a necessidade da utilização de outros marcadores moleculares para estimar a diversidade, filogenia e as diferenças taxonômicas de *Mimosa*.

**Palavras-Chave:** Leguminosa, genoma de cloroplasto, gene *rbcL*, inferência bayesiana, filogenia.

## **ABSTRACT**

Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) is one of the most important native trees of the Brazilian semi-arid due to its multiuse, but there are no research reports on its genetical diversity. This work aimed to phylogenetically evaluate sabiá plants from native or implanted areas in three Brazilian states using the non-coding region *atpB-rbcL* of the chloroplast genome. Leaves from visually representative trees were collected at Crato-CE, Gravatá-PE, Itambé-PE, Mossoró-RN and Serra Talhada-PE. Genomic DNA was extracted with a commercial kit, and the intergenic chloroplastial genome was amplified with *atpB-rbcL* primers. The amplification products were sequenced and used for Bayesian Inference phylogenetic evaluation. Amplification products had approximately 1500 bp in 73 of 100 sabiá accesses, none of which grouped

with reference sequences on NCBI. CRATO 4 and SERRA TALHADA 20 formed an external group, indicating they may genetically closer to a *Mimosa* ancestor. The high segregation rate affected diversity within and between studied areas, and did not confirm plant biogeography. The lack of molecular phylogenetic data for sabiá indicates the need to use other molecular markers to estimate diversity and taxonomical differences on *Mimosa*

**Keywords:** legume, chloroplast genome, *rbcl* gene, Bayesian inference, phylogeny.

## INTRODUÇÃO

O sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) destaca-se entre as leguminosas na recuperação de áreas degradadas por fixar nitrogênio em simbiose com bactérias do gênero rizóbio. Vários trabalhos como os de Franco et al. (1996), Faria et al. (2002), Chada, Campelo e Faria (2004) e Xavier et al. (2006), mostram que o uso de leguminosas associadas a micro-organismos apontam resultados positivos na recuperação de áreas degradadas. O sabiá é uma das essências florestais nativas mais importantes do semiárido brasileiro por apresentar múltiplo uso como: Mourão, estaca ou tutor; forrageira; ou cerca viva (MENDES, 1989, 2001; MAIA, 2004; VASCONCELOS, 1989; GARCIA, DUARTE e FRASSETO, 2002).

Ocorrendo naturalmente nos estados Estados do Rio Grande do Norte, Piauí e Ceará (RIBASKI e LIMA, 2003), a *Mimosa caesalpinifolia* Benth. é uma espécie pioneira, com alta capacidade de regeneração e resistência à seca (BALBINO et al., 2010), além de ser encontrada em povoamentos artificiais do Maranhão à Bahia (RIZZINI, 1995) bem como em regiões úmidas dos Estados da Paraíba (Brejo Paraibano), Rio de Janeiro (Baixada Fluminense e Planaltos Fluminenses) e São Paulo (Vale do Paraíba do Sul e Planaltos Paulistas) (GOMES, 1977; MENDES, 1989). A utilidade dos marcadores moleculares é dada pelo entendimento da variabilidade genética e do processo de evolução de espécies vegetais, por meio de análise comparativa dos genomas, e podem ser usados de acordo com o objetivo do estudo marcadores obtidos de DNAm (mitocondrial) e DNAc (cloroplastidial) são mais apropriados para estudos de

filogenia entre espécies fortemente relacionadas. As variações que ocorrem nestes genomas, tais como rearranjos (inserções, deleções e inversões), mutações pontuais são os caracteres utilizados para o estudo filogenético. A utilização de distintos genes permite maior confiança pelo conhecimento de regiões que evoluíram em diferentes taxas e, portanto, a utilização para diferentes propósitos para filogenia molecular (QIU et al., 1999, NEIGEL e AVISE, 1993; ARRIEL et al., 2009). No caso de marcadores baseados em análises de sequências pode-se chegar a estudos de espécies com alto nível de divergência evolucionária. Ao mesmo tempo, estes marcadores são utilizados para análises de espécies ou acessos em qualquer nível e sua flexibilidade para detectar a existência de diferentes genes ou regiões gênicas pode ser apropriada para estudos filogenéticos.

Estudos recentes vêm revelando uma variação genética entre populações com base no genoma do cloroplasto que evolui geralmente muito lentamente tornando-se interessante para avaliar relações filogenéticas entre gêneros, famílias ou níveis ainda mais elevados ou em sequências específicas como espaçadores não codificante entre tRNAs de DNA cloroplastial (DEMASURE, SODZI e PETIT, 1995; DEMASURE, COMPS e PETIT, 1996; MORT et al., 2007; KÅREHED et al., 2008; LEVIN, BLANTON e MILLER, 2009). Alguns *primers* universais para a amplificação de espaçadores de região não codificante do genoma de cloroplastos vem sendo estudado por vários autores (TABERLET et al., 1991; DEMASURE, SODZI e PETIT., 1995; DUMOLIN – LAPEGUE, PEMONGE e PETIT, 1997). Um par de *primer* universal descrito por Chiang, Schaal e Peng (1998) abrange os genes de uma região espaçadora não codificante entre a subunidade grande da ribulose1-5 bifosfato-carboxilase (*rbcL*) e da  $\beta$ -subunidade do ATP-sintase cloroplastial (*atpB*). Estes espaçadores são ricos em nucleotídeos AT e, portanto tem uma fraca limitação funcional e em consequência desta característica este espaçador está evoluindo rapidamente já que eventos de inserção e deleção são comuns nesta região espaçadora. Autores como Golenberg et al. (1993), Manen, Natali e Ehrendorfer (1994), Natali et al. (1995) e Savolainen et al. (1994); demonstraram que estes espaçadores são excelentes para a avaliação filogenética tanto ao nível de espécies ou estudos populacionais e que podem ser usados para um amplo número de plantas desde briófitas a angiospermas.

Uma das análises para estimar a filogenia, é a inferência Bayesiana, que consiste em um método estatístico altamente relacionado com a máxima verossimilhança (MV). Segundo Felsenstein (1981), a MV avalia a hipótese da história evolucionária em termos de probabilidade de que um modelo proposto e a história hipotética originariam um conjunto de dados. A superposição é que a história com maior probabilidade de alcançar o estado observado é preferida à história com menor probabilidade. Neste caso, o método procura a árvore com maior probabilidade ou mais verossímil. Enquanto que a hipótese ótima para Bayesiana é a que apresenta a máxima probabilidade posterior, que é estimada a partir de um modelo evolutivo previamente selecionado. A probabilidade posterior para a hipótese é dada pela verossimilhança multiplicada pela probabilidade a priori desta hipótese. Este valor pode ser interpretado como sendo a probabilidade da árvore estar correta (HUELSENSBECK et al, 2001; MAROUELLI, 2009).

O objetivo deste trabalho foi analisar filogeneticamente plantas de sabiá de áreas nativas ou naturalizadas em três estados brasileiros utilizando marcadores de DNA cloroplastidial.

## **MATERIAL E METÓDOS**

### **Amostragem**

Folhas de 20 plantas consideradas por avaliação visual como representativas de cada área, foram coletadas em mata nativa ou implantada de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em março de 2010 em cinco cidades de três estados brasileiros (Anexo I): 1) Gravatá (8°16'S), Itambé (7°24'S) e Serra Talhada (7°55'48°36'S) em Pernambuco; 2) Crato (7°12'28°80'S) no Ceará e 3) Mossoró (5°12'31°68'S) no Rio Grande do Norte.

Para a preservação do material até a extração de DNA, logo após a coleta as folhas foram mantidas em tubos falcon de 50 ml com sílica gel até completa desidratação, e em seguida levados para o laboratório de Genoma do Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA.

## Extração e Amplificação do DNA

200 mg de folha foram maceradas em cadinho e pistilo usando nitrogênio líquido para a extração de DNA usando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), conforme recomendação do fabricante. A qualidade e quantificação do DNA foram observadas em gel de agarose 0,8% através de eletroforese em tampão Tris-borato-EDTA/TBE 0,5X com corrente de 100 Volts. As amostras de DNA foram diluídas com água ultrapura (1:100) e em seguida armazenadas a -20°C.

Para a amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) da região espaçadora intergênica *atpB-rbcL* foram usados os *atpB* (5'- ACA TCK ART ACK GGA CCA ATA A-3') e *rbcL* (5'- AAC ACC AGC TTT RAA TCC AA-3').

A amplificação foi realizada para um volume final de 25 µL usando: 0,3 µl de Platinum® Taq DNA Polymerase, 0,3 mM de cada *primer*, 10% de tampão, 2,5 mM de dNTP's, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 15,95 µL de água ultrapura autoclavada e 2,0 µL do DNA diluído (1:100). As amplificações foram realizadas em termociclador Biometra® com um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 49°C por 1 min e 45s, extensão a 72°C por 1 min, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. Uma alíquota de 5,0 µL do produto amplificado foi observada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, a 100 Volts, em tampão Tris-borato-EDTA/TBE 0,5X corado com 1,25 µL de SYBR Green, e 2,5 µL de azul de bromofenol usando como marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega). O gel foi fotografado em fotodocumentador LPIX-HE através do programa "LabImagem 1D" da Loccus Biotecnologia.

## Purificação dos amplicons, sequenciamento de DNA e análise de dados

Os produtos de PCR obtidos passaram por processo de purificação no qual 52 µL de etanol 100% e 3 µL de acetato de amônia 7,5 M foram adicionados a 20 µL da reação. A amostra foi homogeneizada em vortex por 30 s e centrifugada por 20 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 150 µl de etanol 70%, que foi agitado em vórtex e

centrifugado por 5 min a 13.000 rpm. As amostras foram secas a temperatura ambiente overnight e em seguida ressuspensas em 20 µL de água de injeção estéril até completa diluição do DNA amplificado a 4°C overnight e conservadas a -20°C até o envio para sequenciamento pela Macrogen Inc. (Coréia do Sul) usando o sequenciador automático Applied Biosystems ABI PRISM 3730XL DNA analyzer (96 capilares). A reação de sequenciamento foi realizada em um termociclador MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler usando o kit de sequenciamento Big Dye™ Terminator Cycle com a Polimerase DNA AmpliTaq (FS enzyme) da Applied Biosystems realizado de acordo com o fabricante. Os fragmentos foram marcados por fluorescência, purificados com um terminador não incorporado usando o protocolo de precipitação com etanol. As amostras foram ressuspensas em água destilada e injetada para eletroforese no sequenciador.

### **Análise de dados**

As análises filogenéticas Bayesianas foram realizadas com o programa MrBayes versão 3.1 (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003). Os parâmetros foram otimizados através da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) para aproximar a probabilidade posterior da árvore. Foi utilizado o modelo evolutivo GTR+G, que se mostrou mais adequado baseado no Bayesian Information Criterion (BIC), implementado no programa jModelTest (POSADA, 2008). A topologia final foi estimada com 3.000.000 de interações usando 5.000 ciclos descartados e amostrando cada 100 interações.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

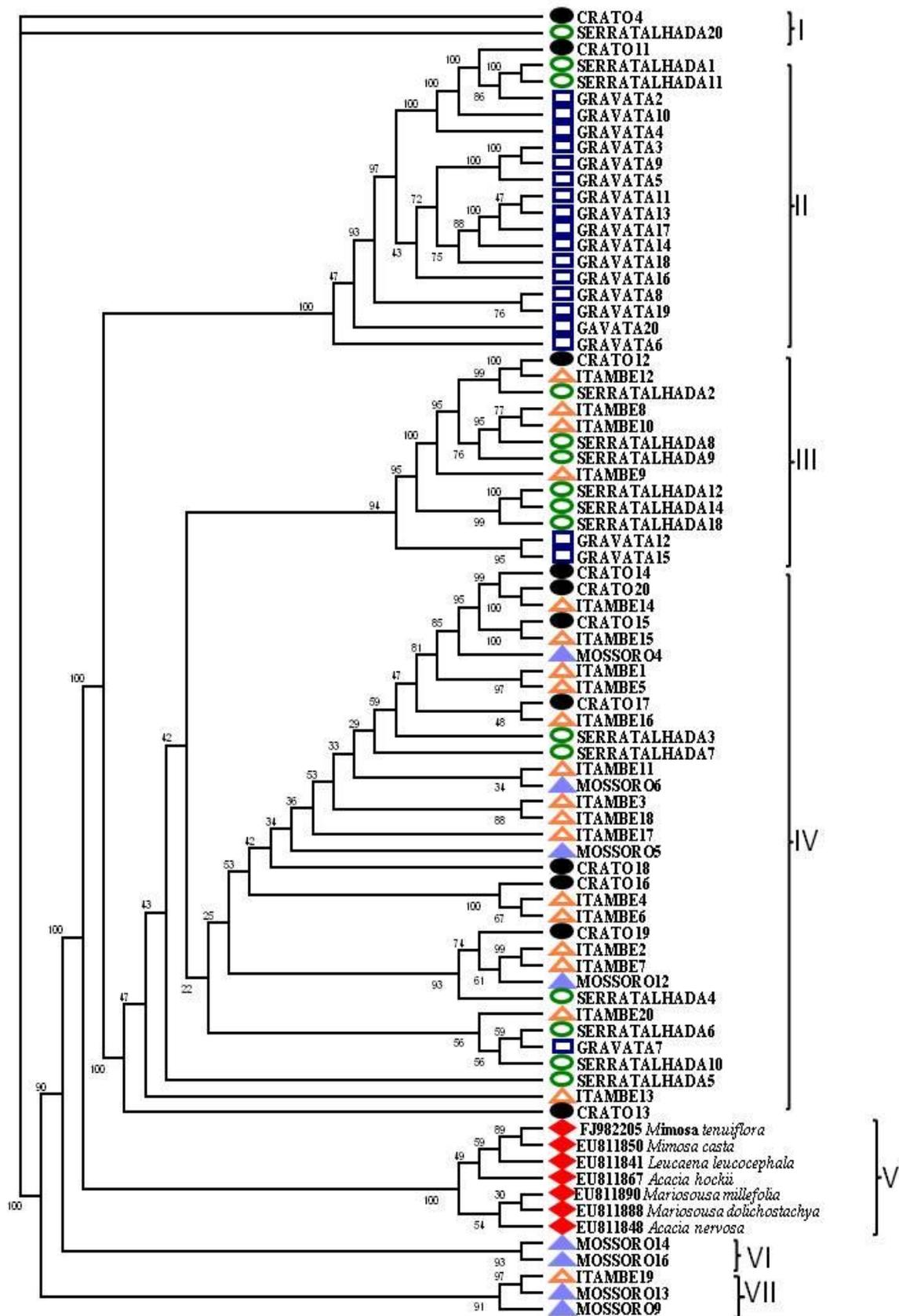
As ampliações com espaçadores intergênicos *atpB-rbcL* apresentaram produtos com aproximadamente 1500 pb em 72 dos 100 acessos de sabiá, enquanto os demais não amplificaram. As 72 sequências nucleotídicas geradas neste estudo (região *atpB-rbcL*) serão depositadas no GenBank. As sequências analisadas neste estudo não obtiveram homologia no GenBank com nenhuma

espécie de planta depositada. Motivo pelo qual todas as plantas estudadas não se agruparam com as sequências das espécies: *Mimosa tenuifolia* (EU982205); *Mimosa casta* (EU811850), *Leucaena leucocephala* (EU811841), *Acacia hockii* (EU811867), *Mariosousa millefolia* (EU811890), *Mariosousa dolichostachya* (EU811888) e *Acacia nervosa* (EU811848) retiradas do NCBI para servir como referência.

A árvore bayesiana apresentou sete grupos (Figura 1). O grupo I, com probabilidade posterior de 100%, é formado pelas plantas CRATO 4 e SERRA TALHADA 20. No grupo II a probabilidade posterior é de 100% e é formado pelas plantas de Gravata, Serra Talhada e Crato com probabilidades posteriores dentro do grupo variando de 43 a 100%. Com relação ao grupo III a probabilidade posterior é de 94%, e a probabilidade encontrada dentro do grupo é de 76 a 100% com o grupo sendo formado por plantas do Crato, Itambé, Serra Talhada e as duas de Gravatá (GRAVATA 12 e GRAVATA 15). O grupo IV é o maior grupo formado e estão presentes a maioria das plantas, com exceção das oriundas de Gravatá. As probabilidades posteriores do grupo IV variaram de 22 a 100%. O grupo V é formado pelos representantes de diferentes gênero que apresentam sequências já depositadas no NCBI, e a probabilidade posterior variou entre 30 a 100%. Neste grupo, os espécies *Mimosa tenuifolia* e *Mimosa casta* apresentaram probabilidade posterior de 89%. Era esperado que estas plantas do gênero *Mimosas* fossem a rama principal da árvore e os demais gêneros como *Leucena*, *Acacia* e *Mariosousa* se comportassem como grupo externo. Os nossos resultados demonstram que as plantas CRATO 4 e SERRA TALHADA 20, podem ser as mais próximos geneticamente de um ancestral do gênero *Mimosa*. O grupo VI, formado por MOSSORO 14 e MOSSORO 16, e o grupo VII formado pelas plantas ITAMBE 19, MOSSORO 13 e MOSSORO 19, comportaram-se como um grupo externo.

Apesar da credibilidade destas análises ser garantida pelos seus 95% a 100% de probabilidade posterior, valores que segundo Rannala e Yang (1996), são considerados satisfatórios e significativos para análise de filogenia; a origem geográfica não determina a variação dos observados nos acessos das plantas estudadas. Por ser uma planta com alta taxa de segregação, a forma como foi introduzida nas diversas áreas deve ter influenciado na sua filogenia. Hamrick (1983) obteve conclusões muito elucidativas para interpretar as

variações genéticas nas espécies associando o tipo de polinização das espécies com a sua estrutura genética e mostrou que as espécies autógamas apresentavam um padrão de estrutura genética inversa ao das plantas alógamas. Ou seja, como a cultura do sabiá está muito bem estabelecida nos locais estudados, era de se esperar que houvesse baixa diversidade entre as plantas de um mesmo ambiente geográfico e uma alta diversidade em relação aos distintos locais, mas observou-se neste estudo uma grande diversidade independentemente do local e da população estudada. Nos últimos anos, pesquisas referentes à genética de populações de plantas utilizando DNAcp tem sido desenvolvidas com maior frequência devido ao seu alto grau de divergência evolucionária e devido ao conhecimento de regiões que evoluíram, poderíamos inferir diferentes taxas dentro do gênero, entretanto, como foi utilizado apenas um marcador molecular neste estudo não podemos concluir que seja verdadeiro, uma vez que, Chiang, Schaal e Peng (1998) estudando a relação filogenética entre gênero e família de angiospermas usando espaço intergênico *atpB – rbcL* encontrou variação entre indivíduos em uma população de *Pasania* e sugeriram que este espaçador filogenético pode ser bastante útil para estudos de sistemática molecular a nível de subespécies e em populações. Autores como Shaw et al. (2007) comparando sequências genômicas cloroplastidiais em *Tabacco* usando os marcadores *rp132-trnL*, *trnQ-rps16*, *trnV-ndhC*, *ndhF-rp32*, *atp1-atpH* e outros, concluíram que apesar de haverem trabalhado com tantos marcadores, dependendo da linhagem taxonômica, cada marcador pode inferir um dado diferente já que estas regiões cloroplastidiais são susceptíveis a fornecer um maior numero de caracteres para estudos filogenéticos.



**Figura 1:** Árvore Bayesiana de consenso de 75 acessos de sabiá, oriundos de cinco municípios nordestinos, gerada pelo programa Mr. Bayes a partir do sequenciamento dos amplicons dos espaçadores *atpB-rbcL*.

## CONCLUSÕES

- Nenhuma das sequências obtidas pelo marcador molecular da região cloroplastidial *atpB-rbcL* obteve homologia com outras espécies de plantas.
- O grupo V formado pelas espécies referência apresentou uma probabilidade posterior de 89% e diferentemente do esperado não se mostrou como externo.
- Podemos verificar que de acordo com os resultados que as plantas CRATO 4 e SERRA TALHADA 20 são mais próximos geneticamente.
- As análises dos dados não confirmaram a origem geográfica das plantas estudadas.
- A segregação do sabiá influenciou na variabilidade genética das 72 plantas analisadas.
- Devido ao alto grau de divergência evolucionária inferida pela análise bayesiana poderíamos inferir diferentes *taxa* dentro do gênero *Mimosa*.
- O uso de mais marcadores molecular poderia concluir de forma precisa as diferenças taxonômicas deste gênero.

## AGRADECIMENTOS

A CAPES, CNPq e FACEPE por concessões de bolsa e financiamentos de auxílio a pesquisa, ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA e ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva – LABBE da Universidade Federal de Pernambuco.

## REFERÊNCIAS

- 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 consorciados de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.38, n.85, p.27-37, 2010.
- CHADA, S.S.; CAMPELLO, E.F.C.; FARIA, S.M. Sucessão vegetal em uma encosta reflorestada com leguminosas arbóreas em Angra dos Reis, RJ. **Revista árvore**, v.28, n.6, p.801-809, 2004.
- CHIANG, T.; SCHAAL, B.A.; PENG, C. Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the atpB and rbcL genes of chloroplast DNA. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.39, p.245-250, 1998.
- DEMESURE, B.; COMPS, B.; PETIT, R.J. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. **Evolution**, v.50, p.2515-2520, 1996.
- DEMESURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology**, v.4, p.129-131, 1995.
- DUMOLIN-LAPEGUE, S., PEMONGE, M.H.; PETIT, R. J. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. **Molecular Ecology**, v.6, p.393-397, 1997.
- FARIA, S. M.; SILVA, M.G.; GRAIG, J.; DIAS, S. L.; LIMA, H. C.; NARA, M. **Revegetação com espécies arbóreas fixadoras de nitrogênio em taludes de exploração de ferro na Samarco Minerações Mariana MG**. In:Água e biodiversidade. Palestras. Belo Horizonte 521-522.p. SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 5,. Belo Horizonte, MG. 2002.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from gene frequencies and quantitative characters: finding maximum likelihood estimates. **Evolution**, v.35, p.1229-1242, 1981.
- FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.C.; DIAS, L.E.; FARIA, S.M. **Uso de leguminosas associadas a micro-organismos na revegetação de áreas de mineração de bauxita em Porto Trombetas-Pa**. Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB; 71p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 27). 1996.
- GARCIA, J., DUARTE, J.B., FRASSETO, E.G. SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EM SEMENTES DE SANSÃO-DO-CAMPO (*Mimosa caesalpiniaefolia* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.32, n.1, p.29-31, 2002.
- GOLENBERG, E.M.; M.T. CLEGG, M.L. DURBIN, J. DOEBLEY, D.P.M. A. Evolution of a noncoding region of the chloroplast genome. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.2, p.52-64,1993.

GOMES, P. **Forragens fartas na seca**. 4 ed. São Paulo: Nobel, 1977. 468p.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural forest population. In: SCHONEWALD-COX, C.M. **Genetic and conservation**. New York, The Benjamin /Cummings, 1983. p.335-48.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J.P. "Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology." **Science**, v.294, p.2310-2314, 2001.

KÅREHED, J.; GROENINCKX, I.; DESSEIN, S.; MOTLEY, T.J.; BREMER, B. The phylogenetic utility of chloroplast and nuclear DNA markers and the phylogeny of the Rubiaceae tribe Spermacoaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.49, n.3, p.843-866, 2008.

LEVIN, R.A.; BLANTON, J.; MILLER, J.S. Phylogenetic utility of nuclear nitrate reductase: a multi-locus comparison of nuclear and chloroplast sequence data for inference of relationships among American Lycieae (Solanaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.50, n.3, p.608-617, 2009.

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D e Z Computação Gráfica e Editora, 2004. 413p.

MANEN, J.; NATALI, A.; EHRENDORFER, F. Phylogeny of Rubiaceae-Rubieae inferred from the sequence of a cpDNA intergenic region. **Plant Systematics and Evolution**. p.190 - 195.211, 1994.

MARQUELLI, LP (2009). **Análise filogenética de acessos do gênero Heliconia L (Heliconiaceae) usando marcadores moleculares**. Instituto de Ciências Biológicas Universidade de Brasília Departamento de Botânica. Brasília, 88 folhas.

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

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

MORT, M. E.; ARCHIBALD, J.; RANDLE, C.P.; LEVSEN, N.D.; O'LEARY, T. R.; TOPALOV, K.; WIEGAND, C.M.; CRAWFORD, D.J. Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci: **American Journal of Botany**, v.94, p.173-183, 2007.

NATALI, A., MANEN, J.F.; EHRENDORFER, F. Phylogeny of the Rubiaceae-Rubioideae, in particular the tribe Rubieae: evidence from a noncoding chloroplast DNA sequence. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.82, p.428-439, 1995.

NEIGEL, J.E.; AVISE, J.C. Application of a random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. **Genetics**, v.135, n.4, p.1209-1020, 1993.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v.25, p.1253-1256, 2008.

QIU, Y.L.; LEE, J.; BERNASCONI-QUADRONI, F.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P. S.; ZANIS, M.; ZIMMER, E.A.; CHEN, Z.; SAVOLAINEN, V.; CHASE, M.W. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. **Nature**, v.402, n.6760, p.404-407, 1999.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference, **Journal of Molecular Evolution** v.43, n.3, p.304-311, 1996.

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

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

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, p. 1572-1574, 2003.

SAVOLAINEN, V.; MANEN, J.F.; DOUZERY, E.; SPICHIGER, R. Molecular Phylogeny of Families Related to Celastrales Based on rbcL 5' Flanking Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.3, n.1, p.27.37,1994.

SHAW, J.; LICKEY, E.B.; SCHILLING, E.E.; SMALL, R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III *American Journal of Botany*, v. 94, p.275 – 288, 2007

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PATOU, G.; BOUVET, J. Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, v.17, p.1105-1109, 1991.

VASCONCELOS, B. **Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.), valiosa forrageira arbórea e produtora de madeira das caatingas**. Mossoró: ESAM, 1989. Não paginado. (ESAM. Coleção mossoroense, Série 13, 660).

XAVIER, A.G.R., MARTINS, L. M.V.M., RIBEIRO, J.R.A., RUMJANEK, N.G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Revista Caatinga**, v.19, n.1, p.25-33, 2006.

## **APÊNDICE I**



**Figura 1:** Imagem de satélite mostrando os pontos de coleta. Fonte: Google Earth.

**Tabela 1:** Caracterização de acúleos dos acessos de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth) coletados em cinco cidades de três Estados do Brasil.

<b>Localidade</b>	<b>Legenda</b>	<b>Identificação</b>	<b>Descrição</b>
Mossoró	M4	S1	Sem acúleos
Mossoró	M5	S2	Sem acúleos
Mossoró	M6	S3	Sem acúleos
Mossoró	M9	S4	Com acúleos (coletado imediatamente fora da àrea)
Mossoró	M12	S12	Sem acúleos (coletado imediatamente fora da àrea)
Mossoró	M13	S13	Com Acúleos grandes (coletado imediatamente fora da àrea)
Mossoró	M14	S14	Com poucos acúleos e pequenos (coletado imediatamente fora da àrea)
Mossoró	M16	S16	Com poucos acúleos e pequenos (coletado imediatamente fora da àrea)
Itambé	I1	S41	Com poucos acúleos
Itambé	I2	S42	Com muitos e grandes acúleos
Itambé	I3	S43	Com muitos e grandes acúleos
Itambé	I4	S44	Sem acúleos
Itambé	I5	S45	Sem acúleos
Itambé	I6	S46	Com muitos e grandes acúleos
Itambé	I7	S47	Sem acúleos
Itambé	I8	S48	Com poucos acúleos
Itambé	I9	S49	Com poucos e grandes acúleos
Itambé	I10	S50	Sem acúleos
Itambé	I11	S51	Sem acúleos
Itambé	I12	S52	Com poucos e pequenos acúleos
Itambé	I13	S53	Sem acúleos
Itambé	I14	S54	Com poucos acúleos

Continua na página seguinte

<b>Localidade</b>	<b>Legenda</b>	<b>Identificação</b>	<b>Descrição</b>
Itambé	I15	S55	Com poucos acúleos
Itambé	I16	S56	Sem acúleos
Itambé	I17	S57	Sem acúleos
Itambé	I18	S58	Sem acúleos
Itambé	I19	S59	Com poucos acúleos
Itambé	I20	S60	Sem acúleos
Serra Talhada	S1	S61	Com muitos e grandes acúleos
Serra Talhada	S2	S62	Com acúleos grandes
Serra Talhada	S3	S63	Com muitos e grandes acúleos
Serra Talhada	S4	S64	Com muitos e grandes acúleos
Serra Talhada	S5	S65	Com acúleos
Serra Talhada	S6	S66	Com muitos e pequenos acúleos
Serra Talhada	S7	S67	Com acúleos grandes
Serra Talhada	S8	S68	Com poucos e pequenos acúleos
Serra Talhada	S9	S69	Com muitos e grandes acúleos
Serra Talhada	S10	S70	Com acúleos grandes
Serra Talhada	S11	S71	Com poucos e pequenos acúleos
Serra Talhada	S12	S72	Com muitos e grandes acúleos
Serra Talhada	S14	S74	Com muitos e grandes acúleos
Serra Talhada	S18	S78	Com poucos e pequenos acúleos
Serra Talhada	S20	S80	Com poucos e pequenos acúleos
Gravatá	G2	S82	Com muitos e grandes acúleos
Gravatá	G3	S83	Com poucos e pequenos acúleos
Gravatá	G4	S84	Com poucos e pequenos acúleos
Gravatá	G5	S85	Com muitos e grandes acúleos
Gravatá	G6	S86	Com poucos e pequenos acúleos
Gravatá	G8	S88	Com muitos e grandes acúleos

Continua na página seguinte

<b>Localidade</b>	<b>Legenda</b>	<b>Identificação</b>	<b>Descrição</b>
Gravatá	G9	S89	Com poucos e pequenos acúleos
Gravatá	G10	S90	Com poucos e pequenos acúleos
Gravatá	G11	S91	Com poucos e pequenos acúleos
Gravatá	G12	S92	Com poucos e pequenos acúleos
Gravatá	G13	S93	Com muitos e grandes acúleos
Gravatá	G14	S94	Sem acúleos
Gravatá	G15	S95	Sem acúleos
Gravatá	G16	S96	Com muitos e grandes acúleos
Gravatá	G17	S97	Com muitos e grandes acúleos
Gravatá	G18	S98	Com muitos e grandes acúleos
Gravatá	G19	S99	Poucos acúleos
Gravatá	G20	S100	Sem acúleos
Crato	C4	S24	Com pequenos e poucos acúleos
Crato	C11	S31	Com pequenos e poucos acúleos
Crato	C12	S32	Com pequenos e poucos acúleos
Crato	C13	S33	Sem Acúleos
Crato	C14	S34	Com pequenos e poucos acúleos
Crato	C15	S35	Com acúleos
Crato	C16	S36	Com poucos acúleos
Crato	C17	S37	Com acúleos
Crato	C18	S38	Com poucos acúleos
Crato	C19	S39	Com poucos acúleos
Crato	C20	S40	Com pequenos e poucos acúleos

## 4 CAPÍTULO 2

### DIVERSIDADE E FILOGENIA RIZOBIANA DE ISOLADOS DO SABIÁ (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) DE DIFERENTES REGIÕES DO NORDESTE BRASILEIRO<sup>1</sup>

**Paulo Geovani Silva Martins<sup>2</sup>, Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra<sup>3</sup>,  
Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva<sup>3</sup>, Rayssa Pereira Vincentin<sup>2</sup>, Mario  
Andrade Lira Junior<sup>2,4</sup>**

<sup>1</sup> Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas (PPGMGP), Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

<sup>2</sup> Departamento de Agronomia - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Dois Irmãos, s/n, Rua: Dom Manuel de Medeiros, Bairro Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Genômica, Instituto Agronômico de Pernambuco.

<sup>4</sup> Bolsista de produtividade do CNPq. Autor para contato. Email: mario.lira@depa.ufrpe.br

### RESUMO

A fixação do nitrogênio pela simbiose leguminosa-rizóbio é uma das principais fontes de nitrogênio fixado nos ambientes terrestres. O processo ocorre no interior de estruturas específicas, denominadas de nódulos, onde bactérias diazotróficas convertem o nitrogênio atmosférico em amônia, depois é incorporada em diversas formas de N orgânico para utilização da planta. A taxonomia das bactérias diazotróficas tem sido modificada pela utilização em

conjunto de aspectos fenotípicos, fisiológicos e moleculares. Algumas das principais ferramentas moleculares para uso taxonômico são a amplificação e sequenciamento do gene 16S DNAr e o *fingerprint* genômico usando regiões repetitivas e conservadas de DNA. Este trabalho visa o estudo da diversidade e da filogenia de bactérias diazotróficas de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) inoculado com solo de cinco municípios do nordeste brasileiro. As bactérias foram isoladas, purificadas e caracterizadas morfofisiologicamente. Depois disso, o DNA foi extraído com kit comercial e a diversidade genética e a filogenia foram determinadas, respectivamente, com os oligonucleotídeos BOX, ERIC e REP e pela amplificação, purificação e sequenciamento do 16S DNAr. A caracterização morfofisiológica dos 47 isolados obtidos criou um dendrograma em que o isolado PE-GR02 formou uma rama monofilética. Os *fingerprints* com BOX, ERIC e REP criaram padrões distintos, e sua compilação criou o dendrograma com mais grupos. As sequências de 16S DNAr, quando comparadas por BLAST com o GenBank, resultaram em identidades genéticas variando entre 68 e 99% com estirpes de *Burkholderia*. A árvore filogenética do 16S DNAr construída com estes isolados e estirpes previamente depositadas no GenBank, recomendadas para produção de inoculantes, confirma que estes isolados são distintos das estirpes previamente depositadas. Os isolados IPA-PE-MO01, PE-MO02 e PE-MO04 foram os mais distintos dentro do grupo. A caracterização morfofisiológica e a compilação dos resultados de BOX, ERIC e REP aumentou o poder discriminatório dos isolados e a comparação das sequências do gene 16S DNAr no GenBank confirmaram a preferência de *Mimosa* por *Burkholderia* diazotróficas.

**Palavras-Chave:** Fixação biológica do nitrogênio, rep-PCR, 16S DNAr, filogenia.

## **ABSTRACT**

Biological nitrogen fixation from the legume-rhizobia symbiosis is one of the main sources of fixed nitrogen on land environments. This occurs inside specific structures, known as nodules, where diazotrophic bacteria convert atmospheric nitrogen to ammonia, later incorporated to several forms of organic nitrogen for

plant usage. Diazotrophic bacteria taxonomy has been substantially modified by the joint use of phenotypic, physiologic and molecular aspects. Some of the main molecular tools for taxonomical use are 16S rDNA amplification and sequencing and repetitive conserved DNA regions used for genomic fingerprinting. This work aims the phylogenetic study of diazotrophic bacteria from sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth) inoculated with soils from five municipalities of the Brazilian Northeast. The bacteria were isolated, purified and morpho-physiologically characterized. After that, DNA was extracted with a commercial kit, and genetic diversity was determined with REP, ERIC and BOX oligonucleotides and by 16S rDNA amplification, purification and sequencing. Morphophysiological characterization of the 47 isolates created a dendrogram, where isolate PE-GR02 formed a monophyletic branch. BOX, ERIC and REP fingerprinting presented distinct patterns, and their compilation created the dendrogram with most groups. 16S rDNA sequences were ca. 1.5 Kb, which after blasting to GenBank resulted in genetical identities ranging from 68 to 99% with *Burkholderia* strains. The 16S rDNA phylogenetic tree constructed with these isolates and GenBank deposits of strains recommended for inoculant production confirm these isolates are distinct from the previously deposited strains. Isolates PE-MO01, PE-MO02 and PE-MO04 were the most distinct within the group. Morphophysiological characterization and BOX, ERIC and REP compilation enhanced the discrimination of the isolates, and the 16S rDNA sequences compared with GenBank confirmed the preference of *Mimosa* for *Burkholderia* diazotrophic bacteria.

**Keywords:** biological nitrogen fixation, rep-PCR, 16S rDNA, diversity, phylogeny.

## INTRODUÇÃO

A fixação do nitrogênio pela associação de rizóbios com leguminosas é responsável pela maior parte do nitrogênio fixado nos ambientes terrestres. Esta associação teve início a aproximadamente 58 milhões de anos e se confunde com a história da família leguminosa (SPRENT, 2008). O processo

ocorre no interior de estruturas específicas, denominadas de nódulos, onde as bactérias convertem o nitrogênio atmosférico em amônia que é incorporada em diversas formas de N orgânico para utilização da planta (ARAÚJO e CARVALHO, 2006).

O agrupamento dos rizóbios foi inicialmente baseado em características fenotípicas, principalmente na habilidade de nodular algumas leguminosas, dando origem ao conceito de “grupos de inoculação cruzada”. A taxonomia do rizóbio baseada na especificidade hospedeira foi sendo substituída pela taxonomia numérica, que se apóia nas características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (HUNGRIA, VARGAS e ARAÚJO, 1997; MELLONI et al., 2006).

O uso de ferramentas moleculares para a análise filogenética tem levado a uma revisão substancial na taxonomia das bactérias fixadoras de nitrogênio (CHEN et al., 2000; GRANGE e HUNGRIA, 2004; McINNIS et al., 2004) tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento genômico. Isto tem levado à modificação, reorganização da taxonomia e descrição de novos gêneros (WILLEMS, 2007).

Atualmente os rizóbios estão distribuídos nos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984), *Mesorhizobium* (JORDAN, 1984; JARVIS et al., 1997), *Sinorhizobium* (*Ensifer*) (CHEN, YAN e LI, 1988; DE LAJUDIE et al., 1994), *Azorhizobium* (DREYFUS, GARCIA e GILLIS, 1988, PERRET et al., 2000; ANDRADE, MURPHY e GILLER, 2002; WILLEMS et al., 2003) e *Allorhizobium* (SESSITSCH et al., 2002). Além destes; *Methylobacterium* (SY et al., 2001), *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001), *Ralstonia* (CHEN et al., 2001), *Devosia* (RIVAS et al., 2003), *Phyllobacterium* (VALVERDE et al., 2005), *Ochrobactrum* (TRUJILLO et al., 2005), *Cupriavidus* (BARRETT e PARKER, 2006) e *Pseudomonas* (SHIRAISHI, MATSUSHITA e HOUGETSU, 2010) possuem espécies capazes de fixar nitrogênio atmosférico em nódulos formados nas raízes e em caules de plantas hospedeiras, sendo portanto, também denominados de rizóbios (WILLEMS, 2007).

A amplificação e sequenciamento do gene 16S DNAr e o *fingerprint* usando regiões repetitivas e conservadas de DNA; em geral no espaço intergênico (rep-PCR) são os principais responsáveis pelo avanço nas pesquisas com bactérias diazotróficas. Os estudos com o gene 16S DNAr

foram iniciados por Carl Woese, que relatou este gene como marcador molecular para estudos filogenéticos por ser uma região bastante conservada no genoma de procariontes (ATLAS e BARTHA, 1998). A utilização do gene 16S DNAr revolucionou o campo da ecologia microbiana, e com seu uso, é possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas (LUDWIG et al., 1997; HENTSCHEL et al., 2002), em nível de gênero e espécie (GEVERS et al., 2005).

Entre as características favoráveis para o uso de genes ribossomais em filogenia estão: i) são encontrados em todos os organismos vivos; ii) expressam estruturas secundárias altamente conservadas; iii) são componentes principais da estrutura dos ribossomos e, portanto, abundantes nas células; iv) posições diferentes das sequências nesses genes evoluíram em taxas diferentes, talvez em função destas moléculas serem mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos e terem um papel funcional no sistema de processamento de informações visto que este papel, deve ter sido bem estabelecido nos primeiros ancestrais comuns de Bactéria, Arquea e Eucaria. Os genes 16S DNAr que codificam mais de 21 proteínas e que estão na subunidade menor ribossomal presente em todos os organismos, fazem parte de um ancestral comum e acredita-se que estes genes não se submetem a transferência lateral de gene entre espécies e devido a estas unidades funcionais, bem como aos domínios altamente conservados das sequências de DNAr mas intercalados com regiões bastante variáveis, fizeram com que as sequências do gene 16S DNAr passassem a ser consideradas como excelentes escolhas para comparar organismos e inferir filogenias. (VANDAMME et al., 1996; MARTÍNEZ-ROMERO e CABALLERO-MELLADO, 1996; PACE, 1997; VAN BERKUM et al., 1998; GARRITY e HOLT, 2001).

A técnica de rep-PCR é empregada no estudo da diversidade das bactérias diazotróficas e se dá através da amplificação de regiões altamente conservadas e repetitivas do genoma bacteriano utilizando três oligonucleotídeos específicos: BOX, ERIC e REP (LUPSKI e WEINSTOCK, 1992; VERSALOVIC, KOEUTH e LUPSKI, 1991; VERSALOVIC et al., 1994). A amplificação das sequências repetidas do DNA pela técnica de PCR proporciona a formação de perfis eletroforéticos que promovem a chamada impressão digital do organismo (*fingerprint*). Esta metodologia tem sido

empregada no estudo da diversidade intra-específica de rizóbio, fazendo a distinção de estirpes muito proximamente relacionadas (FERNANDES, FERNANDES e HUNGRIA, 2003; CHUEIRE et al., 2000).

Diversos estudos têm empregado e destacado uma abordagem polifásica de caracterização e identificação de rizóbios, avaliando tanto as características culturais e bioquímicas como as características moleculares, integrando técnicas que até poucos anos eram consideradas divergentes (GEVERS et al. 2005; GUEDES et al., 2008).

Este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade e a filogenia bactérias diazotróficas obtidas através da inoculação em plantas-isca de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) com solos coletados em cinco municípios do nordeste brasileiro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostragem**

Amostras de solo compostas foram coletadas em março de 2010 em cinco municípios de três Estados do nordeste do Brasil (Anexo II): 1) Gravatá (8°16'S), Itambé (7°24'S) e Serra Talhada (7°55'48°36'S) em Pernambuco; 2) Crato (7°12'28°80'S) no Ceará e 3) Mossoró (5°12'31°68'S) no Rio Grande do Norte.

Após a coleta, 100 g do solo foram mantidas em refrigeração até sua utilização como inóculo das plantas-isca de sabiá para a obtenção de rizóbios nativos em casa de vegetação. Além disto, uma amostra de solo de cada região estudada foi submetida a análise de fertilidade no laboratório de Fertilidade do Solo da UFRPE (Tabela 1) segundo Barreto, Paula e Duarte (1997).

**Tabela 1:** Caracterização química dos solos de Crato, Gravatá, Itambé, Mossoró e Serra Talhada.

Solo	pH (água-1:2,5)	P (mg.dm <sup>3</sup> )	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup> Mg <sup>+2</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Al <sup>+3</sup>	H+Al	CO	MO
			----- (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>3</sup> ) -----							
Crato	5,13	7	0,03	0,40	15,00	11,5	0,10	5,50	12,46	21,47
Gravatá	4,41	8	0,02	0,15	2,75	1,35	1,15	8,86	17,62	30,38
Itambé	4,69	7	0,04	0,28	7,26	4,00	0,75	9,68	29,15	50,28
Mossoró	6,15	10	0,04	0,25	7,25	4,05	0,00	3,95	5,77	9,95
Serra Talhada	5,56	6	0,02	0,56	6,80	3,80	0,00	5,22	7,59	13,09

### Obtenção de rizóbios nativos

Sementes de sabiá foram desinfestadas com hipoclorito a 2% por 2 min e posteriormente lavadas duas vezes em água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram escarificadas por 10 min em água a 70°C e colocadas para germinar em bandeja com areia lavada autoclavada. As sementes foram mantidas sob iluminação artificial e umedecidas com água autoclavada até que as plântulas fossem transplantadas para casa de vegetação.

Para a infecção das plântulas foram usados vasos de Leonard contendo uma mistura de areia lavada e vermiculita na proporção de 1:2 (v:v), com solução nutritiva de Hoagland sem N a 0,1% de concentração (HOAGLAND e ARNON, 1950). Os conjuntos foram autoclavados a 120°C e 1 atm por uma hora.

As plântulas de sabiá com 20 dias após a germinação (DAG) foram transplantadas para os vasos de Leonard e inoculadas adicionando-se 5 g do solo refrigerado. Foram utilizadas 10 repetições para cada localidade e cinco repetições do controle negativo, sem inoculação com o solo. Aos 60 DAG foi realizada a coleta dos nódulos e colocados em tubos de polipropileno estéreis de 50 ml, contendo sílica gel e armazenados até o isolamento.

## **Isolamento e caracterização cultural dos rizóbios**

Os nódulos secos foram hidratados com água estéril durante 12 horas e o isolamento foi realizado usando a metodologia padrão, conforme descrita por Hungria (1994). Primeiramente os nódulos foram esterilizados com álcool 100% durante 30 s (surfactante), depois 2 min. em hipoclorito de sódio a 5% e lavados com água destilada estéril até retirar todo o odor do hipoclorito. Cada nódulo foi rolado em 1/3 da placa de petri com meio YMA (VINCENT, 1970) com vermelho congo e depois macerado em placa de petri estéril e repicado nos outros 2/3 da placa que foram posteriormente mantidas em câmara BOD a 28°C até aparecimento das colônias. Foram realizadas três purificações de cada isolado em meio YMA com azul de bromotimol até obtenção da colônia pura. Neste meio foi observada a capacidade de alcalinização e acidificação de cada isolado. Também foram observadas as características culturais de cada isolado como: tempo necessário para o aparecimento de uma colônia; pH do meio após o crescimento celular; tamanho, forma, borda, aparência e transparência da colônia; coloração; elevação; quantidade e elasticidade do muco produzido pelas células.

## **Extração de DNA e PCR**

Para a extração do DNA genômico, as bactérias foram cultivadas em 5,0 mL de meio de cultura TY líquido (BERINGER, 1974) e incubadas a 28°C, em agitador tipo *shaker*, sob agitação de 200 rpm durante 24h. Uma alíquota de 1,0 mL da suspensão de células foi transferida para tubos de polipropileno de 1,5 mL, sendo centrifugados por 3 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi utilizado para extração do DNA utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), conforme recomendação do fabricante. Após a extração, a pureza e integridade do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. As amostras de DNA foram diluídas com água ultrapura autoclavada, a 1:100 (30 a 50 ng) e em seguida armazenadas a -20°C.

Para amplificação dos elementos rep-PCR foram utilizados os oligonucleotídeos REP-1 (5'-III CGI CGI CAT CIG GC-3') e REP-2 (5'-ICG ICT ATC IGG CCT AC-3'), ERIC-1(5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') e ERIC-2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'), BOX-A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC CGC TGA CG-3'). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10 µL usando: 5,0 µl de GoTaq Colorless Master Mix (Promega), 0,4 mM do *primer*, 2 µL de água ultrapura autoclavada e 100 ng do DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador Biometra® com as seguintes condições: um ciclo de desnaturação a 95°C por 7 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C (BOX e REP) e 30 (ERIC) por 1 min, anelamento 55°C (BOX), 52°C (ERIC) e 40°C (REP) a 1 min, extensão a 65°C por 8 min e um ciclo de extensão final de 16 min a 72°C.

Os produtos finais das reações foram analisados por eletroforese em géis de agarose 1,5%, em tampão Tris-borato-EDTA / TBE 0,5X, a 90 Volts, corado com 1,25 µL de SYBR Green, e 2,5 µL de azul de bromofenol, com determinação do tamanho do produto utilizando o marcador molecular de 1 Kb (Promega) e a visualização e documentação das amplificações foram realizadas em fotodocumentador LPIX-HE usando o programa "LabImagem 1D" da Locus Biotecnologia.

Para amplificação do gene 16S DNAr usando a técnica de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') (WEISBURG et al., 1991). As reações de amplificação do 16S foram realizadas em um volume final de 25 µL usando: 12,5 µl de GoTaq Colorless Master Mix (Promega), 1,0 µM do *primer* fD1, 1,0 µM do *primer* rD1, 8,5 µL de água ultrapura autoclavada e 2,0 µL do DNA diluído. As amplificações foram realizadas em termociclador Biometra® programado para as seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 2 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final de 10 min a 72°C. Uma alíquota de 5,0 µL produto final da PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, a 100 Volts, em tampão Tris-borato-EDTA / TBE 0,5X corado com 1,25 µL de SYBR Green, e 2,5 µL de azul de bromofenol. Os tamanhos dos produtos de PCR foram determinados utilizando o marcador molecular de 1 Kb (Promega). Os géis foram documentados em

fotodocumentador LPIX-HE usando o programa “LabImagem 1D” da Locus Biotecnologia.

### **Purificação dos amplicons, sequenciamento de DNA**

Como preparação para a reação de sequenciamento da região 16S, foi realizada uma etapa de purificação; na qual foi adicionado 52 µL de etanol 100% e 3 µL de acetato de amônia 7,5 M em um volume final 20 µL do produto amplificado. A amostra foi homogeneizada em vortex por 30 s e levada a centrifugação por 20 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 150 µl de etanol 70% com posterior centrifugação por 5 min a 13.000 rpm. As amostras foram secas a temperatura ambiente por aproximadamente 40 min e em seguida ressuspensas em 20 µL ultrapura autoclavada, sendo armazenadas a 4°C por 1h e posteriormente a -20°C até o envio para sequenciamento no Laboratorio de Sequenciamento da Macrogen na Coréia do Sul. O sequenciamento foi realizado usando o sequenciador automático Applied Biosystems 3730XL DNA analyzer (96 capilares). A reação de sequenciamento foi realizada em um termociclador MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler usando o kit de sequenciamento Big Dye TM Terminator Cycle com a Polimerase DNA AmpliTaq (FS enzyme) da Applied Biosystems realizado de acordo com o fabricante. Os fragmentos foram marcados por fluorescência, purificados com um terminador não incorporado usando o protocolo de precipitação com etanol. As amostras foram ressuspensas em água destilada e injetada para eletroforese no sequenciador.

## **ANÁLISES**

### **Características morfofisiológicas e elementos BOX, ERIC e REP**

As características morfofisiológicas foram transformadas em uma matriz binária bidimensional com ausência (0) e presença (1) para as características observadas (Tabela 2).

**Tabela:** Valores relativos as características culturais dos isolados utilizados na construção do dendrograma de similaridade.

Características Culturais	Intervalo de Observação	Valores atribuídos para a construção do dendrograma
Tempo de aparecimento da colônia	22 a 44 h	>22h = 0/< 22h = 1
pH	22 a 44 h	Ácido = 0/Alcalino = 1
Tamanho	22 a 44 h	≤ 1mm = 0/> 1mm = 1
Forma da colônia	22 a 44 h	Circular = 0/Irregular = 1
Borda	22 a 44 h	Lisa = 1/Irregular = 0
Aparência	22 a 44 h	Homogenea = 1/Heterogênea = 0;
Transparência	22 a 44 h	Opaca, transparente = 0/Translúcida = 1
Cor	22 a 44 h	Amarela, creme e branca = 1/Indeterminado = 0
Elevação	22 a 44 h	Achatada = 1/Cúpula = 0
Muco	22 a 44 h	Ausente, pouco = 0/Intermediário, muito = 1
Elasticidade do muco	22 a 44 h	Ausente = 0/Presente = 1

Os perfis de bandas no gel foram transformados em uma matriz binária bidimensional, de ausência/presença. O agrupamento foi realizado pelo programa NTSYS-pc 2.1 usando o algoritmo UPGMA. A matriz foi computada pela similaridade dos dados quantitativos (SIMQUAL) (SOKAL e SNEATH, 1963), com algoritmo de agrupamento SAHN – Sequential agglomerative hierarchical nested cluster analysis, para elaboração da árvore filogenética e a formação do gráfico (SNEATH e SOKAL, 1973). O algoritmo usado para converter a árvore matriz em um dendrograma foi o Tree Plot (ROHLF, 1975) e o coeficiente de Simple Matching (SM) para os perfis dos elementos rep-PCR e coeficiente de Jaccard (J) para as características morfofisiológicas foram usados, visto que são úteis para valores binários realizados para informações de igualdade (simetria).

## 16S DNAr

A análise para verificar a qualidade das sequências do gene 16S DNAr geradas foi realizada pelo programa Chromas v. 2.33. Todas as sequências dos isolados foram alinhadas juntamente com as sequências de referência obtidas no NCBI realizada pelo programa BioEdit v.7.0.9.0 usando o programa ClustalW. A matriz foi convertida pelo programa de Análise Genética de Evolução Molecular MEGA v.4.1 (Beta) e as sequências nucleotídicas foram analisadas pelo código genético padrão. A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo “Jukes-Cantor” (JUKES e CANTOR, 1969) e o método de

construção de filogramas foi o “Neighbor-Joining” (NJ) (SAITOU e NEI, 1987), usando-se o teste de filogenia Bootstrap com 1000 repetições e deleção *pairwise*.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Caracterização morfofisiológica dos isolados**

Foram obtidos 47 isolados, sendo 10 de Gravatá, 10 de Serra Talhada, e 9 de cada um dos demais municípios. Todos os isolados receberam o código PE seguidos por letras de identificação do município e um número para diferenciar os acessos do mesmo município.

Todos os isolados apresentaram crescimento rápido (Apêndice II). Mesmo sendo observado o crescimento rápido em todos os isolados 51% apresentaram reação alcalina. A predominância de bactérias de crescimento rápido também foi relatada por Leite et al. (2009), Silva et al. (2007) e Medeiros et al. (2009) em seus estudos utilizando isolados de bactérias nodulíferas em feijão caupi, porém, todos os isolados estudados por estes autores que apresentavam crescimento rápido também acidificavam o meio, diferentemente de nossos resultados. O crescimento rápido de bactérias é mais comum em regiões áridas e segundo Santos et al. (2007), esta característica constitui uma estratégia de sobrevivência, já que são mais tolerantes à seca do que os de crescimento lento e se multiplicam rapidamente em curto espaço de tempo úmido, o que explicaria sua maior frequência nos solos desta região. A alcalinização do meio por isolados apresentando crescimento rápido é uma característica cultural dita como não usual para os isolados tradicionais de rizóbios, no entanto espécies com tal característica foram agrupadas por Lima (2009) dentro da subclasse  $\beta$ -proteobactérias através do 16S DNAr.

O isolado PE-IT05 apresentou o maior tamanho de colônia com 2,57 mm, enquanto o isolado PE-ST03 apresentou o menor, medindo 0,80 mm. Forma irregular na colônia foi observada em 42% dos isolados, enquanto 100% dos isolados apresentaram bordas lisas e uma aparência homogênea,

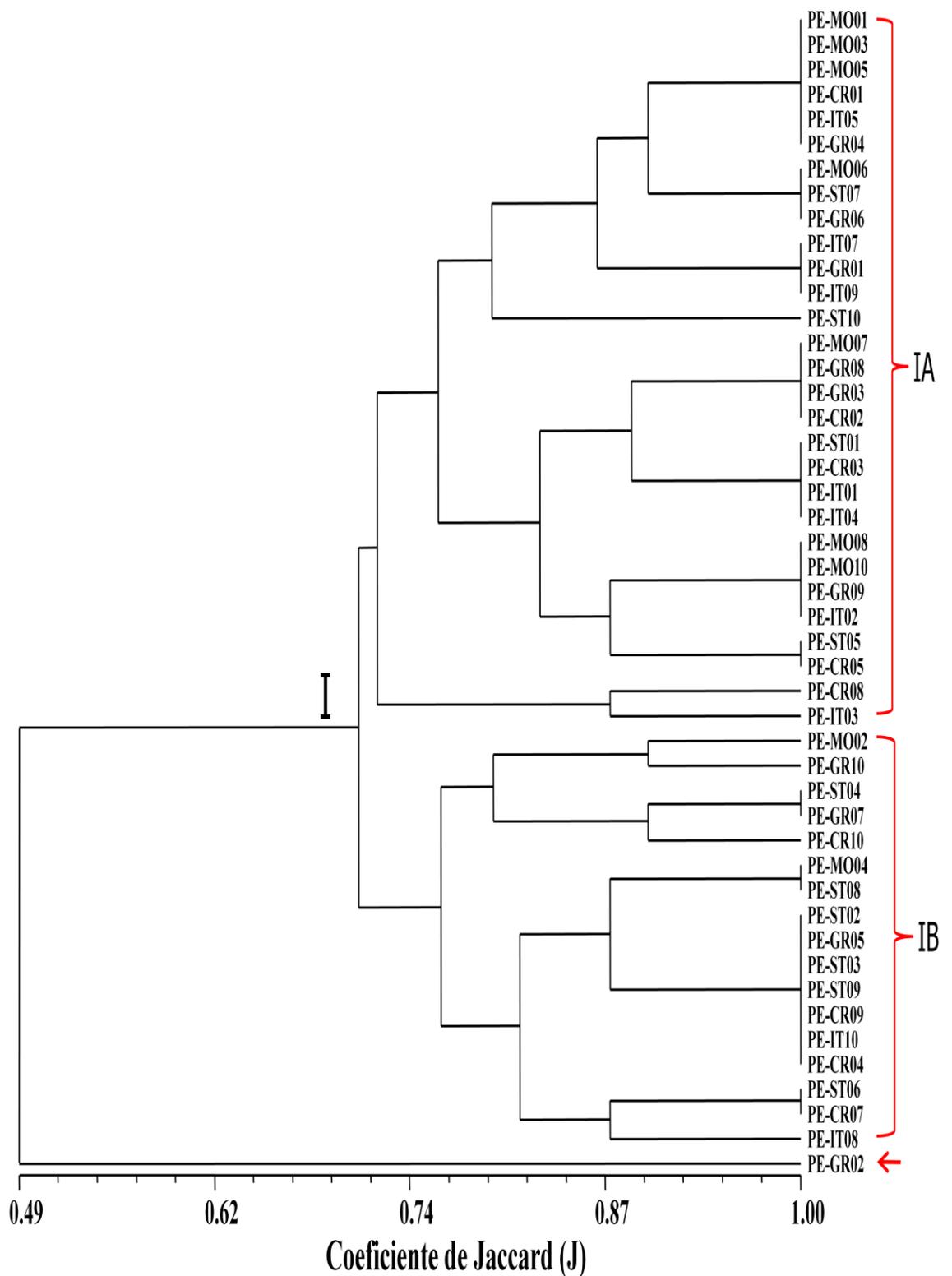
concordando com Martins et al (1997) que afirmaram que estirpes de rizóbio independente da forma da colônia, possuem a borda lisa ou inteira.

O isolado PE-GR02 foi o único que apresentou colônia transparente e os isolados PE-IT03, PE-MO10 e PE-CR08 apresentaram colônias translúcidas. Os demais apresentaram colônias opacas. Em relação à coloração, aproximadamente 76% dos isolados apresentaram colônia creme, 19% apresentaram colônia branca. O isolado PE-IT03 apresentou coloração amarela e o isolado PE-GR02 não apresentou coloração determinada.

Os isolados PE-GR01, PE-GR02, PE-IT07 e PE-IT09, apresentaram colônias com elevação cúpula com os demais apresentando elevação achatada. A formação de muco foi observada em todos os isolados, exceto o PE-GR02, no entanto foi constatada a formação de fio apenas no isolados PE-CR10 e PE-ST04. Segundo Hollingsworth et al.(1985), produção de muco tem importante função na ecologia dos isolados, uma vez que a produção de muco tem sido correlacionada com a adaptação a fatores edáficos e ambientais, como elevadas temperaturas, elevada concentração de alumínio trocável e longos períodos de seca. Sinclair e Eaglesham (1984), concluíram que estirpes com alta produção de muco foram mais eficientes em fixar nitrogênio atmosférico que aquelas que produziam colônias secas sob condições salinas, uma vez que essa alta produção da mucosidade pode representar uma forma de proteção da bactéria aos estresses ocorridos.

O dendrograma morfofisiológico (Figura 1) é formado pelo agrupamento I que se divide nos subgrupos IA e IB a uma distância de 70% de similaridade morfofisiológica e uma rama monofilética com o isolado PE-GR02, comportando como grupo externo. Esta bactéria mostrou algumas características culturais bem diferentes nos seguintes parâmetros: cor indefinida, transparência translúcida, elevação cúpula e ausente de muco, ou seja, seca. No subgrupo IA, estão 29 dos isolados estudados. Sete subgrupos de similaridade com 100% foram formados e apenas o isolado PE-ST10 com similaridade de 74% em rama monofilética. Entretanto entre os sete subgrupos do IA, a similaridade genética variou de 76% a 87%, mostrando que possuem o mesmo ancestral. No grupo IB, 4 subgrupos foram formados onde estão representados isolados das cinco localidades. Neste grupo, os isolados PE-ST04 e PE-GR07 apresentaram uma similaridade de 100%, assim como os

isolados PE-MO04 e PE-ST08, e similaridade de 87% e também apresentaram similaridade 100% os isolados: PE-ST02, PE-GR05, PE-ST03, PE-ST09, PE-CR09, PE-IT10 e PE-CR04, e os isolados PE-ST06 e PE-CR07, mas ambos os grupos com similaridade de 87%. Apesar de apresentar dois grupos, os isolados formaram grupos com uma similaridade de 100% o que não é observado nestes isolados quando usamos marcadores moleculares que diferencia mais estes micro-organismos o que vem a confirmar com Hameed et al, (2004) que observaram que o estudo das características fisiológicas e morfológicas revela uma diversidade bastante ampla nos isolados de rizóbio, porém, deve estar relacionado com estudos de DNA.



**Figura 1:** Dendrograma das características morfofisiológica dos 47 isolados bacterianos oriundos da cultura do sabiá usando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

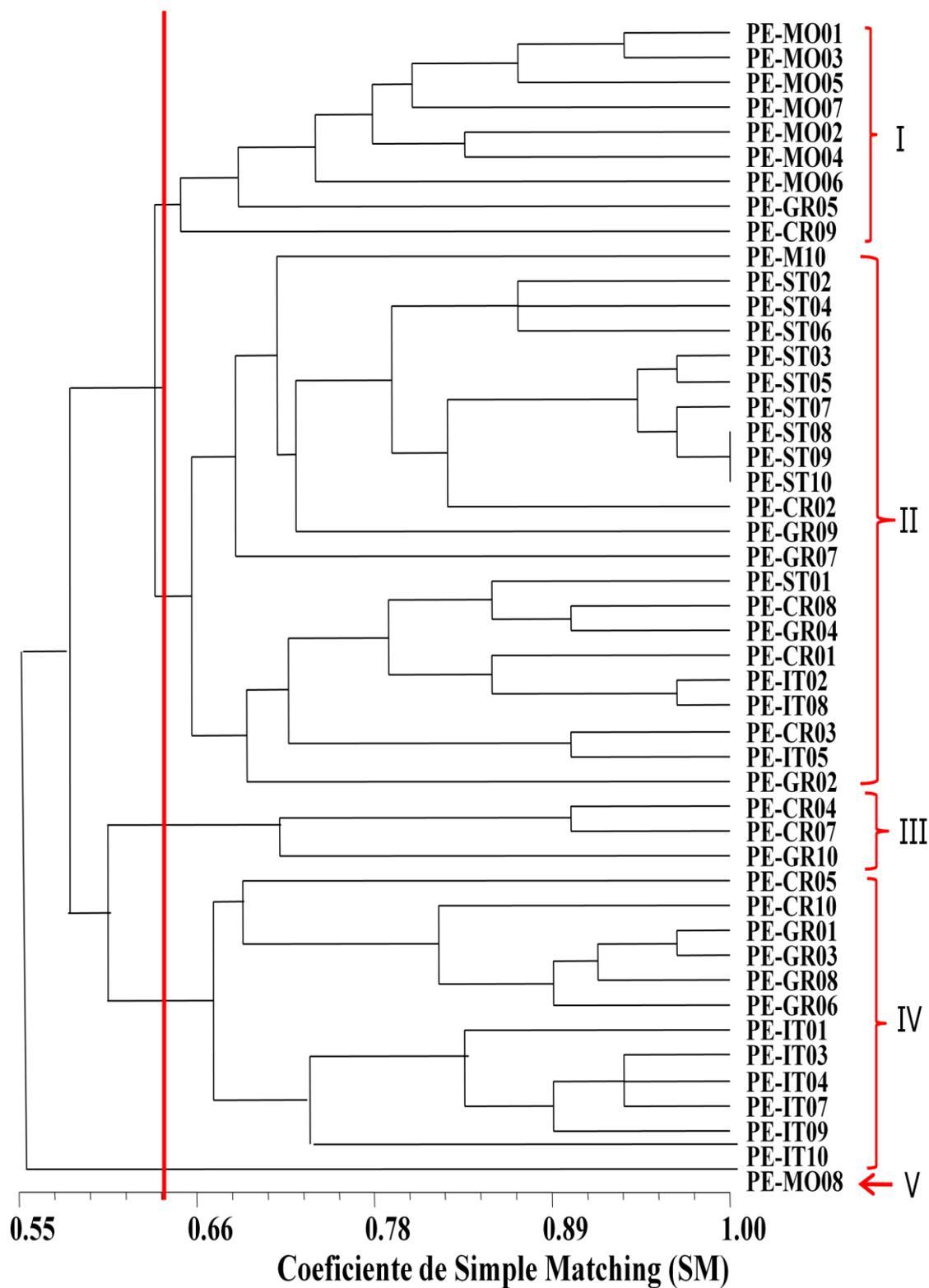
## ***Fingerprint (REP, ERIC e BOX PCR)***

No *fingerprint* utilizando os elementos BOX, ERIC e REP foram obtidos perfis complexos com múltiplas bandas (Apêndice II). Os resultados obtidos na eletroforese foram convertidos em matriz binária gerando quatro dendrogramas pelo Algoritmo UPGMA usando o coeficiente de Simple Matching (SM). Dos quatro dendrogramas formados, três são referentes aos marcadores BOX, ERIC e REP separadamente e um formado pela compilação dos resultados.

Em todos os dendrogramas obtidos pela metodologia rep-PCR foram admitidas similaridades genéticas a partir de 63% de acordo com Antunes (2010), que estudou a diversidade genética de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava.

Analisando-se o dendrograma formado pelos *primers* REP (Figura 2) observou-se a geração de até 30 bandas, com peso molecular variando de 5000 a 100 pb. Os isolados formaram quatro grupos e uma rama monofilética, com o isolado PE-MO08 que aparece no dendrograma morfofisiológico como um isolado com similaridade aos isolados PE-MO10, PE-GR09 e PE-IT02. Apesar do isolado PE-GR02 estar agrupado no segundo grupo com o marcador REP, mostra-se também como rama monofilética com 79% de similaridade em relação a seis isolados oriundos de Serra Talhada (ST03, ST05, ST07, ST08, ST09 e ST10). O grupo I apresenta similaridade variando entre 63 a 93% e é formado por 09 isolados, sendo 07 isolados PE-MO, 01 isolado PE-GR e 01 isolado PE-CR, com alta diversidade genética entre todos os isolados, sendo a maior similaridade genética de aproximadamente 93% entre os isolados PE-MO01 e PE-MO03. O grupo II é formado por 22 isolados, sendo 01 isolado IPA-PE-MO, 10 isolados PE-ST, 04 isolados PE-CR, 04 isolados PE-GR e 03 isolados PE-IT com distância variando de 66 a 100% de similaridade genética entre os isolados do grupo. Todos os isolados de Serra Talhada estão posicionados no grupo II, com os isolados PE-ST08, PE-ST09 e PE-ST10 apresentando similaridade de 100%. Com distância genética de aproximadamente 97% a este grupo, destacam-se os outros isolados de Serra Talhada: ST03, ST05 e ST07. O grupo III foi formado pelos isolados PE-CR04 e PE-CR07 que apresentam similaridade de 90%; e a uma distância genética de 68% destes isolados posiciona-se o isolado PE-GR10. O grupo IV é

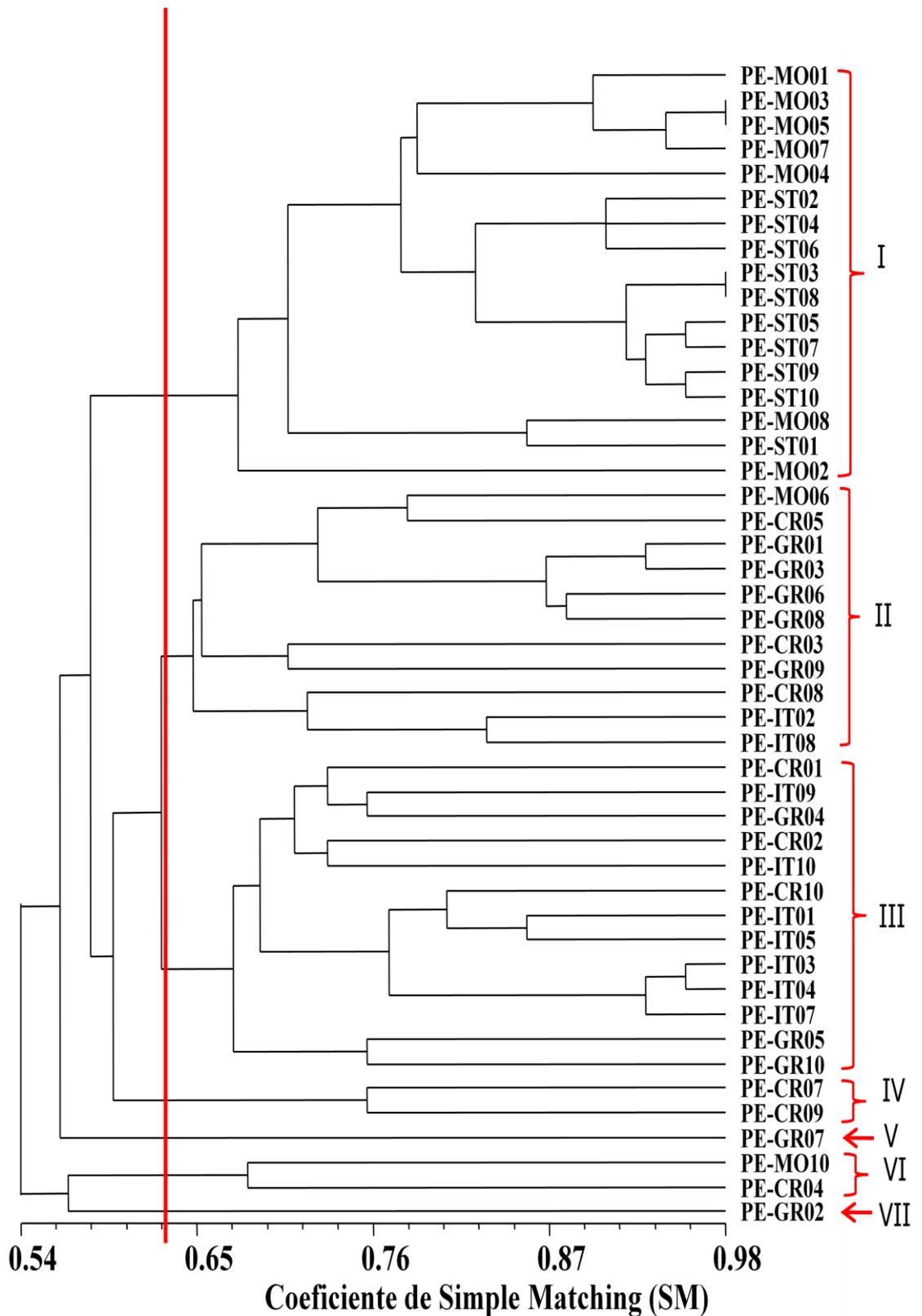
formado por 12 isolados, sendo 02 isolados PE-CR, 04 isolados PE-GR e 06 isolados PE-IT. Os 06 isolados de Itambé formam um subgrupo com distância genética variando entre aproximadamente 73 a 94% e os isolados PE-GR01 e PE-GR03 apresentaram a maior similaridade genética dentro do grupo com 96%.



**Figura 2:** Dendrograma dos perfis dos produtos obtidos na análise de REP-PCR dos 47 isolados bacterianos oriundos da cultura do sabiá em cinco municípios nordestinos usando o UPGMA e coeficiente de Simple Matching (SM).

Utilizando-se os oligonucleotídeos ERIC-1 e ERIC-2 (Figura 3), observou-se a geração de até 41 bandas, com peso molecular variando de 4000 a 150 pb, confirmando o alto poder discriminatório deste elemento como sugerido por Rademaker e De Bruijn (1996). No dendrograma formado por esses oligonucleotídeos, verifica-se a formação de cinco grupos e duas ramas monofiléticas com os isolados PE-GR07 (V) e PE-GR02 (VII), mostrando mais uma vez que este isolado é bem divergente aos demais. O grupo I é formado apenas por isolados PE-MO e PE-ST, sendo dos 17 componentes do grupo, 07 isolados PE-MO e 10 isolados PE-ST. No grupo I, os isolados PE-MO03 e PE-MO05 são idênticos geneticamente com este marcador. Todos os isolados de Serra Talhada estão posicionados no grupo I e formam um subgrupo com distância genética variando de 83% até similaridade de 100% entre os isolados PE-ST03 e PE-ST08. O posicionamento em um mesmo grupo dos isolados de Serra Talhada também foi observado no dendrograma do marcador REP

O grupo II é formado por 11 isolados, sendo 01 isolado PE-MO, 02 isolados PE-IT, 03 isolados PE-CR e 05 isolados PE-GR. A maior similaridade dentro do grupo é de 93% entre os isolados PE-GR01 e PE-GR03. O grupo III é composto por 13 isolados, sendo 03 isolados PE-CR, 03 isolados PE-GR e 07 isolados PE-IT. A maior similaridade dentro do grupo é de 96% entre os isolados PE-IT03 e PE-IT04, seguidos pelo isolado PE-IT07 com similaridade de 93% em relação a estes dois isolados. O grupo IV reuniu os isolados PE-CR07 e PE-CR09 que apresentaram 76% de similaridade e o VI é composto pelos isolados PE-MO10 e PE-CR04 que apresentam similaridade genética de 68%.

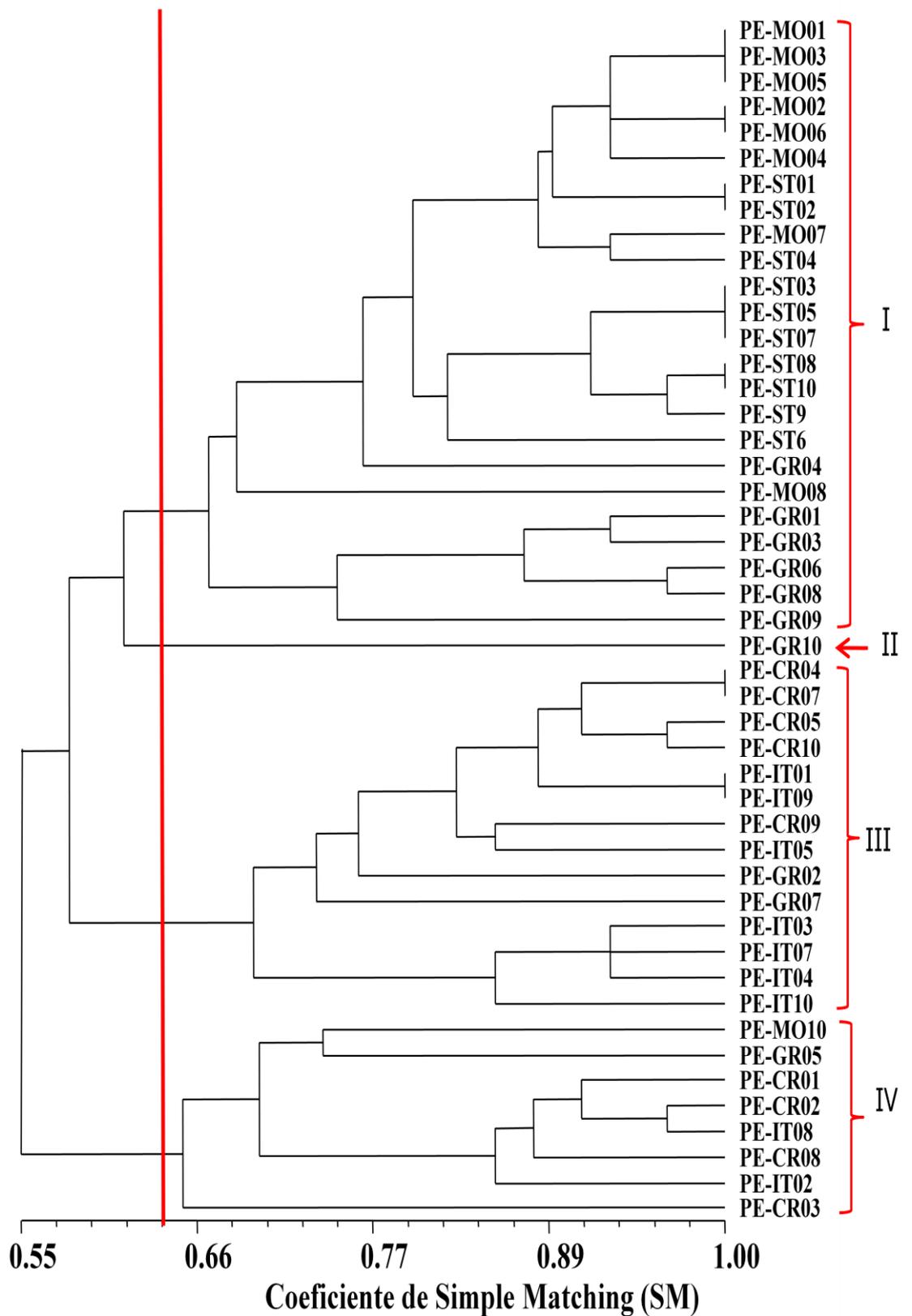


**Figura 3:** Dendrograma dos perfis dos produtos obtidos na análise de ERIC-PCR dos 47 isolados bacterianos oriundos da cultura do sabiá em cinco municípios nordestinos usando o UPGMA e coeficiente de Simple Matching (SM).

Nas análises com BOX-PCR usando o oligonucleotídeo BOX-A1R (Figura 4) houve a geração de até 27 bandas, com peso molecular variando de 5000 a 200 pb. Este resultado contradiz o resultado esperado por Hungria et al. (2008) e Menna et al. (2009) que indicaram a análise com o elemento BOX como resultando em perfis com maior número de bandas, enquanto nos nossos estudos este elemento foi responsável pelo menor número de padrões observados entre os três marcadores para os 47 isolados.

No dendrograma formado pela análise do elemento BOX foram formados três grupos (I, III e IV) e uma rama monofilética com o isolado PE-GR10 (II). O grupo I é composto por 24 isolados sendo 08 isolados PE-MO, 06 isolados PE-GR e 10 isolados PE-ST. O grupo I da análise com o marcador BOX é o maior grupo formado quando comparado aos grupos obtidos pelos marcadores REP e ERIC. Neste grupo, assim como nos dendrogramas dos marcadores REP e ERIC, observa-se o posicionamento de todos os isolados de Serra Talhada em um mesmo grupo, com os isolados PE-ST01 e PE-ST02; PE-ST03, PE-ST05 e PE-ST07; PE-ST08 e PE-ST10 formando sub-grupos com 100% de similaridade. Também é observada no grupo I, uma similaridade de 100% entre os isolados de Mossoró: MO01, MO03 e MO05; MO05 e MO02.

Ainda no grupo I, observamos altas similaridades entre os isolados PE-GR06 e PE-GR08 (96%) e entre os isolados PE-MO07 e PE-ST04; PE-GR06 e PE-GR08 (93% respectivamente). O grupo III é formado por 14 isolados, sendo 02 isolados PE-GR, 05 isolados PE-CR e 07 isolados PE-IT. Os isolados PE-CR04 e PE-CR07 apresentam similaridade de 100%, assim como os isolados PE-IT01 e PE-IT09. Ainda no grupo III, os isolados PE-CR05 e PE-CR10 apresentam similaridade de aproximadamente 96%. O grupo IV foi formado por 08 isolados sendo 01 isolado PE-MO, 01 isolado PE-GR, 02 isolados PE-IT e 04 isolados PE-CR. A maior similaridade do grupo IV é de aproximadamente 97% observada entre os isolados PE-CR02 e PE-IT08.



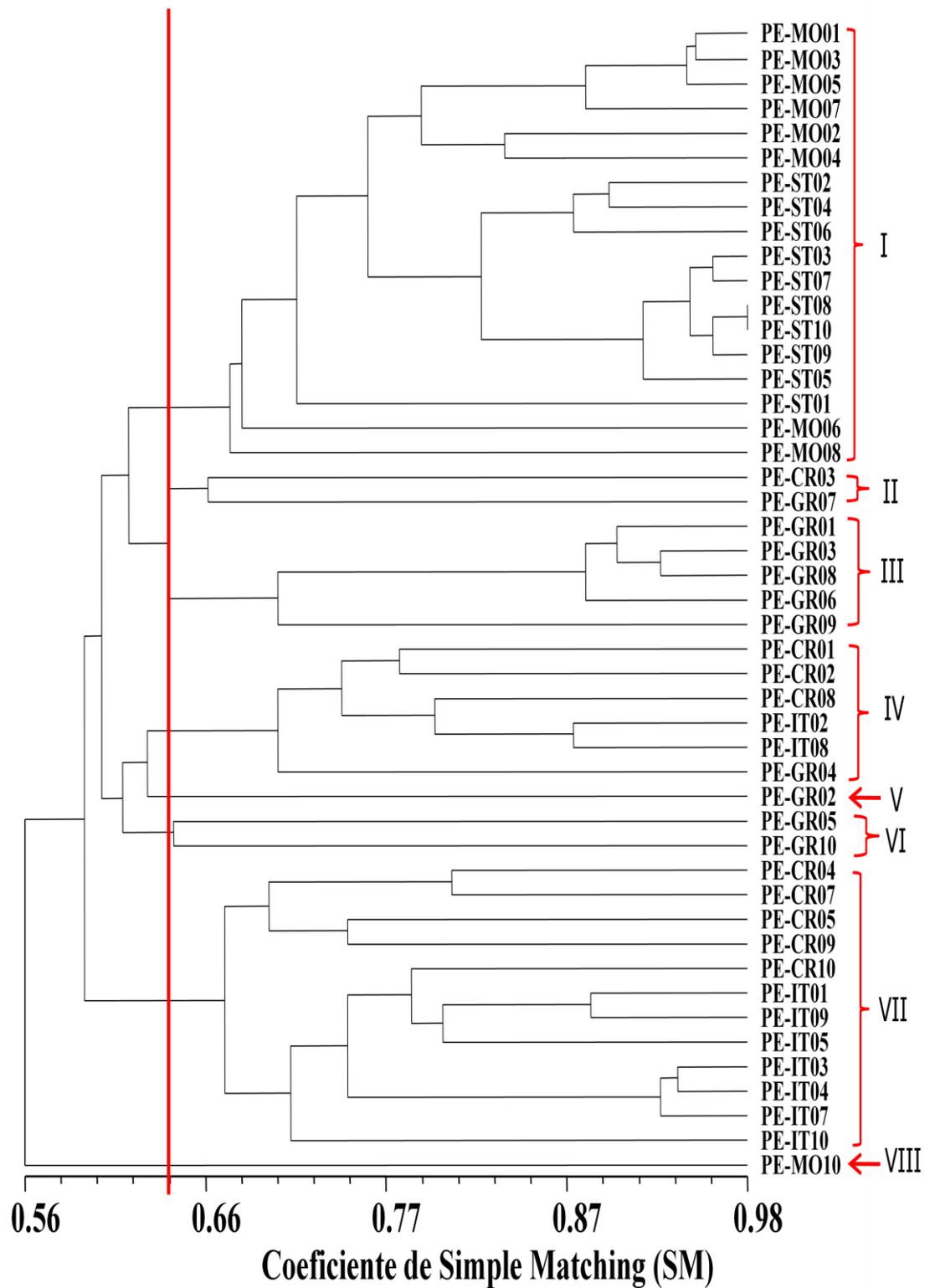
**Figura 4:** Dendrograma dos perfis dos produtos obtidos na análise de BOX-PCR dos 47 isolados bacterianos oriundos da cultura do sabiá em cinco municípios nordestinos usando o UPGMA e coeficiente de Simple Matching (SM).

A aplicação dos três elementos a uma mesma amostra aumenta o poder de discriminação como observado por Hungria et al. (2008), Albino et al. (2006) e Torres et al. (2008) estudando a diversidade genética de bactérias diazotróficas. Por isso os resultados das amplificações com os marcadores REP, ERIC e BOX foram agrupados em um dendrograma compilado.

O dendrograma compilado (Figura 5) formou seis grupos e duas ramas monofiléticas com os isolados PE-GR02 e PE-MO10. O grupo I do dendrograma é formado por 18 isolados, incluindo todos os de Serra Talhada, e oito dos isolados de Itambé. A presença de todos os isolados de Serra Talhada no mesmo grupo também observou-se no dendrograma compilado. Os isolados PE-ST08 e PE-ST10 apresentaram similaridade de 100% e em relação a estes isolados, o PE-ST09 apresentou distância genética de 96%. Similaridade genética de 96% também foi observada entre os isolados PE-ST03 e PE-ST07. Os demais isolados do grupo I apresentaram similaridade variando entre 67 e 94%.

O grupo II formou-se pelos isolados PE-CR03 e PE-GR07 que apresentou similaridade de 68%. O grupo III ficou formado por cinco isolados PE-GR com distância genética variando entre 70 a 92%. Agruparam-se no grupo IV 01 isolado PE-GR, 02 isolados PE-IT e 03 isolados PE-CR, com distância genética variando entre 70 a 88% e com a maior similaridade sendo observada entre os isolados PE-IT02 e PE-IT08. Os isolados PE-GR05 e PE-GR10 formaram o grupo VI e apresentaram similaridade de 64%. No grupo VII estão posicionados apenas isolados do Crato e Itambé, 05 isolados CR e 07 IT, mesmo com distância de aproximadamente 470 km entre os pontos de coleta. A maior similaridade genética do grupo é de 94% entre os isolados PE-IT03 e PE-IT04. Os demais isolados apresentam distância genética variando entre 67% e 94%.

Nos estudos de Grange e Hungria (2004); Kaschuk et al. (2006) e Grange et al. (2007), o polimorfismo de perfis de DNA obtidos por rep-PCR demonstraram grande aplicabilidade para a identificação de estirpes de rizóbios e segundo Rademaker et al. (2000), a combinação de resultados dos marcadores REP, ERIC e BOX é evidentemente mais significativo em relação aos dendrogramas separados e apresentam maior consistência uma vez que o número de amplicons analisados aumenta consideravelmente.



**Figura 5:** Dendrograma compilado dos 47 isolados bacterianos oriundos da cultura do sabiá em cinco municípios nordestinos usando o UPGMA e coeficiente de Simple Matching (SM).

## Sequenciamento do gene 16S DNAr

A PCR do 16S DNAr dos 47 isolados bacterianos produziu fragmentos de bandas em torno de 1,5Kb (Apêndice II) que correspondeu ao tamanho esperado em trabalhos reportados previamente por Weisburg et al. (1991) e Terefework et al. (1998) e serviu para elucidar as posições taxonômicas dos isolados. Estes fragmentos foram purificados e sequenciados e após verificação da qualidade das sequências foram comparadas no GenBank através do programa BLAST, conforme Quadro 1. Por terem obtidos reações de sequenciamento não satisfatórias, os isolados PE-MO05, PE-ST05 e PE-GR10 não estão presentes na árvore filogenética.

O agrupamento dos isolados na árvore filogenética baseada no 16S DNAr (Figura 6) está de acordo com os grupos formados pelo dendrograma compilado dos marcadores BOX, ERIC e REP. No entanto, o mesmo não ocorre com o dendrograma das características morfofisiológicas e os resultados são bem diferentes no caso dos grupos de isolados da região de Gravatá, Itambé, Crato e Serra Talhada. Apenas o grupo de Mossoró apresentou comportamento semelhante em relação as análises de 16S DNAr, *fingerprint* e morfofisiológicas, mostrando-se bastante diferentes uma das outras. Os isolados de uma forma geral apresentaram identidade variando entre 68 até 99% com estirpes do gênero *Burkholderia* e com sequências de clones de bactérias não cultivadas. As descrições de espécies de *Burkholderia* em associação simbiótica com leguminosas por Chen et al. (2003, 2005a,b), Barrett e Parker (2005, 2006) e Andam, Mondo e Paker (2007) alteraram a percepção da diversidade taxonômica de simbioses de leguminosas. O fato de todos os isolados apresentarem identidade com estirpes do gênero *Burkholderia* mesmo sendo oriundos de ambientes geograficamente distintos confirma os estudos de Bontemps et al. (2010), que identificaram *Burkholderia* como sendo o principal simbiote do gênero *Mimosa* no Brasil; e evidencia que o sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) associa-se preferencialmente com bactérias deste gênero como havia sido verificado por Menna et al. (2006) e Chen et al. (2008).

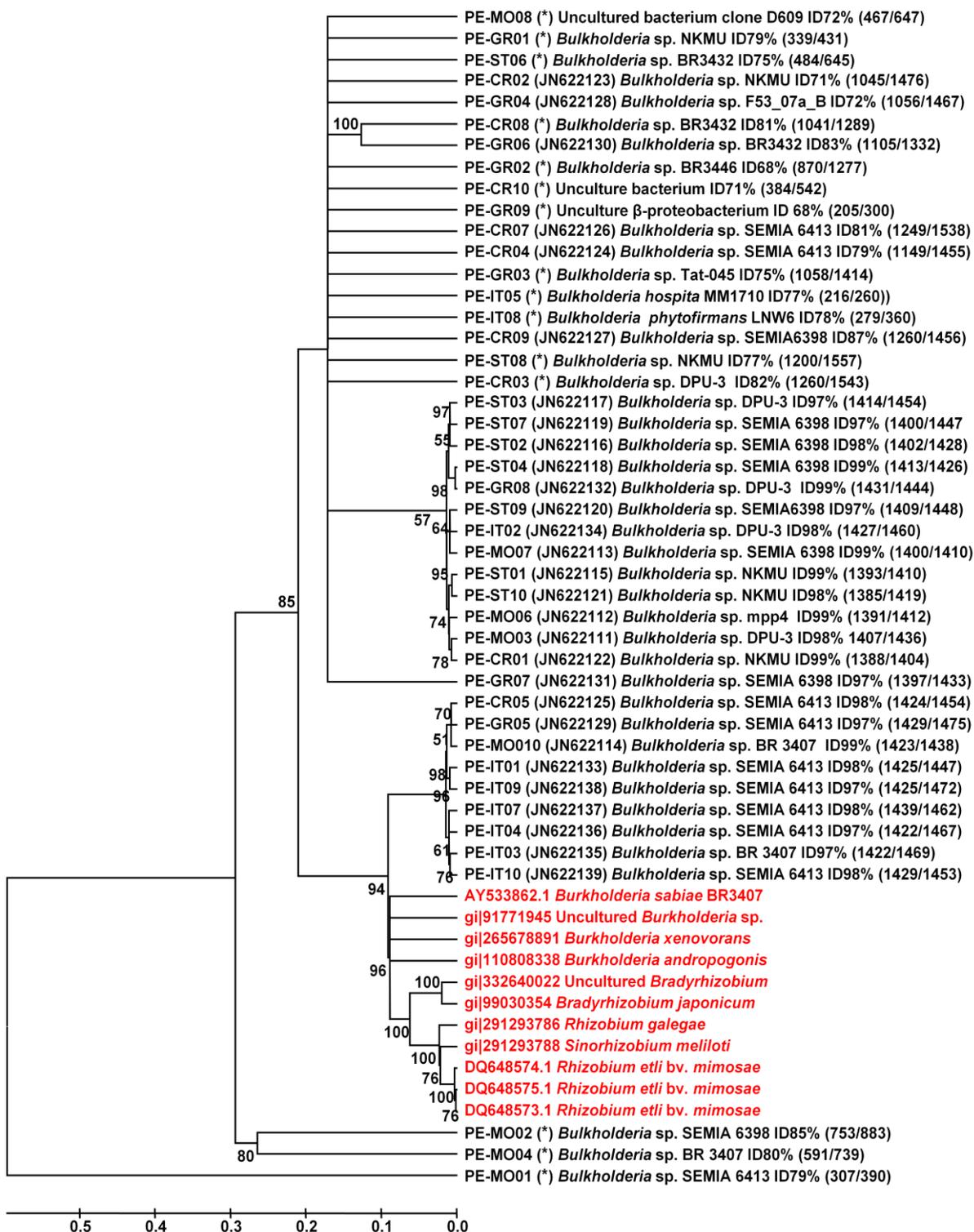
O alinhamento das sequências dos isolados mais as estirpes reconhecidas como *Burkholderia sabiae*, Unclutured *Burkholderia* sp. *B.*

*xenovarans*, *B. andropogonis*, Uncultured *Bradyrhizobium*, *B. japonicum*, *B. galegae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli* bv. *mimosae* oriundas do banco de dados de genes (GenBank- National Center for Biotechnology Information - NCBI) foram usadas para análise filogenética. Os resultados observados mostraram que apenas os isolados PE-MO10 e PE-IT03 estão representados por um dos gêneros acima citado. Estes nove representantes formaram um subgrupo a parte no grupo II, apresentando identidade variando entre 90 a 100%. Próximo ao grupo das estirpes está um subgrupo formado pelos 06 isolados de Itambé, onde IT01, IT09, IT07, IT04 e IT10 apresentaram identidades variando de 97 a 99% com *Burkholderia* sp. SEMIA 6413 e o isolado PE-IT03 com uma identidade de 97% com *Burkholderia* sp SEMIA 3407. Entretanto, o que observamos foi que este isolado apesar de ser do mesmo gênero tem diferenças nucleotídicas em relação a estirpe tipo usada neste estudo, já que as mesmas não se agruparam. Talvez em função de serem de origens distintas, já que a *B. sabiae* foi isolada no Rio de Janeiro e a *B. sp* em Taiwan. 5 dos 44 genótipos apresentaram 99% de identidade na sequência parcial com *Bulkholderia* sp. BR 3407 (PE-MO10), *Bulkholderia* sp.mpp4 (PE-MO06), *Bulkholderia* sp. NKMU (PE-ST01), *Bulkholderia* sp DPU-3 (PE-GR08) e *Bulkholderia* sp SEMIA 6398 (PE-ST04), enquanto que, os isolados PE-CR02, PE-CR03, PE-CR04, PE-CR08, PE-CR09, PE-GR03, PE-GR04, PE-GR06, PE-CR07 e PE-ST08 com identidade entre 71 e 87% mostraram-se membros novos do gênero *Bulkholderia* e todos estes isolados estão posicionados no grupo I. Vale ressaltar que os isolados PE-CR08 e PE-GR06 mostraram identidade com *Bulkholderia* sp. BR3432.

Ainda no grupo I, estão a maioria dos isolados de Serra Talhada que mostraram uma alta homologia que variou de 97 a 99% com estirpes SEMIA 6398, DPU-3 e NKMU (ST07, ST02, ST04, ST09, ST01 e ST10). De forma interessante, neste estudo, alguns isolados com genótipo de *Bulkholderia* mostraram alta similaridade com estirpes de *Bulkholderia* descritas como não originárias do Brasil. No estudo compilado com os marcadores REP, ERIC e BOX, estes isolados se encontram no mesmo grupo I com distâncias genéticas variando de 80% a 100%. Mas nas características morfofisiológicas, os isolados se mostraram bem diferentes e posicionados nos grupos IA e IB do dendrograma. Segundo alguns autores citados; até o momento, apenas sete

espécies de *Burkholderia* com capacidade de formar nódulos em associação simbiótica com leguminosas foram descritas: *Burkholderia tuberum* (VANDAMME et al., 2002), *B. phymatum* (VANDAMME et al., 2002), *B. caribensis* (CHEN et al., 2003), *B. cepacia* (RASOLOMAMPINANINA et al., 2005), *B. mimosarum* (CHEN et al., 2006), *B. nodosa* (CHEN et al., 2007) e *B. sabiae* (CHEN et al. 2008), e nenhuma das estudadas neste trabalho apresentaram homologia com estas espécies, portanto, há uma grande possibilidade da existência de novas espécies e/ou estirpes no grupo de isolados nativos oriundos da cultura do sabiazeiro. Resultados semelhantes foram descritos por autores como Chen et al. (2000), Sikora e Redzepovic (2003), Zilli et al. (2004), em que eles observaram que rizóbios isolados de diferentes regiões apresentavam elevada diversidade fenotípica e genética e que poderiam também representar novas espécies.

Martinez-Romero e Caballero-Mellado (1996) e Moreira, Haukka e Young (1998) relataram que é esperado que sob variadas condições ambientais ou de regiões geográficas muito distantes existam genótipos iguais ou sequências similares devido a natureza altamente conservada do gene 16S DNAr. No nosso estudo observamos que o gênero *Bulkholderia* está presente em todas as sequências estudadas com exceção dos isolados PE-IT05 (*B. hospita*) e PE-IT08 (*B. phytofirmans*) e dos isolados PE-MO08, PE-GR09 e PE-CR10 por apresentarem homologias baixas pelo número de nucleotídeos alinhados com bactérias não cultiváveis ou culturas de  $\beta$ -proteobactérias de gênero não especificado. Em função da distância geográfica dos isolados estudados podemos afirmar que são do gênero *Bulkholderia* porém de espécies novas. Embora a alopatria, ou seja, a ocorrência de organismos relacionados em áreas geográficas separadas sem sobreposição, e a recombinação não poderiam estar implicadas dentro e entre os genes ribossomais, alguns autores como Young e Haukka (1996) demonstraram que é possível que tenha ocorrido uma evolução divergente entre rizóbios de forma independente em vários locais e seria necessário profundo do núcleo deste genoma e de outros genomas rizobianos para revelar percepções ou insights bem importantes na evolução em rizóbios.



**Figura 6:** Árvore filogenética construída a partir do gene 16S DNAr dos isolados de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.), utilizando o método de Neighbor-Joining, com distâncias calculadas pelo método de Jukes-Cantor. O número de acesso dos isolados no NCBI encontra-se entre parêntesis. Os valores de cada rama representam as porcentagens de 1000 réplicas bootstrap. ID significa identidade do isolado em função da homologia encontrada no NCBI e tamanho do fragmento blastado que está entre parêntesis. \* O isolado será resequenciado.

## CONCLUSÕES

- As características morfofisiológicas foram bastante importantes para a separação de bactérias em um primeiro instante mas não foram suficientes para uma análise taxonômica confiável, visto que, com as análises genéticas usando os marcadores *fingerprint* demonstrou a variabilidade dos isolados apesar de pertencerem na sua maioria ao gênero *Bulkholderia*.
- O isolado PE-GR02 apresentou colônia transparente e total ausência de muco, características que o posicionou como um grupo externo no dendrograma morfofisiológico, no dendrograma compilado apresenta-se como uma rama monofilética dentro do grupo V e na árvore filogenética de 16S DNAr apresentou uma identidade de 68% em 870 pb com a *Bulkholderia* sp BR3446. Homologia baixa para dizer que seria desta espécie e sim, uma variante.
- O marcador ERIC foi mais polimórfico que os marcadores REP e BOX, entretanto, o dendrograma que compila os dados dos três marcadores gerou maior número de grupos.
- Todos os isolados estudados com exceção do MO08, CR10 e GR09 apresentaram uma homologia com o gênero *Bulkholderia* variando entre 68 a 99% de identidade em função do tamanho dos fragmentos.
- Os gêneros de *Bulkholderia* retirados do banco de genes (GenBank) formaram um grupo a parte em relação aos isolados estudados podendo ser novas espécies deste gênero.

## AGRADECIMENTOS

A CAPES, CNPq e FACEPE por concessões de bolsa e financiamentos de auxílio a pesquisa e ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA.

## REFERÊNCIAS

- ALBINO, U.; SARIDAKIS, D.P.; FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M.; VINUESA, P.; ANDRADE, G. High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. **Plant and Soil**, v.287, n.2, p.199-207, 2006.
- ANDAM, C.P.; MONDO, S.J.; PARKER, M.A. Monophyly of nodA and nifH genes across Texan and Costa Rican populations of Cupriavidus nodule symbionts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.14, p.4686-4690, 2007.
- ANDERSON, N.F.; DAVIDSON, D.W.; COOK, S.C. Burkholderia sp. enrichment culture clone F53\_07a\_B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/254732823>>. Acesso em: 18. jun. 2011.
- ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 4025-4034, 2002.
- ANDRUS, A.D.; ANDAM, C.; PARKER, M.A. Burkholderia sp. mpp4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/HM107374.1>>. Acesso em: 18. jun. 2011.
- ANTUNES, J.E.L. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. 2010. 109f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Piauí, Teresina, 2010.
- ARAÚJO, A. S. F; CARVALHO, E. M. S; “**Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas**”; Universidade Federal do Piauí Pró-reitoria de Extensão Centro de Ciências Agrárias; Comunicado técnico, nº11, 1p, 2006.
- ATLAS, M.; BARTHA, R. **Microbial evolution and Biodiversity**. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial Ecology. Menlo Park: Benjamin/ Cummings Science, p. 27-57, 1998.
- BARRETO, W.O.; PAULA, J.L.D.; DUARTE, M.N. **Manual de Métodos de Análise de Solos**. Brasília, EMBRAPA, 1997.
- BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, e *Rhizobium* sp. Nodule Bacteria on two Mimosa spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 1198-1206, 2006.

BARRETT, C.F.; PARKER, M.A. Prevalence of Burkholderia sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, n.1, p.57-65, 2005.

BERINGER, J. E. R Factor Transfer in Rhizobium leguminosarum. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.

BINDE, D.R.; MENNA, P.; BANGEL, E.V.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.83, n.5, p.897-908, 2009.

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

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.392-397, 1988.

CHEN, L. S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 5099-5103, 2000.

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 cystic fibrosis patients. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 1729–1735, 2001.

CHEN, W.M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOIVIN-MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.24, p.7266–7272, 2003.

CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; CHOU, J.H.; CHOU, Y.J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.R.; ELLIOTT, G. N., SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; JAMES, E.K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa-nodulating* strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.7461– 7471, 2005a.

CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; CHOU, J.H.; SHEU, S.Y.; YANG, S.Z.; SPRENT, J.I. beta-Rhizobia from Mimosa pigra, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **New Phytologist**, v.168, n.3, p.661–675, 2005b.

CHEN, W.M. *Burkholderia* sp. NKMU-JPY359 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/300675063>>. Acesso em: 18. jun. 2011.

CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; COENYE, T.; CHOU, J.H.; BARRIOS, E.; FARIA, S.M.; ELLIOTT, G.N.; SHEU, S.Y.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1847-1851, 2006.

CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; LIN, K.Y.; CHOU, J.H.; SHEU, S.Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** [S.I.], v.57, n.5, p.1055-1059, 2007.

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

CHOU, J.H. *Burkholderia* sp. DPU-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/162319759>>. Acesso em: 18. jun. 2011.

CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M., LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, v. 4, n. 1, p. 80-95, 2000.

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium sahelii* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, n.4, p.715-733, 1994.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem- nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, n.1, p.89-98, 1988.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 908-920, 2003.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the *Manual*. In: BOONE, D.R., CATENHOLZ, R.W. (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, **Springer-Verlag**, v.1., p.119-166, 2001.

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

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, n.9, p.1389-1398, 2004.

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

GRICE, E.A.; KONG, H.H.; RENAUD, G.; YOUNG, A.C.; BOUFFARD, G.G.; BLAKESLEY, R.W.; WOLFSBERG, T.G.; TURNER, M.L.; SEGRE, J.A. A diversity profile of the human skin microbiota. **Genome Research**, v.18, n.7, p.1043-1050, 2008.

GUEDES, H.V.; SANTOS, S.T.; PERIN, L.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Polyphasic characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolates obtained from different sugarcane varieties. **Braslian Journal of Microbiology**, v. 39, p.718-723, 2008.

HAMEED, S.; YASMIN, S.; MALIK, K.A.; ZAFAR, Y.; HAFEEZ, F.Y. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. **Biology and Fertility of Soil**, v.39, n.3, p.179-185, 2004.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A. B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B. S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4431-40, 2002.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**. Circular, n.347, p.1-32, 1950.

HOLLINGSWORTH, R.; SMITH, E.; AHMAD, M.H. Chemical composition of extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia. **Archives of Microbiology**, v.142, p.18-20, 1985.

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, p.189-295, 1997.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA–SPI; Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA-CNPAP, 1994. p. 45-61.

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BANGEL E.V.; BARCELLOS, F.G.; GRANGE, L.; PINTO, F.G.S.; RIBEIRO, R.A.; BATISTA, J.S.S.; BINDE, D.R.; PLOTTEGHER, F.; KASCHUK, G.; ALBERTON, A.; LOUREIRO, M.F.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.M.O. Identificação das metodologias mais adequadas para a análise da diversidade genética intra e interespecífica em rizóbios. In: RELARE, 14., Bonito, 2008. **Programa e resumos...** s.l.: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. p.12.

JARVIS, B. D. W.; BERKUM, P. V.; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, n.3, p.895-898, 1997.

JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae CONN 1938, 321. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Willian and Wilkins, 1984. p.235-244.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132. (eds) Munro, H.N. New York: **Academic Press**, 1969.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional systems in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.32, p.210-220, 2006.

LEITE, J.; SEIDO, S.L.; PASSOS, S.R.; XAVIER, GR.; RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soil of the lower half of the São Francisco Valley. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.33, p.1215-1226, 2009.

LIMA, A.A. **Caracterização e Seleção de Rizóbios de Macuna**. Seropédica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 79f. 2009 (Dissertação de Mestrado).

LUDWIG, W.; BAUER, S.H.; BAUER, M.; HELD, I.; KIRCHHOF, G.; SCHULZE, R.; HUBER, I.; SPRING, S.; HARTMANN, A.; SCHLEIFER, K.H. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam, v.153, n.1, p.181-90, 1997.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, n.14, p.4525-4529, 1992.

YOUNG, J. P. W.; HAUKKA, K. E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytol** v.133, p.87–94, 1996.

MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 15, p. 113-140, 1996.

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P., RUMJANEK, N.G. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio". **Comunicado Técnico**, n.19, p.1-14, 1997.

MARTINSON, V.G.; DANFORTH, B.N.; MINCKLEY, R.L.; RUEPPELL, O.; TINGEK, S.; MORAN, N.A. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. **Molecular Ecology**, v.20, n.3, p.619-628, 2011.

McINNIS, A.; THIES, J. E.; ABBOTT, L. K.; HOWIESON, J. G. Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities – a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v.53, p.1118-1121, 2004.

MEDEIROS, E.V.; MARTINS, C.M.; LIMA, J.A.M.; FERNANDES, Y.T.D.; OLIVEIRA, V.R.; BORGES, W.L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v.31, p.529-535, 2009.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O.; Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.

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

MENNA, P.; PEREIRA, A.A.; BANGEL, E.V.; HUNGRIA, M. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, v.48, p.120-130, 2009.

MOHSENI, M.; BURTON, S.K.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Burkholderia hospita strain MM1710 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/112031230>>. Acesso em: 18. jun. 2011.

MOREIRA, F.M.S., HAUKKA, K.; YOUNG, J.P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, v.7, p.889–895, 1998.

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

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276: p. 734–740, 1997.

PALANIAPPAN, P.; CHAUHAN, P.S.; SARAVANAN, V.S.; ANANDHAM, R.; SA, T. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology and Fertility of Soils**, v.46, n.8, p.807-816, 2010.

PUMPHREY, G.M.; MADSEN, E.L. Field-based stable isotope probing reveals the identities of benzoic acid-metabolizing microorganisms and their in situ growth in agricultural soil. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, n.13, p.4111-4118, 2008.

RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUJN, F.J. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANO – ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. (Eds.). **DNA marker: protocols, applications and overviews**. New York: Wiley, J. & Sons, Inc., 1996, p.1-26.

RADEMAKER, J.L.W.; HOSTE, B.; LOUWS, F.J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, P.; BRUIJN, F.J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.665-677, 2000.

RASOLOMAMPIANINA, R.; BAILLY, X.; FETIARISON, R.; RABEVOHITRA, R.; BÉNA, G.; RAMOROSON, L.; RAHERIMANDIMBY, M.; MOULIN, L. DE LEJUDIR, P.; DREFUS, B.; AVARRE, J.C. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. **Molecular Ecology**, v.14, n.13, p.4135-4146, 2005.

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

ROHLF, F. J. Note on Algorithm 81: Dendrogram plot. **Computer Journal**, v.18, p.90-92, 1975.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406–425, 1987.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.4, p.249-256, 2007.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J.G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.21, p.323-387, 2002.

SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology** [S.I.], v.33, n.5, p.269-274, 2010.

SIKORA, S.; REDZEPOVIC, S. Genotypic characterisation of indigenous soybean rhizobia by PCRRFLP of 16S rDNA, rep-PCR and RAPD analysis. **Food Technology and Biotechnology**, v.41, n.1, p.61-67, 2003.

SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; FIGUEIREDO, M.V.B.; CARVALHO, F.G.; SILVA, M.L.R.B.; SILVA, A.J.N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, p.16-21, 2007.

SINCLAIR, N.; EAGLESHAM, A.R.J. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of west African cowpea rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, v.16, p.247-251, 1984.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. Numerical Taxonomy. **Freeman**. San Francisco. 1973, 573 p.

SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. A. Principles of Numerical Taxonomy. **Freeman**. San Francisco. 1963, 359 p.

SPRENT, J. I. 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 1081-1084, 2008.

SY, A., GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C. DREYFUS, B. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **The Journal of Bacteriology**, v.183, p.214–220, 2001.

TEREFEWOR, Z.; NICK, G.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, n.2, p.349-356, 1998.

TORRES, A.R.; ARAÚJO, W.L.; CURSINO, L.; HUNGRIA, M.; PLOTTEGHER, F.; MOSTASSO, F.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different 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.; LUDENA, D.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E.

Nodulation of *Lupinus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1318–1327, 2005.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; FERNANDEZ-SANTOS, F.; VIZCAÍNO, N.; RIVAS, R.; GILLIS, M.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1985–1989, 2005.

VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, T. A.; EARDLY, B. D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.13-22, 1998.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v.25, n.4, p.507-512, 2002.

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

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.6823–6831, 1991.

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

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

WEISBURG, WILLIAM G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.2, p.697-703, 1991.

WILLEMS, A.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rDNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.305-313, 1993.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. In: VELAZQUEZ, E.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C. (Eds). **First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization**. Springer, 2007, 3-14p.

WILLEMS, A.; FERNANDEZ-LOPEZ, N.; MUNOZ-ADELANTADO, E.; GORIS, J.; VOS, P.; MARTINEZ-ROMERO, E.; TORO, N.; GILLIS, M. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens*

Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1207-1217, 2003.

WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, n.1, p.35-43, 2010.

ZILLI, J.E.; VAIISHESKI, R.R.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v.35, n.4, p.281-287, 2004.

**Quadro 1:** Resultados da busca por similaridade no GenBank com o programa BLAST de 44 isolados provenientes da inoculação de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth) com amostras de solo coletado em cinco municípios da região Nordeste. \* O isolado será resequenciado.

Isolados/ Números de acesso no NCBI	Pares de bases	Identidade	Gaps	e- value	Alinhamento mais significativo pelo NCBI	Origem do isolamento da estirpe	Citação
PE-MO01 (*)	1055	307/390 (79%)	15/390 (4%)	8e-80	gb FJ025138.1  Burkholderia sp. SEMIA 6413 ,sequência parcial. Length=1500	<i>Dalbergia nigra</i>	BINDE et al., 2009
PE-MO02 (*)	1393	753/883 (85%)	62/883 (7%)	0.0	gb AY904782.1  Burkholderia sp. SEMIA 6398, partial sequence Length=1450	<i>Piptadenia stipulacea</i>	MENNA et al., 2006
PE-MO03 (JN622111)	1448	1407/1436 (98%)	15/143 6 (1%)	0.0	gb EU287925.1  Burkholderia sp. DPU-3, partial sequence Length=1443	<i>Mimosa pudica</i>	CHOU, 2007
PE-MO04 (*)	1149	591/739 (80%)	54/739 (7%)	1e-165	gb AY773188.1  Burkholderia sp. Br3432, partial sequence Length=1450	Não determinado	CHEN et al., 2005a
PE-MO06 (JN622112)	1429	1391/1412 (99%)	12/141 2 (1%)	0.0	gb HM107374.1  Burkholderia sp. mpp4, partial sequence Length=1452	<i>Mimosa pudica</i>	ANDRUS et al., 2010

Continua na página seguinte

Isolados/ Números de acesso no NCBI	Pares de bases	Identidade	Gaps	e- value	Alinhamento mais significativo pelo NCBI	Origem do isolamento da estirpe	Citação
PE-MO07 (JN622113)	1440	1400/1410 (99%)	3/1410 (0%)	0.0	gb AY904782.1  Brkholderia sp. SEMIA 6398, partial sequence Length=1450	<i>Piptadenia stipulacea</i>	MENNA et al., 2006
PE-MO08 (*)	1496	467/647 (72%)	71/647 (11%)	3e-67	gb EU677393.1  Uncultured bacterium clone D609, partial sequence Length=1422	Solo	PUMPHREY e MADSON, 2008
PE-MO10 (JN622114)	1439	1423/1438 (99%)	9/1438 (1%)	0.0	gb AY533862.1  Burkholderia sp. Br3407, partial sequence Length=1445	<i>Mimosa sp.</i>	CHEN, 2005a
PE-ST01 (JN622115)	1439	1393/1410 (99%)	11/141 0 (1%)	0.0	gb HM366718.1  Burkholderia sp. NKMU- JPY359, partial sequence Length=1405	<i>Mimosa sp</i>	CHEN, 2010
PE-ST02 (JN622116)	1450	1402/1428 (98%)	20/142 8 (1%)	0.0	gb AY904782.1  Burkholderia sp. SEMIA 6398, partial sequence Length=1450	<i>Piptadenia stipulacea</i>	MENNA et al., 2006
PE-ST03 (JN622117)	1457	1414/1454 (97%)	20/145 4 (1%)	0.0	gb EU287925.1  Burkholderia sp. DPU-3, partial sequence Length=1443	<i>Mimosa pudica</i>	CHOU, 2007

Continua na página seguinte

Isolados/ Números de acesso no NCBI	Pares de bases	Identidade	Gaps	e- value	Alinhamento mais significativo pelo NCBI	Origem do isolamento da estirpe	Citação
PE-ST04 (JN622118)	1451	1413/1426 (99%)	7/1426 (0%)	0.0	gb AY904782.1  Burkholderia sp. SEMIA 6398, partial sequence Length=1450	<i>Piptadenia tipulacea</i>	MENNA et al., 2006
PE-ST06 (*)	1628	484/645 (75%)	65/645 (10%)	6e-96	gb AY773188.1  Burkholderia sp. Br3432, partial sequence Length=1450	Não determinado	CHEN et al., 2005a
PE-ST07 (JN622119)	1470	1400/1447 (97%)	26/144 7 (2%)	0.0	gb AY904782.1  Burkholderia sp. SEMIA 6398, partial sequence Length=1450	<i>Piptadenia stipulacea</i>	MENNA et al., 2006
PE-ST08 (*)	1585	1200/1557 (77%)	179/15 57 (11%)	0.0	gb HM366718.1  Burkholderia sp. NKMU- JPY359, partial sequence Length=1405	<i>Mimosa sp.</i>	CHEN, 2010
PE-ST09 (JN622120)	1478	1406/1448 (97%)	28/144 8 (2%)	0.0	gb AY904782.1  Burkholderia sp. SEMIA 6398, partial sequence Length=1450	<i>Piptadenia tipulacea</i>	MENNA et al., 2006
PE-ST10 (JN622121)	1446	1385/1419 (98%)	20/141 9 (1%)	0.0	gb HM366718.1  Burkholderia sp. NKMU- JPY359, partial sequence Length=1405	<i>Mimosa sp.</i>	CHEN, 2010

Continua na página seguinte

Isolados/ Números de acesso no NCBI	Pares de bases	Identidade	Gaps	e- value	Alinhamento mais significativo pelo NCBI	Origem do isolamento da estirpe	Citação
PE-CR01 (JN622122)	1461	1388/1404 (99%)	7/1404 (0%)	0.0	gb HM366718.1  Burkholderia sp. NKMU- JPY359, partial sequence Length=1405	<i>Mimosa</i> sp.	CHEN, 2010
PE-CR02 (JN622123)	1569	1045/1476 (71%)	158/14 76 (11%)	2e-139	gb HM366718.1  Burkholderia sp. NKMU- JPY359, partial sequence Length=1405	<i>Mimosa</i> sp.	CHEN, 2010
PE-CR03 (*)	1541	1260/1543 (82%)	126/15 43 (8%)	0.0	gb EU287925.1  Burkholderia sp. DPU-3, partial sequence Length=1443	<i>Mimosa pudica</i>	CHOU, 2007
PE-CR04 (JN622124)	1532	1149/1455 (79%)	128/14 55 (9%)	0.0	gb FJ025138.1  Burkholderia sp. SEMIA 6413, partial sequence Length=1500	<i>Dalbergia nigra</i>	BINDE et al., 2009
PE-CR05 (JN622125)	1456	1424/1454 (98%)	20/145 4 (1%)	0.0	gb FJ025138.1  Burkholderia sp. SEMIA 6413, partial sequence Length=1500	<i>Dalbergia nigra</i>	BINDE et al., 2009
PE-CR07 (JN622126)	1542	1249/1538 (81%)	127/15 38 (8%)	0.0	gb FJ025138.1  Burkholderia sp. SEMIA 6413, partial sequence Length=1500	<i>Dalbergia nigra</i>	BINDE et al., 2009

Continua na página seguinte

Isolados/ Números de acesso no NCBI	Pares de bases	Identidade	Gaps	e- value	Alinhamento mais significativo pelo NCBI	Origem do isolamento da estirpe	Citação
PE-CR08 (*)	1477	1041/1289 (81%)	65/128 9 (5%)	0.0	gb AY773188.1  Burkholderia sp. Br3432, partial sequence Length=1450	Espécies do gênero <i>Mimosa</i>	CHEN et al., 2005a
PE-CR09 (JN622127)	1463	1260/1456 (87%)	54/145 6 (4%)	0.0	gb AY904782.1  Burkholderia sp. SEMIA 6398, partial sequence Length=1450	<i>Piptadenia tipulacea</i>	MENNA et al., 2006
PE-CR10 (*)	1550	384/542 (71%)	71/542 (13%)	3e-36	gb EU540282.1  Uncultured bacterium clone nbt113g12, partial sequence Length=1378	Pele humana	GRICE et al., 2008
PE-GR01 (*)	1599	339/431 (79%)	22/431 (5%)	8e-82	gb HM366717.1  Burkholderia sp. NKMU- JPY461, partial sequence Length=1402	<i>Mimosa</i> sp.	CHEN, 2010
PE-GR02 (*)	1520	870/1277 (68%)	137/12 77 (11%)	3e-74	gb AY773190.1  Burkholderia sp. Br3446, partial sequence Length=1507	Espécies do gênero <i>Mimosa</i>	CHEN et al., 2005a
PE-GR03 (*)	1552	1058/1414 (75%)	169/14 14 (12%)	0.0	gb FJ478405.1  Burkholderia sp. TAt-045 e, partial sequence Length=1524	<i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Sorghum bicolor</i> L. Moench.	WONG-VILLARREAL e CABALLERO, 2010

Continua na página seguinte

Isolados/ Números de acesso no NCBI	Pares de bases	Identidade	Gaps	e- value	Alinhamento mais significativo pelo NCBI	Origem do isolamento da estirpe	Citação
PE-GR04 (JN622128)	1533	1056/1467 (72%)	136/14 67 (9%)	3e-175	gb GQ306168.1  Burkholderia sp. enrichment culture clone F53_07a_B , partial sequence Length=1390	Não determinado	ANDERSON et al., 2009
PE-GR05 (JN622129)	1485	1429/1475 (97%)	5/1475 (2%)	0.0	gb FJ025138.1  Burkholderia sp. SEMIA 6413, partial sequence Length=1500	<i>Dalbergia nigra</i>	BINDE et al., 2009
PE-GR06 (JN622130)	1406	1105/1332 (83%)	66/133 2 (5%)	0.0	gb AY773188.1  Burkholderia sp. Br3432, partial sequence Length=1450	Espécies do gênero <i>Mimosa</i>	CHEN et al., 2005a
PE-GR07 (JN622131)	1460	1397/1433 (97%)	16/143 3 (1%)	0.0	gb AY904782.1  Burkholderia sp. SEMIA 6398, partial sequence Length=1450	<i>Piptadenia tipulacea</i>	MENNA et al., 2006
PE-GR08 (JN622132)	1452	1431/1444 (99%)	2/1444 (0%)	0.0	gb EU287925.1  Burkholderia sp. DPU-3, partial sequence Length=1443	<i>Mimosa pudica</i>	CHOU, 2007
PE-GR09 (*)	1516	205/300 (68%)	40/300 (13%)	9e-05	gb HM110801.1  Uncultured beta proteobacterium clone SHNW576, partial sequence Length=1321	Microbiota intestinal de abelhas	MARTINSON et al., 2011

Continua na página seguinte

Isolados/ Números de acesso no NCBI	Pares de bases	Identidade	Gaps	e- value	Alinhamento mais significativo pelo NCBI	Origem do isolamento da estirpe	Citação
PE-IT01 (JN622133)	1450	1425/1447 (98%)	12/144 7 (1%)	0.0	gb FJ025138.1  Burkholderia sp. SEMIA 6413, partial sequence Length=1500	<i>Dalbergia nigra</i>	BINDE et al., 2009
PE-IT02 (JN622134)	1465	1427/1460 (98%)	17/146 0 (1%)	0.0	gb EU287925.1  Burkholderia sp. DPU-3, partial sequence Length=1443	<i>Mimosa pudica</i>	CHOU, 2007
PE-IT03 (JN622135)	1482	1422/1469 (97%)	36/146 9 (2%)	0.0	gb AY533862.1  Burkholderia sp. Br3407, partial sequence Length=1445	Espécies do gênero <i>Mimosa</i>	CHEN et al., 2005a
PE-IT04 (JN622136)	1468	1422/1467 (97%)	30/146 7 (2%)	0.0	gb FJ025138.1  Burkholderia sp. SEMIA 6413, partial sequence Length=1500	<i>Dalbergia nigra</i>	BINDE et al., 2009
PE-IT05 (*)	1592	216/280 (77%)		5e-46	gb DQ855426.1  Burkholderia hospita strain MM1710, partial sequence Length=1523	Não determinado	MOHSENI et al., 2006
PE-IT07 (JN622137)	1461	1439/1462 (98%)	12/146 2 (1%)	0.0	gb FJ025138.1  Burkholderia sp. SEMIA 6413, partial sequence Length=1500	<i>Dalbergia nigra</i>	BINDE et al., 2009

Continua na página seguinte

Isolados/ Números de acesso no NCBI	Pares de bases	Identidade	Gaps	e- value	Alinhamento mais significativo pelo NCBI	Origem do isolamento da estirpe	Citação
PE-IT08 (*)	1518	279/360 (78%)	40/360 (11%)	4e-47	gb GQ181027.1  Burkholderia phytofirmans strain LNW6, partial sequence Length=1432	<i>Lespedeza sp</i>	PALANIAPPAN et al., 2009
PE-IT09 (JN622138)	1471	1425/1472 (97%)	31/147 2 (2%)	0.0	gb FJ025138.1  Burkholderia sp. SEMIA 6413, partial sequence Length=1500	<i>Dalbergia nigra</i>	BINDE et al., 2009
PE-IT10 (JN622139)	1453	1429/1453 (98%)	15/145 3 (1%)	0.0	gb FJ025138.1  Burkholderia sp. SEMIA, partial sequence Length=1500	<i>Dalbergia nigra</i>	BINDE et al., 2009

## APÊNDICE II



**Figura 1:** Imagem de satélite mostrando os pontos de coleta. Fonte: Google Earth.

**Tabela 3:** Características morfofisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos do município de Gravatá-PE, 42 horas após a repicagem em meio YM com Azul de Bromotimol.

Isolados	AC(h) <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>	T(mm) <sup>3</sup>	FC <sup>4</sup>	B <sup>5</sup>	A <sup>6</sup>	T <sup>7</sup>	C <sup>8</sup>	EL <sup>9</sup>	M <sup>10</sup>	EM <sup>11</sup>
PE-GR01	<22	Ac	1,25	C	L	Hg	O	C	C	I	A
PE-GR02	<22	Ac	1,17	C	L	Hg	T	I	C	A	A
PE-GR03	<22	Ac	1,64	I	L	Hg	O	C	A	MU	A
PE-GR04	<22	Ac	1,06	C	L	Hg	O	C	A	P	A
PE-GR05	<22	Al	1,00	C	L	Hg	O	C	A	I	A
PE-GR06	<22	Al	1,10	C	L	Hg	O	C	A	MU	A
PE-GR07	<22	Al	1,15	C	L	Hg	O	C	A	P	A
PE-GR08	<22	Ac	1,88	I	L	Hg	O	B	A	MU	A
PE-GR09	<22	Al	1,17	I	L	Hg	O	B	A	P	A
PE-GR10	<22	Ac	0,89	C	L	Hg	O	C	A	P	A

<sup>1</sup>Aparecimento da colônia: < 22h; <sup>2</sup>pH: (Ac: ácido, Al: alcalino); <sup>3</sup>tamanho ( $\leq 1\text{mm} = 0$ ,  $> 1\text{mm} = 1$ ); <sup>4</sup>forma da colônia (C: circular, I: irregular); <sup>5</sup>borda(L: lisa); <sup>6</sup>aparência (Hg: homogênea); <sup>7</sup>transparência (O: opaca; T: transparente, Trans: translúcida); <sup>8</sup>cor (A: amarela, C: creme, B: branca, I: indeterminado); <sup>9</sup>elevação (A: achatada, C: cúpula); <sup>10</sup>muco (A: ausente, P: pouco, I: intermediário, M:muito ); <sup>11</sup>elasticidade do muco (A: ausente, P: presente).

**Tabela 4:** Características morfofisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos do município de Itambé-PE, 42 horas após a repicagem em meio YM com Azul de Bromotimol.

Isolados	AC(h) <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>	T(mm) <sup>3</sup>	FC <sup>4</sup>	B <sup>5</sup>	A <sup>6</sup>	T <sup>7</sup>	C <sup>8</sup>	EL <sup>9</sup>	M <sup>10</sup>	EM <sup>11</sup>
PE-IT01	<22	Ac	2,48	I	L	Hg	O	C	A	MU	A
PE-IT02	<22	Al	1,47	I	L	Hg	O	B	A	I	A
PE-IT03	<22	Ac	1,28	I	L	Hg	Trs	A	A	MU	A
PE-IT04	<22	Ac	1,66	I	L	Hg	O	C	A	MU	A
PE-IT05	<22	Ac	2,57	C	L	Hg	O	C	A	MU	A
PE-IT07	<22	Ac	1,12	C	L	Hg	O	C	C	MU	A
PE-IT08	<22	Ac	0,99	I	L	Hg	O	C	A	MU	A
PE-IT09	<22	Ac	1,50	C	L	Hg	O	C	C	MU	A
PE-IT10	<22	Al	0,97	C	L	Hg	O	C	A	I	A

<sup>1</sup>Aparecimento da colônia: < 22h; <sup>2</sup>pH: (Ac: ácido, Al: alcalino); <sup>3</sup>tamanho ( ≤ 1mm = 0, > 1mm = 1); <sup>4</sup>forma da colônia (C: circular, I: irregular); <sup>5</sup>borda(L: lisa); <sup>6</sup>aparência (Hg: homogênea); <sup>7</sup>transparência (O: opaca; T: transparente, Trs: translúcida); <sup>8</sup>cor (A: amarela, C: creme, B: branca, I: indeterminado); <sup>9</sup>elevação (A: achatada, C: cúpula); <sup>10</sup>muco (A: ausente, P: pouco, I: intermediário, M:muito ); <sup>11</sup>elasticidade do muco (A: ausente, P: presente).

**Tabela 5:** Características morfofisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos do município de Mossoró-RN, 42 horas após a repicagem em meio YM com Azul de Bromotimol.

Isolados	AC(h) <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>	T(mm) <sup>3</sup>	FC <sup>4</sup>	B <sup>5</sup>	A <sup>6</sup>	T <sup>7</sup>	C <sup>8</sup>	EL <sup>9</sup>	M <sup>10</sup>	EM <sup>11</sup>
PE-MO01	<22	Ac	1,31	C	L	Hg	O	C	A	MU	A
PE-MO02	<22	Ac	0,86	I	L	Hg	O	C	A	I	A
PE-MO03	<22	Ac	1,31	C	L	Hg	O	C	A	I	A
PE-MO04	<22	Al	0,89	C	L	Hg	O	B	A	I	A
PE-MO05	<22	Ac	2,06	C	L	Hg	O	C	A	I	A
PE-MO06	<22	Al	1,04	C	L	Hg	O	C	A	P	A
PE-MO07	<22	Ac	1,65	I	L	Hg	O	B	A	I	A
PE-MO08	<22	Al	1,27	I	L	Hg	O	B	A	I	A
PE-MO10	<22	Al	0,96	I	L	Hg	O	B	A	P	A

<sup>1</sup>Aparecimento da colônia: < 22h; <sup>2</sup>pH: (Ac: ácido, Al: alcalino); <sup>3</sup>tamanho ( ≤ 1mm = 0, > 1mm = 1); <sup>4</sup>forma da colônia (C: circular, I: irregular); <sup>5</sup>borda(L: lisa); <sup>6</sup>aparência (Hg: homogênea); <sup>7</sup>transparência (O: opaca; T: transparente, Trans: translúcida); <sup>8</sup>cor (A: amarela, C: creme, B: branca, I: indeterminado); <sup>9</sup>elevação (A: achatada, C: cúpula); <sup>10</sup>muco (A: ausente, P: pouco, I: intermediário, M:muito ); <sup>11</sup>elasticidade do muco (A: ausente, P: presente).

**Tabela 6:** Características morfofisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos do município de Serra Talhada-PE, 42 horas após a repicagem em meio YM com Azul de Bromotimol.

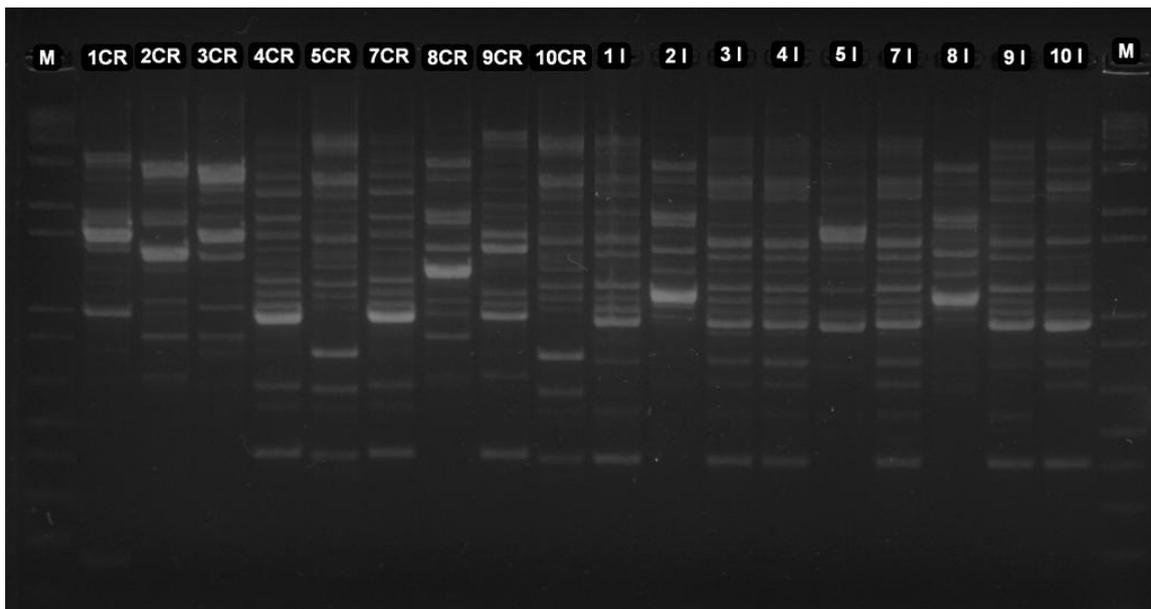
Isolados	AC(h) <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>	T(mm) <sup>3</sup>	FC <sup>4</sup>	B <sup>5</sup>	A <sup>6</sup>	T <sup>7</sup>	C <sup>8</sup>	EL <sup>9</sup>	M <sup>10</sup>	EM <sup>11</sup>
PE-ST01	<22	Ac	1,03	I	L	Hg	O	C	A	I	A
PE-ST02	<22	Al	0,94	C	L	Hg	O	C	A	I	A
PE-ST03	<22	Al	0,80	C	L	Hg	O	C	A	P	A
PE-ST04	<22	Al	1,10	C	L	Hg	O	C	A	P	P
PE-ST05	<22	Al	1,70	I	L	Hg	O	C	A	P	A
PE-ST06	<22	Al	1,00	I	L	Hg	O	C	A	P	A
PE-ST07	<22	Al	1,18	C	L	Hg	O	C	A	P	A
PE-ST08	<22	Al	0,89	C	L	Hg	O	B	A	I	A
PE-ST09	<22	Al	0,81	C	L	Hg	O	C	A	I	A
PE-M10	<22	Al	1,48	C	L	Hg	Trs	C	A	P	A

<sup>1</sup>Aparecimento da colônia: < 22h; <sup>2</sup>pH: (Ac: ácido, Al: alcalino); <sup>3</sup>tamanho ( ≤ 1mm = 0, > 1mm = 1); <sup>4</sup>forma da colônia (C: circular, I: irregular); <sup>5</sup>borda(L: lisa); <sup>6</sup>aparência (Hg: homogênea); <sup>7</sup>transparência (O: opaca; T: transparente, Trs: translúcida); <sup>8</sup>cor (A: amarela, C: creme, B: branca, I: indeterminado); <sup>9</sup>elevação (A: achatada, C: cúpula); <sup>10</sup>muco (A: ausente, P: pouco, I: intermediário, M:muito ); <sup>11</sup>elasticidade do muco (A: ausente, P: presente).

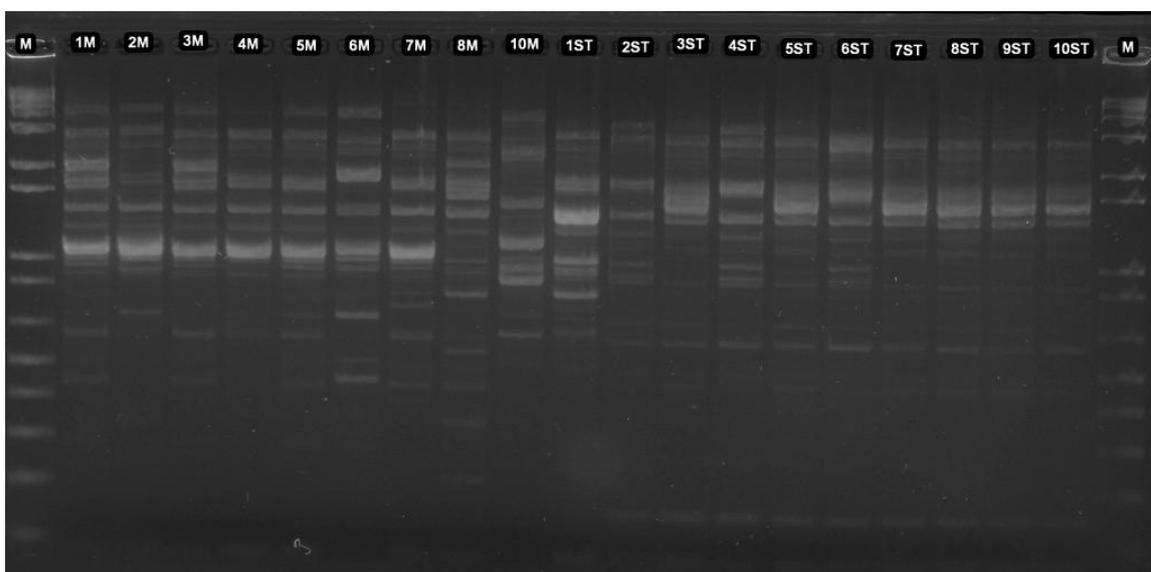
**Tabela 7:** Características morfofisiológicas dos grupos de isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos do município de Crato-CE, 42 horas após a repicagem em meio YM com Azul de Bromotimol.

Isolados	AC(h) <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>	T(mm) <sup>3</sup>	FC <sup>4</sup>	B <sup>5</sup>	A <sup>6</sup>	T <sup>7</sup>	C <sup>8</sup>	EL <sup>9</sup>	M <sup>10</sup>	EM <sup>11</sup>
PE-CR01	<22	Ac	1,49	C	L	Hg	O	C	A	I	A
PE-CR02	<22	Ac	1,33	I	L	Hg	O	B	A	MU	A
PE-CR03	<22	Ac	1,46	I	L	Hg	O	C	A	MU	A
PE-CR04	<22	Al	0,83	C	L	Hg	O	C	A	P	A
PE-CR05	<22	Al	1,18	I	L	Hg	O	C	A	I	A
PE-CR07	<22	Al	0,90	I	L	Hg	O	C	A	I	A
PE-CR08	<22	Ac	2,37	I	L	Hg	Trs	C	A	MU	A
PE-CR09	<22	Al	0,94	C	L	Hg	O	C	A	P	A
PE-CR10	<22	Al	0,82	C	L	Hg	O	C	A	P	P

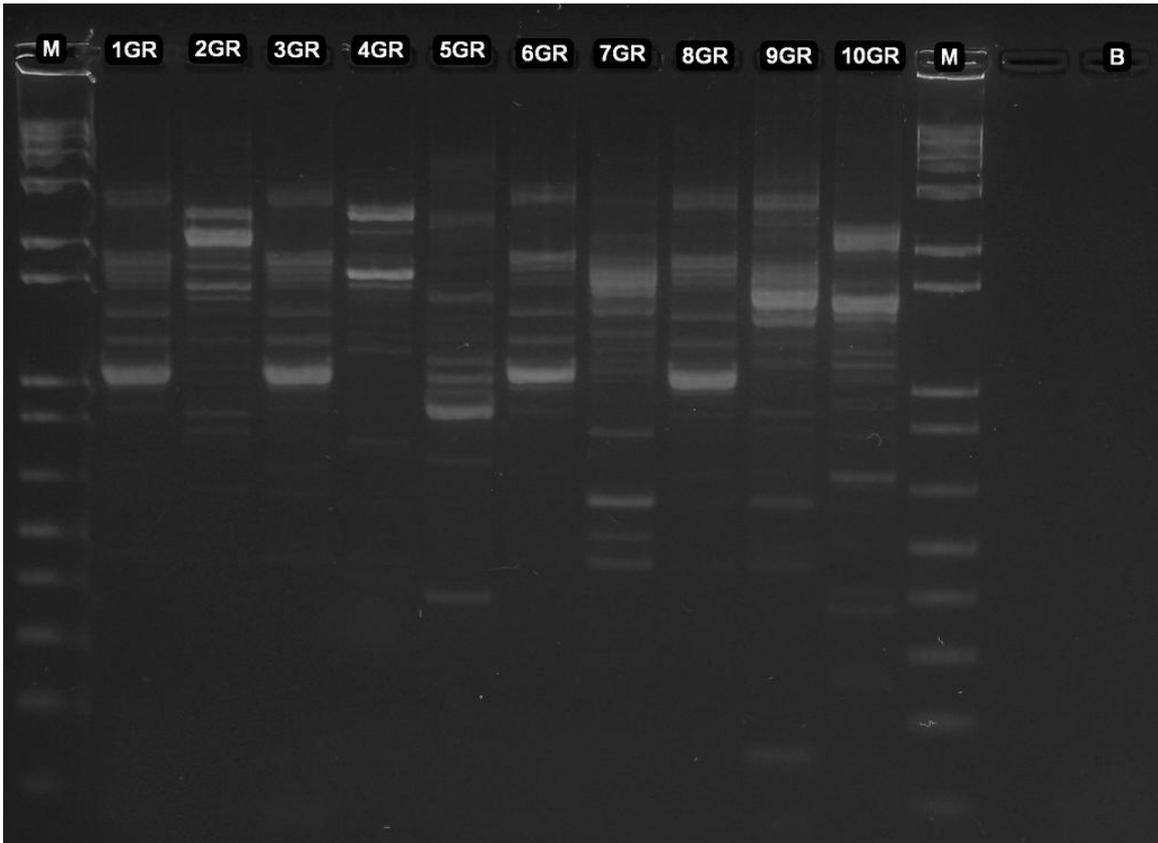
<sup>1</sup>Aparecimento da colônia: < 22h; <sup>2</sup>pH: (Ac: ácido, Al: alcalino); <sup>3</sup>tamanho ( ≤ 1mm = 0, > 1mm = 1); <sup>4</sup>forma da colônia (C: circular, I: irregular); <sup>5</sup>borda(L: lisa); <sup>6</sup>aparência (Hg: homogênea); <sup>7</sup>transparência (O: opaca; T: transparente, Trs: translúcida); <sup>8</sup>cor (A: amarela, C: creme, B: branca, I: indeterminado); <sup>9</sup>elevação (A: achatada, C: cúpula); <sup>10</sup>muco (A: ausente, P: pouco, I: intermediário, M:muito ); <sup>11</sup>elasticidade do muco (A: ausente, P: presente).



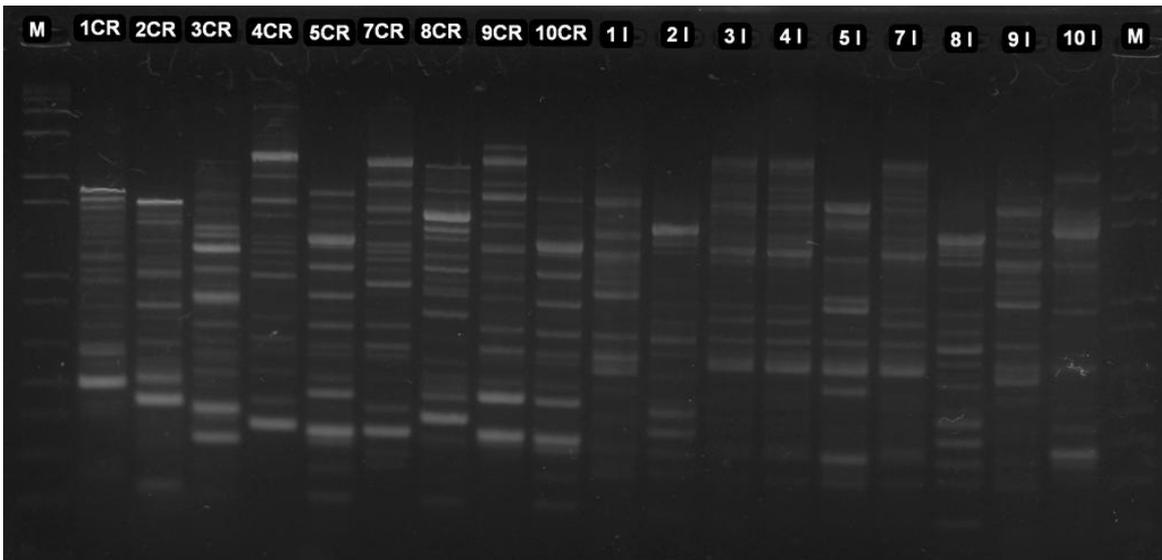
**Figura 2:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos REP-1 e REP-2 dos isolados do Crato e Itambé. Poço M – Marcador 1Kb plus.



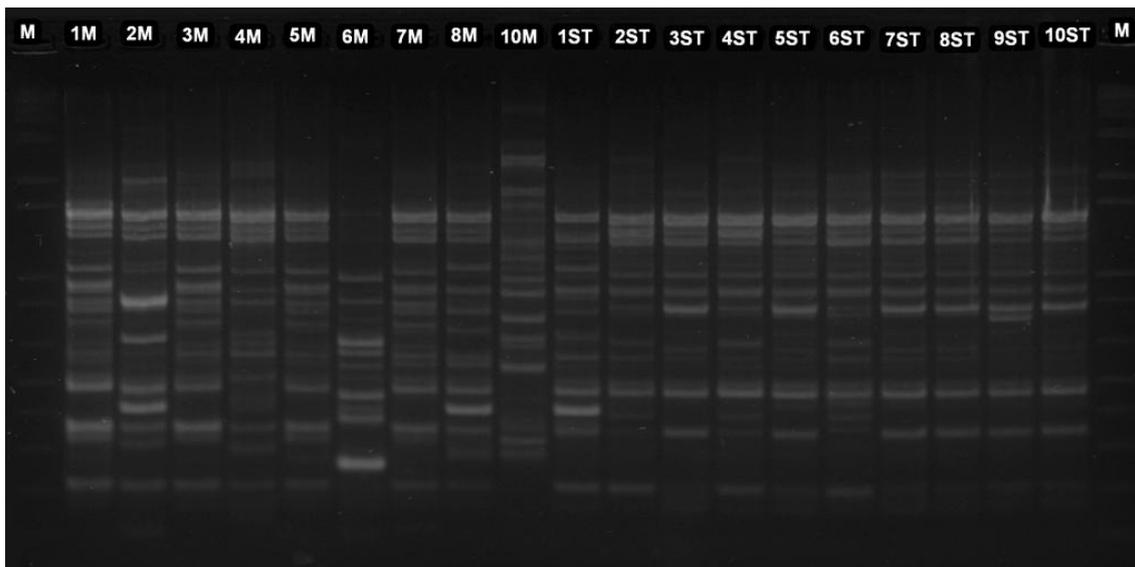
**Figura 3:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos REP-1 e REP-2 dos isolados de Mossoró e Serra Talhada. Poço M – Marcador 1Kb plus.



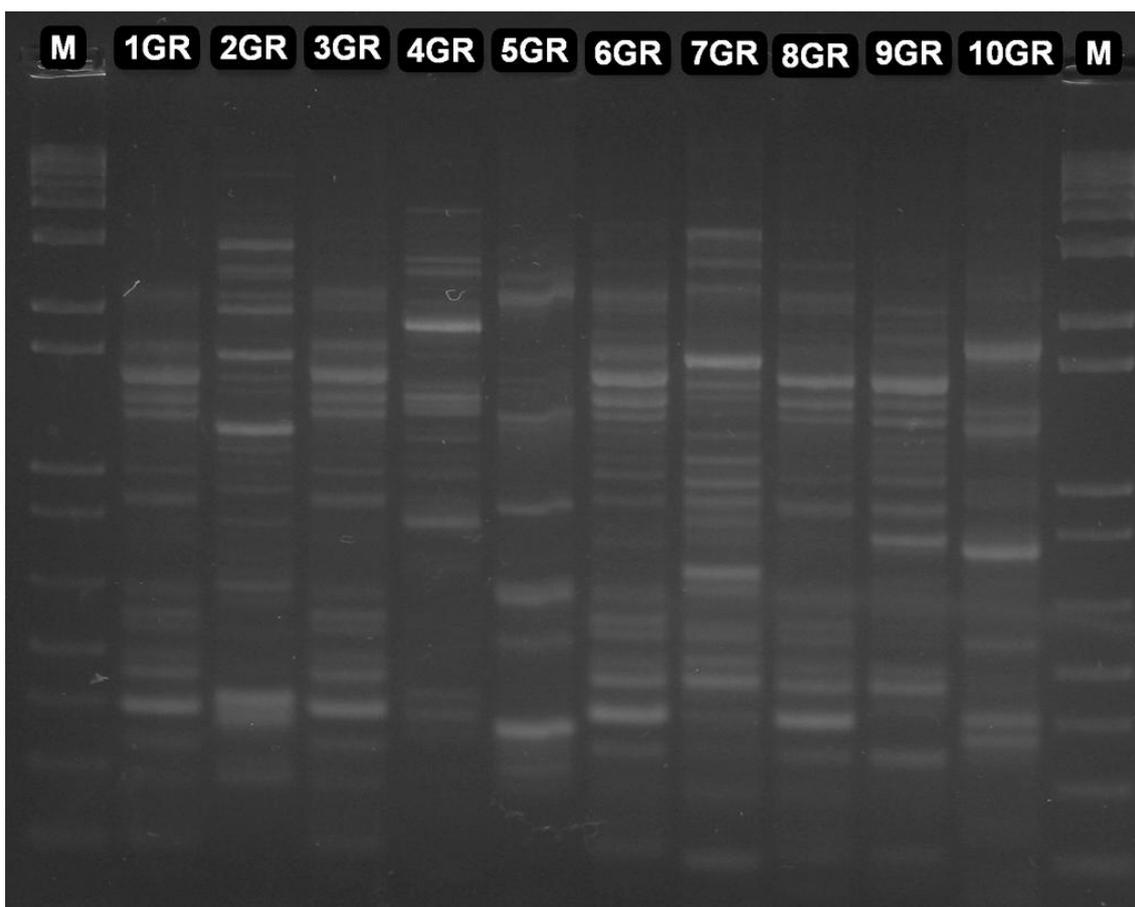
**Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos REP-1 e REP-2 dos isolados de Gravatá. Poço M – Marcador 1Kb plus.



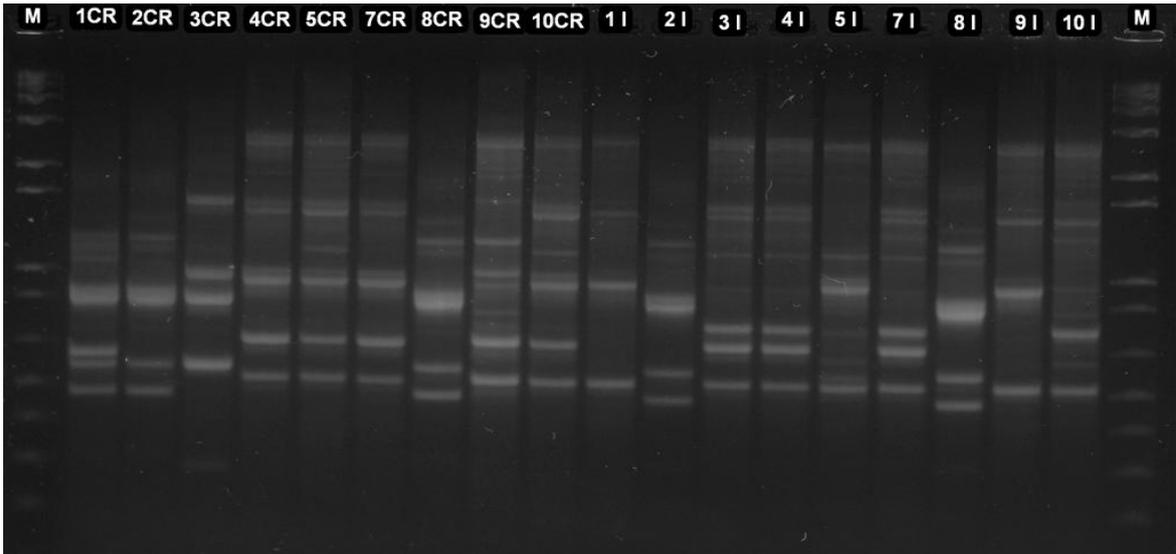
**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos ERIC-1 e ERIC-2 dos isolados do Crato e Itambé. Poço M – Marcador 1Kb plus.



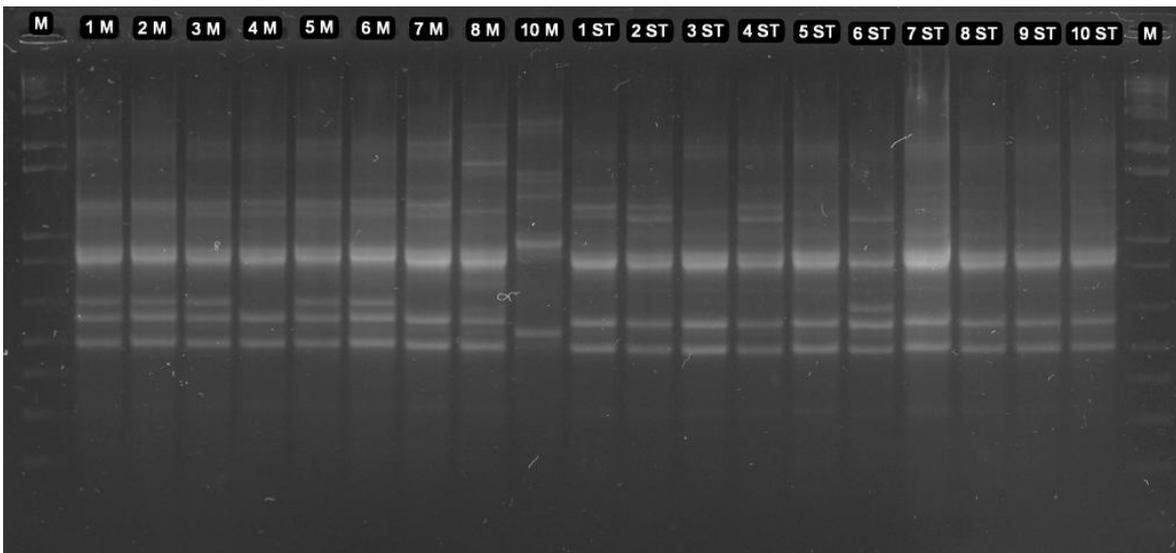
**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos ERIC-1 e ERIC-2 dos isolados de Mossoró e Serra Talhada. Poço M – Marcador 1Kb plus.



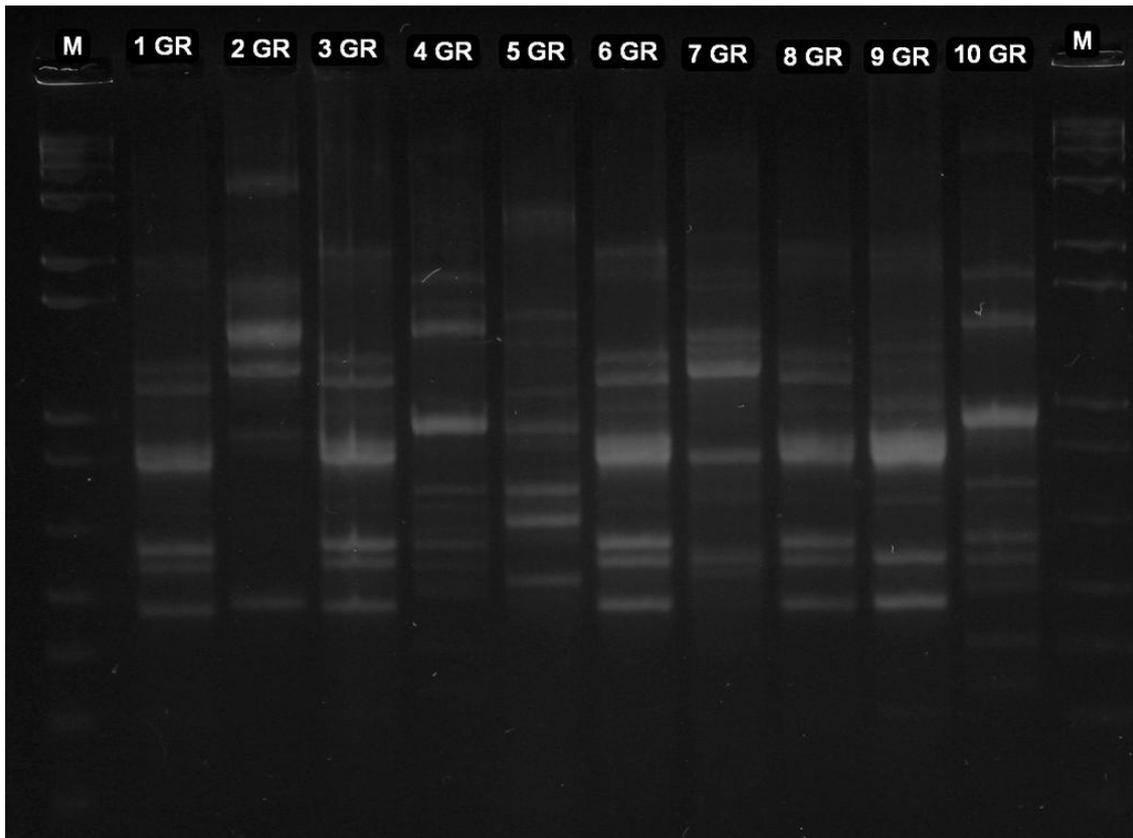
**Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos ERIC-1 e ERIC-2 dos isolados de Gravatá. Poço M – Marcador 1Kb plus.



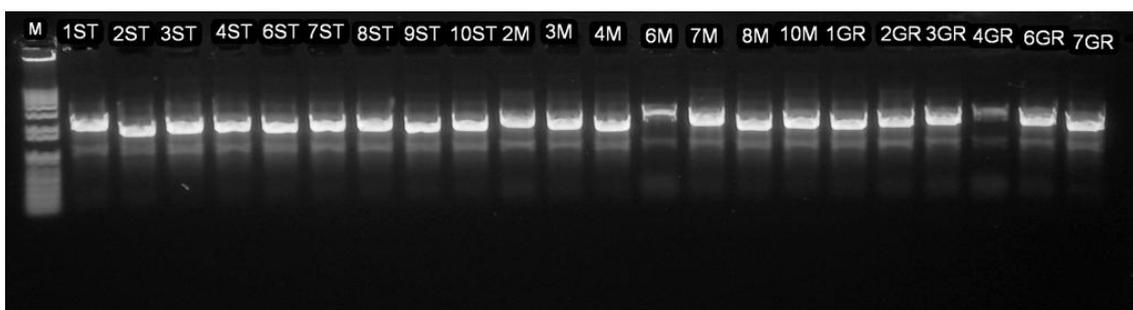
**Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo BOX-AR1 dos isolados do Crato e Itambé. Poço M – Marcador 1Kb plus.



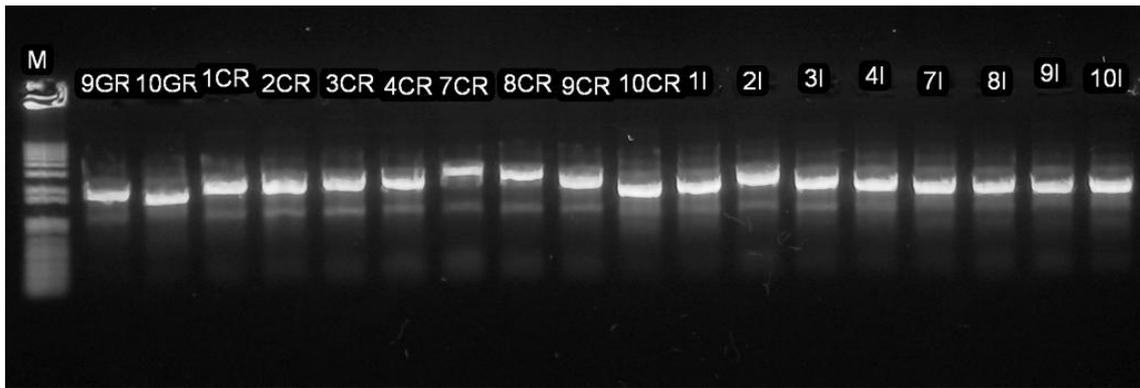
**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo BOX-AR1 dos isolados de Mossoró e Serra Talhada. Poço M – Marcador 1Kb plus.



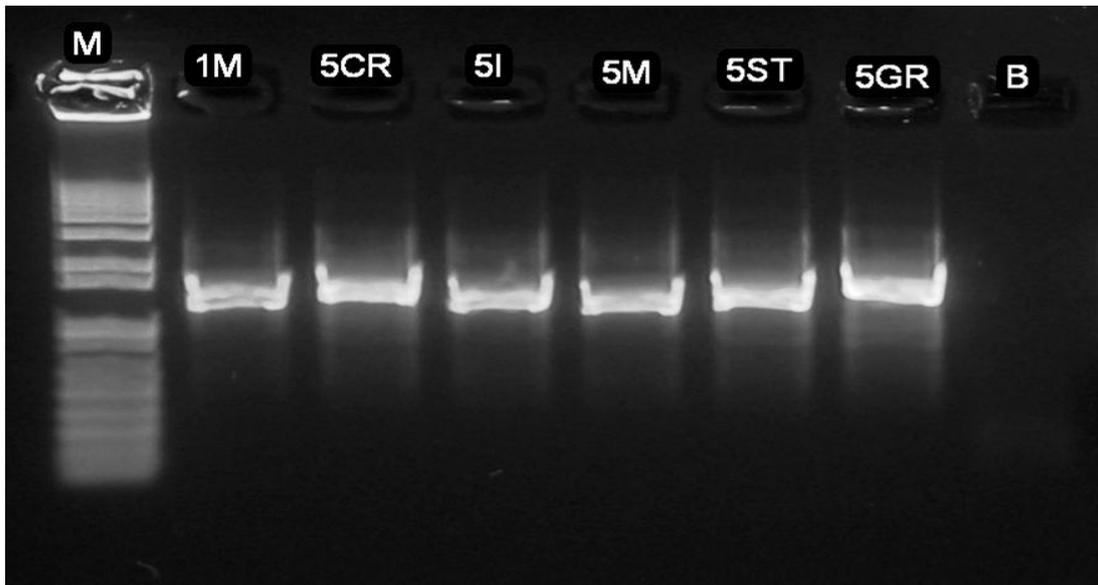
**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo BOX-AR1 dos isolados de Gravatá. Poço M – Marcador 1Kb plus.



**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação do 16S rDNA utilizando os oligonucleotídeo fD1 e rD1 dos isolados de Serra Talhada, Mossoró e Gravatá. Poço M – Marcador 1Kb plus.



**Figura 12:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação do 16S rDNA utilizando os oligonucleotídeo fd1 e rD1 dos isolados de Gravatá, Crato e Itambé. Poço M – Marcador 1Kb plus.



**Figura 13:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR Green, mostrando o padrão de bandas dos produtos de amplificação do 16S rDNA utilizando os oligonucleotídeo fd1 e rD1 dos isolados de Mossoró, Crato, Itambé, Serra Talhada, e Gravatá. Poço M – Marcador 1Kb plus.