

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

TESE

**Simbiose Feijão-caupi e Rizóbio: Diversidade de
Bactérias Associadas aos Nódulos**

Jakson Leite

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

SIMBIOSE FEIJÃO-CAUPI E RIZÓBIO: DIVERSIDADE DE
BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS NÓDULOS

JAKSON LEITE

Sob a Orientação do Pesquisador

Gustavo Ribeiro Xavier

e Co-orientação dos pesquisadores

Jerri Edson Zilli

e

Luc Felicianus Marie Rouws

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2015

635.652

L533s

T

Leite, Jakson, 1984-

Simbiose feijão-caupi e rizóbio: diversidade de bactérias associadas aos nódulos / Jakson Leite. – 2015.

75 f.: il.

Orientador: Gustavo Ribeiro Xavier.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Bibliografia: f. 56-72.

1. Feijão-caupi - Cultivo – Teses. 2. Rizóbio - Teses. 3. Nitrogênio - Fixação - Teses. 4. Bactérias - Teses. 5. Simbiose - Teses. I. Xavier, Gustavo Ribeiro, 1973- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIAS DO SOLO**

JAKSON LEITE

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2015

Gustavo Ribeiro Xavier. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia

Lindete Miria Vieira Martins. Dra. UNEB

Fábio Bueno dos Reis Júnior. Dr. Embrapa Cerrados

DEDICATÓRIA

*A minha mãe, Noralice Leite,
pelo amor, cuidado, educação e suporte que não me faltaram.*

*Aos meus irmãos Alexandre, Jorge e Taise Leite,
por me apoiarem e entenderam minha ausência.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao CPGA-CS pela oportunidade de poder fazer o curso.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado e de doutorado sanduíche.

À Embrapa Agrobiologia pelo suporte para o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

Ao Dr. Gustavo Ribeiro Xavier por me orientar durante o mestrado e doutorado ajudando a construir em mim o senso crítico sobre pensar em ciência. Pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa e por acreditar no meu potencial.

Aos meus co-orientadores, Dr. Jerri Edson Zilli e Dr. Luc Felicianus Marie Rouws pelos conselhos e pelas diversas discussões sobre meu tema de pesquisa. Aprendi muito.

A Dra. Viviane Radl quero agradecer pela amizade e pela enorme contribuição que teve na minha formação durante o mestrado e doutorado. Obrigado por fazer minha estadia na Alemanha e no Helmholtz Zentrum Munchen muito confortável.

Aos membros da banca Dr. Adelson Paulo de Araújo, Dr. Fábio Bueno dos Reis Júnior, Dra. Lindete Miria Vieira Martins e Dra. Veronica Massena Reis, que aceitaram avaliar este trabalho e pelas contribuições apresentadas.

Ao João Luiz, a Karine Moura de Freitas e a Tatiana Vidal pelo suporte que me deram para realizar as atividades no Laboratório de Ecologia Microbiana e no Laboratório Multiusuário.

Ao pessoal do Helmholtz Zentrum Munchen que me ajudaram muito no desenvolvimento dos trabalhos, especialmente Dra. Doreen Fischer, Dr. Andreas Hofmann, Susanne Kublik, Cornelia Galonska e Luhua Yang.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia Microbiana: Anelise, Carlos Vergara, Gleidson, Elson, Fernanda, Silvana, Sumaya, Daniele, Bárbara.

Aos amigos Samuel Passos e Gustavo Feitosa pelo apoio, resenhas e ajuda nos trabalhos no laboratório e casa-de-vegetação.

Aos amigos que fiz durante está estadia em Seropédica: Roselaine, Selenobaldo, Sandra, Emerson, Abmael, Khadidja, Gabriela, Alessandro, Rafael Butke, Lenilson, Eloísa, Erica, Camila, Marcus Vinicius, Cássia, Helder, Vanessa. Galera massa!

Agradecer a Deus pelo sopro de vida e pela família maravilhosa que tenho: minha mãe Noralice Leite e meus irmãos Alexandre, Jorge e Taise Leite. Agradecer pela curiosidade dos meus sobrinhos Larissa e Carlos Eduardo em querer saber “com o que tio trabalha”. E aos meus sobrinhos Lucas e Heitor que agora começam sua jornada na escola.

A todos àqueles que direta e indiretamente contribuíram com este trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Jakson Leite, filho de Noralice Leite, nasceu em 12 de junho de 1984, na cidade de Itiúba, estado da Bahia. Em 2003 formou-se em Técnico Agrícola com Habilitação em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Senhor do Bonfim, atual IFBaiano Campus Senhor do Bonfim. Em 2004 ingressou no curso de Engenharia Agrônômica na Universidade do Estado da Bahia onde obteve o título de Bacharel em Engenharia Agrônômica no ano de 2009. Entre os anos de 2005 e 2009, desenvolveu atividade de pesquisa em microbiologia do solo com foco na simbiose feijão-caupi e rizóbio, com bolsa de Iniciação Científica do CNPq, sob orientação da Doutra Lindete Miria Vieira Martins. Em março de 2009, ingressou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Ciência do Solo) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde desenvolveu, como bolsista da CAPES, sua dissertação “*Caracterização de bactérias nativas de solos do semiárido brasileiro isoladas de nódulos de feijão-caupi*” no Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia sob a orientação do Doutor Gustavo Ribeiro Xavier. Em 2011, ingressou no Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Ciência do Solo) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e continuou trabalhando com o tema simbiose feijão-caupi e rizóbio também sob orientação do Doutor Gustavo Ribeiro Xavier. Jakson Leite realizou parte de seu Doutorado no Helmholtz Zentrum Munchen, com bolsa da Capes, sob orientação da Doutora Viviane Radl.

RESUMO GERAL

LEITE, Jakson. **Simbiose feijão-caupi e rizóbio: diversidade de bactérias associadas aos nódulos**. 2015, 75f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma das principais culturas no Nordeste do Brasil com vantagens estratégicas para produção no semiárido, como tolerância a seca e bom desempenho em solos de baixa fertilidade. Além disso, fixa N em simbiose com rizóbios eliminando a demanda de fertilizantes nitrogenados, com benefícios econômicos, sociais e ambientais. Pouco se sabe sobre a diversidade genética de bactérias associadas aos nódulos de feijão-caupi no semiárido. O objetivo do estudo foi caracterizar a diversidade de bactérias de solos do semiárido brasileiro associadas aos nódulos de diferentes cultivares de feijão-caupi com arborização que depende e independe de cultivo das bactérias. Inicialmente uma coleção de 86 bactérias de nódulos de feijão-caupi isoladas de solos do semiárido foi caracterizada geneticamente pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e dos genes simbióticos *nifH* e *nodC*. As sequências foram comparadas com as do banco de dados do NCBI para identificar os isolados e as relações filogenéticas dos mesmos com as de espécies conhecidas. Em outro estudo, aplicou-se o método independente de cultivo para avaliar comunidades de bactérias associadas aos nódulos de dois cultivares de feijão-caupi (BRS Pujante e BRS Acauã), em Argissolo Amarelo sem histórico de uso com a lavoura. Os nódulos (N) foram coletados 35 dias após a germinação e a amostragem do solo (BS) de 0-20 cm. O DNA das amostras foi extraído para análises das comunidades bacterianas com 454 pirosequenciamento do gene ribossomal 16S rRNA. Na análise da diversidade da coleção de nódulos 54 dos 86 dos isolados foram de *Bradyrhizobium*. Os demais (32) pertencem aos gêneros *Rhizobium* (13) e *Microvirga* (1), classe Alphaproteobactéria; *Burkholderia* (8) e *Ralstonia* (1), classe Betaproteobactéria; *Acinetobacter* (1), *Cronobacter* (3), *Enterobacter* (1) e *Pantoea* (1), Gamaproteobactéria; e *Leifsonia* (3), filo Actinobactéria. Como *Bradyrhizobium* predominou, foram feitas análises com os genes 16S rRNA, *nifH* e *nodC* e os isolados distribuíram-se em 5 linhagens: 16S rRNA tipo I (44 isolados), tipo II (6), tipo III (1), tipo IV (2) e tipo V (1). A análise filogenética do gene 16S rRNA agrupou a linhagem tipo I no grande grupo *Bradyrhizobium japonicum* e próximo da estirpe tipo de *Bradyrhizobium yuanmingense*. A análise dos genes *nifH* e *nodC* separou os isolados em 5 linhagens simbióticas (I, II, III, IV e V) e as árvores foram congruentes, o que suporta a teoria da origem monofilética de genes simbióticos em *Bradyrhizobium*. As linhagens simbióticas I e II são próximas e correspondem a todos os isolados com 16S rRNA tipo I, sendo o grupo dominante associado aos nódulos. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das comunidades bacterianas mostrou alta diversidade nos três ambientes (BS, RS e N). As comunidades associadas aos nódulos foram significativamente diferentes ($p > 0,01$) das que cercam os nódulos (LS e RS). Os filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria foram abundantes para BS e RS. Em nódulos, os filos Proteobacteria e Bacteroidetes predominaram, sendo Gammaproteobacteria (58,8%) e Alphaproteobacteria (37,4%) dominantes no filo Proteobacteria e Flavobacteriia (84,8%) e Sphingobacteriia (10,9%) no filo Bacteroidetes. Para gênero, *Chryseobacterium*, *Enterobacter* e *Bradyrhizobium* dominam em todas as amostras de nódulos, onde *Chryseobacterium* predominou em BRS Acauã e *Enterobacter* em BRS Pujante.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*. Diversidade. Comunidades de bactérias. Simbiontes.

GENERAL ABSTRACT

LEITE, Jakson. **Symbiosis cowpea and rhizobia: bacteria diversity associated to root nodules**. 2015. 75p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] is an important crop in northeastern Brazil with strategic advantages for production in semi-arid region, such its drought tolerance and good performance in low fertility soils. In addition, the nitrogen (N) fixed in symbiosis with rhizobia eliminates the demand for N fertilizers, with economic, social and environmental benefits. Little is known about the genetic diversity of bacteria associated to cowpea nodules in Brazilian semi-arid. The aim of the study was to characterize the bacterial diversity of Brazilian semi-arid soils associated with nodules of different cowpea cultivars by dependent and independent bacterial cultivation strategy. Initially a collection of 86 bacteria cowpea nodules isolated from semiarid soils was genetically characterized by partial 16S rRNA gene sequencing and symbiotic genes *nifH* and *nodC*. The sequences were compared with the NCBI database to identify isolates and phylogenetic relationships were built. In another study, we applied the independent cultivation method to evaluate bacterial communities associated with the nodules of two cowpea cultivars (BRS and BRS Acauã Pujante), in Ultisol with no history of cowpea cultivation. Nodules (N) were collected 35 days after germination, and soil samples (BS) from 0-20 cm deeper. DNA was extracted for analysis of bacterial communities with 454 pyrosequencing of the 16S ribosomal gene rRNA. The analysis of the diversity of the bacterial collection of the nodules 54 of the 86 isolates were *Bradyrhizobium*. Other (32) belong to *Rhizobium* (13) and *Microvirga* (1), Alphaproteobacteria class; *Burkholderia* (8), and *Ralstonia* (1), Betaproteobacteria class; *Acinetobacter* (1), *Cronobacter* (3), *Enterobacter* (1), and *Pantoea* (1), Gamaproteobacteria; and *Leifsonia* (3), phylum Actinobacteria. As *Bradyrhizobium* predominated, analyzes were performed with the almost full 16S rRNA, *nifH* and *nodC* and isolates were distributed in 5 lines: 16S rRNA type I (44 isolates), type II (6), Type III (1), Type IV (2) and type IV (1). Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene grouped the Type I strain in the large group *Bradyrhizobium japonicum* and close to the type strain of *Bradyrhizobium yuanmingense*. The analyses of the *nifH* and *nodC* gene separated the isolates in 5 symbiotic lines (I, II, III, IV and IV) and were congruent among them, which supports the theory of monophyletic in origin symbiotic gene Bradyrhizobium. The symbiotic lineages I and II are nearby and correspond to all isolates with 16S rRNA type I, being the dominant group associated with nodules. The partial 16S rRNA gene sequencing of bacterial communities showed high diversity in the three environments (BS, RS and N). The communities associated with the nodes were significantly different ($p > 0.01$) from the surrounding nodules (LS and RS). Phyla Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria were plentiful for BS and RS. In nodes, the Proteobacteria and Bacteroidetes phyla predominated, Gammaproteobacteria being (58.8%) and Alphaproteobacteria (37.4%) in the phylum Proteobacteria and dominant Flavobacteriia (84.8%) and Sphingobacteriia (10.9%) in the phylum Bacteroidetes. For gender, *Chryseobacterium*, *Entreobacter* and *Bradyrhizobium* dominate in all nodes samples where *Chryseobacterium* prevailed in BRS Acauã and *Enterobacter* in BRS Pujante.

Key words: *Vigna unguiculata*. Diversity. Bacterial communities. Symbionts

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Árvore construída com o método *Neighbor Joining* com base no gene 16S rRNA (1015 pb) mostrando as relações filogenéticas entre bactéria isoladas de nódulos de feijão-caupi (em negrito) e estirpes tipo e referência de *Rhizobium*. Os valores de bootstrap foram calculados com base em 1000 replicatas e são indicados quando $\geq 50\%$. *Microvirga vignae* foi usada como *outgroup*. Bar, 1 substituição a cada 100 bases..... 20.
- Figura 2.** Árvore construída com o método *Neighbor Joining* com base no gene 16S rRNA (1120 pb) mostrando as relações filogenéticas entre bactéria isoladas de nódulos de feijão-caupi (em negrito) e algumas estirpes tipo e referência dos gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia*. Os valores de bootstrap foram calculados com base em 1000 replicatas e são indicados quando $\geq 50\%$. A estirpe tipo MWAP64^T da espécie *Burkholderia caribiensis* não foi isolada de nódulo de leguminosa. Bcc: *Burkholderia cepacia*-complex. Bar, 1 substituição a cada 100 bases..... 21.
- Figura 3.** Árvore construída com o método *Neighbor Joining* com base no gene 16S rRNA (965 pb) mostrando as relações filogenéticas entre bactéria isoladas de nódulos de feijão-caupi (em negrito) e estirpes tipo e referência dos gêneros *Leifsonia*. Os valores de bootstrap foram calculados com base em 1000 replicatas e são indicados quando $\geq 50\%$. Bar, 1 substituição a cada 1000 bases. “●”, estirpes isoladas de nódulos. Sequências do isolados de *Clitoria terantea* gentilmente cedidas por Nunes (2013). 23.
- Figura 4.** Árvore mostrando as relações filogenéticas entre estirpes representativas dos grupos I a V de *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos de feijão-caupi e estirpes tipo (T) de *Bradyrhizobium* com base no gene 16S rRNA (1220 pb). A árvore foi construída com o método de *Maximum likelihood* (ML). Os valores de bootstrap foram calculados com base em 500 replicatas e são indicados quando $\geq 50\%$. Brechas com círculo preto mostraram valores de bootstrap $\geq 50\%$ em análise independente usando o método de *neighbor joining*. Bar, 5 substituições a cada 100 bases. J: Juazeiro-BA e P: Petrolina-PE, Brasil. *Microvirga vignae* BR3299^T foi usada como *outgroup* 26.
- Figura 5.** Árvore mostrando as relações filogenéticas entre 54 isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi e estirpes tipo (T) de *Bradyrhizobium* com base no gene *nifH* (489 pb). A árvore foi construída com o método de *Maximum likelihood* (ML). Os valores de bootstrap foram calculados com base em 500 replicatas e são indicados quando $\geq 70\%$. Brechas com círculo preto mostraram valores de bootstrap $\geq 70\%$ em análise independente usando o método de *neighbor joining*. Bar, 2 substituições a cada 100 bases. J: Juazeiro-BA e P: Petrolina-PE, Brasil. Os códigos Ia, Ib, II, III, IV e V representam diferentes linhagens do gene *nifH*..... 28.
- Figura 6.** Árvore mostrando as relações filogenéticas entre 48 isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi e estirpes tipo (T) de *Bradyrhizobium* com base no gene *nodC* (411 pb). A árvore foi construída com o método de *Maximum likelihood* (ML). Os valores de bootstrap foram calculados com base em 500 replicatas e são indicados quando $\geq 70\%$. Brechas com círculo preto mostraram valores de bootstrap $\geq 70\%$ em análise independente usando o método de *neighbor joining*. Bar, 5 substituições a cada 100 bases.

J: Juazeiro-BA e P: Petrolina-PE, Brasil. Os códigos I, II, III, IV e V representam diferentes linhagens do gene *nodC*29.

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Curvas de rarefação do gene 16S rRNA mostrando a relação entre o número de sequências e o número de UTOs (média de quatro repetições) de amotas solo, rizosfera (R) e nódulos de duas cultivares de feijão-caupi, BRS Acauã (A) e BRS Pujante (P)..... 42.
- Figura 2.** Abundância relativa do número de UTOs do gene 16S rRNA dos filamentos encontrados nas amostras de solo e rizosfera e nódulos de duas cultivares de feijão-caupi (BRS Acauã e BRS Pujante)..... 43.
- Figura 3.** Grupos taxonômicos encontrados nas amostras de nódulos (A) e gêneros mais abundantes (>100 sequências) com respectivos número de UTOs ocorrentes (B)..... 44.
- Figura 4.** Diagrama de Venn mostrando a ocorrência dos gêneros de bactérias em nódulos de cultivares (BRS Acauã e BRS Pujante) de feijão-caupi 45.
- Figura 5.** UTOs mais frequentes nas amostras (A1-4) de nódulos dos cultivares de feijão-caupi BRS Acauã e BRS Pujante..... 48.
- Figura 6.** Relações filogenéticas entre as UTOs (azul) mais frequentes nos nódulos identificadas com *Chryseobacterium* (A), NI *Entreobacteriaceae* (B) e *Bradyrhizobium* (C) com o 16S rRNA de estirpes tipos de gêneros relacionados. A análise filogenética foi feita no ARB usando o método Neighbour-joining. O número de acesso das sequências das estirpes tipo são fornecidas antes do nome da espécie 49.

ÍNDICES DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Identificação dos isolados obtidos de nódulos de cultivares de feijão-caupi com base na sequência parcial do 16S rRNA (NT, nucleotídeos)..... 18.

Tabela 2. Linhagens de *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos de feijão-caupi de solos de Juazeiro-BA (J) e Petrolina-PE (P) com base nos genes 16S rRNA, *nifH* e *nodC*.....25.

Tabela 3. Similaridade dos genes *nifH* e *nodC* entre isolados de *Bradyrhizobium* com 16S rRNA tipo I e estirpes tipo de *Bradyrhizobium*31.

CAPÍTULO II

Tabela 1. Sequência dos *primers* 27F usados para amplificação do 16S rRNA das amostras de solo, rizosfera e nódulos 39.

Tabela 2. Valores estatísticas de UTOs e perfil ecológico de comunidades de bactérias com base no sequenciamento parcial do 16S rRNA de amostras ambientais (solo, rizosfera e nódulos)41.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cultivo de Feijão-caupi no Brasil	3
2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio em Feijão-caupi.....	4
2.3 Bactérias que Nodulam Leguminosas	5
2.4 Bactérias Endofíticas de Nódulos de Leguminosas	8
2.5 Técnicas de Biologia Molecular para Caracterizar a Diversidade de Bactérias de Nódulos de Leguminosas.....	9
3. CAPÍTULO I. DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp] EM SOLOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO	11
3.1 RESUMO	12
3.2 ABSTRACT	13
3.3 INTRODUÇÃO	14
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.4.1 Origem dos isolados.....	15
3.4.2 Extração de DNA.....	15
3.4.3 Amplificação (PCR) e sequenciamento do gene 16S rRNA	15
3.4.4 Amplificação (PCR) dos genes simbióticos <i>nifH</i> e <i>nodC</i>	16
3.4.5 Análise das sequências.....	16
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.5.1 Identificação e diversidade dos isolados com base no 16S rRNA.....	17
3.5.2 Isolados da classe Alphaproteobacteria.....	17
3.5.3 Isolados da classe Betaproteobacteria.....	21
3.5.4 Isolados da classe Gamaproteobacteria	22
3.5.5 Isolados do gênero <i>Leifsonia</i> (Actinobacteria)	23
3.5.6 Isolados de <i>Bradryhizobium</i> spp.....	24
3.6 CONCLUSÕES.....	32
4. CAPÍTULO II. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS NÓDULOS DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp] ANALIZADAS POR PIROSEQUENCIAMENTO	33
4.1 RESUMO	34
4.2 ABSTRACT	35
4.3 INTRODUÇÃO	36
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.2.1 Desenho experimental e coleta de amostras de solo e nódulos	38
4.2.2 Extração de DNA.....	38
4.2.3 Pirosequenciamento do gene 16S rRNA	39
4.2.4 Análise dos dados	40
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.3.1 Número de UTOs e índices ecológicos.....	41
4.3.2 Análise taxonômica com base da sequência parcial do gene 16S rRNA.....	42
4.3.3 UTOs mais frequentes	47
4.6 CONCLUSÕES.....	53

5. CONCLUSÕES GERAIS.....	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8. ANEXO	73

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma das principais culturas da agricultura familiar, excepcionalmente no semiárido brasileiro, por ser uma importante fonte de proteína vegetal. Esta cultura apresenta vantagens estratégicas para desenvolvimento nos solos do semiárido, como tolerância a seca e bom desempenho em solos de baixa fertilidade (MORTIMORE et al., 1997). Além disso, o feijão-caupi fixa nitrogênio de forma eficiente em simbiose com rizóbios (BELANE et al., 2011; ALCANTARA et al., 2014), diminuindo ou mesmo eliminando a dependência desta cultura por fertilizantes nitrogenados, o que representa benefícios econômico-sociais e ambientais. Para que uma simbiose eficiente ocorra, é necessária a inoculação com bactérias previamente selecionadas quando a capacidade de nodular e fixar nitrogênio com a cultura (MARTINS et al., 2003; LACERDA et al., 2004; SILVA JÚNIOR et al., 2014).

Estudos realizados na África, na Ásia e no Brasil indicam a predominância de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (crescimento lento e reação básica em meio de cultura) como principais endosimbiontes de feijão-caupi (ZILLI et al., 2006; ZHANG et al. 2008; PULE-MEULENBERG et al. 2010; GUIMARÃES et al., 2012; JARAMILLO et al., 2013). No Brasil, o primeiro relato da identidade genética dos rizóbios de nódulos de feijão-caupi no Brasil foi feito por Zilli et al (2006) ao caracterizar uma coleção de isolados obtidos de solos do Cerrado no estado do Piauí. Posteriormente, estes realados ocorreram para a região Norte (GUIMARÃES et al., 2012) suportando a ideia de que *Bradyrhizobium* é o simbiote comum de feijão-caupi. No semiárido do Nordeste do Brasil, estudos geraram uma coleção de mais de 600 isolados de solos do semiárido (MARTINS et al. 2003; LEITE et al. 2009). Esses estudos mostraram um alto nível de diversidade morfo-cultural e genética dos rizóbios associados aos nódulos de feijão-caupi. Interessantemente, o estudo conduzido por Leite et al (2009) na região do Submédio do Vale do São Francisco mostrou que 65% da coleção de quase 600 isolados apresentaram crescimento rápido e reação ácida no meio de cultura. Essa observação indicou que existe uma grande diversidade genética de rizóbios não explorada nos solos do semiárido que se associam com feijão-caupi em condições naturais.

Como exemplo do potencial dessa diversidade genética não explorada pode-se destacar a descrição de uma nova espécie de rizóbio, *Microvirga vignae*, que foi isolada de solos do semiárido a partir de nódulos de feijão-caupi (RADL et al., 2014). A descoberta dessa nova espécie a partir de nódulos de feijão-caupi enfatiza a noção de que rizóbios que não pertencem à família Bradyrhizobiaceae possam representar uma fonte não explorada para o desenvolvimento de novos insumos para a agricultura sustentável. Com relação a isso, também vale lembrar que os meios de cultura usados para isolar bactérias são invariavelmente seletivos para certos grupos de microrganismos, e estima-se que no máximo 1% das bactérias existentes no solo podem ser facilmente cultiváveis por métodos tradicionais de cultivo (AMMAN et al., 1995). A aplicação de métodos moleculares para estudar a comunidade bacteriana como um todo, de forma independente de cultivo, é uma forte alternativa para conhecer a real diversidade microbiana. Esse conhecimento é estratégico para poder direcionar tentativas de isolamento de novos microrganismos com potencial biotecnológico e ampliar o conhecimento da diversidade bacteriana, essencialmente àquela relacionada a processos de interesse biotecnológico como a fixação biológica de nitrogênio.

A capacidade que o feijão-caupi possui de estabelecer associação com uma ampla diversidade de bactérias (GUIMARÃES et al., 2012, JARAMILLO et al., 2013) e a

importância econômica que apresenta para a agricultura no Nordeste fazem dessa leguminosa uma importante espécie para estudos de ecológica de rizóbio nos solos do semiárido do Brasil.

A hipótese desse trabalho é que em solos do semiárido do Brasil os nódulos de feijão-caupi abrigam uma alta diversidade de bactérias. O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a diversidade de bactérias de solos do semiárido do Brasil associadas aos nódulos de diferentes cultivares de feijão-caupi utilizando arborização que depende e independe de cultivo das bactérias.

No Capítulo I – “Diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] em solos do semiárido” - o objetivo foi caracterizar uma coleção de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi de solos do semiárido do Brasil. No Capítulo II – “Diversidade de bactérias associadas aos nódulos de cultivares de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] analisadas por pirsequenciamento - o objetivo foi avaliar a diversidade de comunidades de bactérias associadas aos nódulos de cultivares de feijão-caupi em uma área sem histórico de presença da cultura usando técnica independente de cultivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultivo de Feijão-caupi no Brasil

O feijão-caupi é uma cultura muito conhecida entre os agricultores de base familiar do Norte e Nordeste do Brasil. Acredita-se que esta cultura tem sua origem na África, com centro de diversificação na Nigéria (VAILLANCOURT & WEEDEN, 1992). E foi introduzida no Brasil pela Bahia no período da colonização e então espalhada pelo Norte e Nordeste do Brasil (FREIRE FILHO et al., 2011). Assume importância estratégica na dieta alimentar de agricultores de base familiar por ser uma importante fonte de proteínas, apresentando conteúdo protéico na ordem de 23 a 30%, dependendo do cultivar (SILVA et al., 2002), sendo também rica em ferro, zinco e potássio (FROTA et al., 2008) e vitaminas do complexo B (MOREIRA et al., 2008).

O Brasil é o maior produtor de feijões no mundo e maior consumidor de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (DAMASCENO-SILVA, 2009). A produção está concentrada nas regiões Norte e Nordeste, mas tem avançando para áreas do Centro-Oeste (FREIRE FILHO et al., 2011). A estatística da produção de feijão-caupi no Brasil está agregada a de feijão-comum (feijões), não havendo dados oficiais para a cultura. Uma contribuição à informação sobre a estatística específica da produção de feijão-caupi no Brasil vem sendo feita pela Embrapa Arroz e Feijão. Em 2013, a área plantada com feijão-caupi foi de 935.465 ha com produção de 371.748 t, sendo o Nordeste a região com maior área plantada (211.536 ha). A produtividade média nacional foi de 397 kg ha⁻¹ e regional de 695 kg ha⁻¹ no Norte, 276 kg ha⁻¹ no Nordeste e 1.070 kg ha⁻¹ no Centro-Oeste. Os estados do Mato Grosso (124.081 t), Ceará (52.253 t) e Maranhão (42.200t) (EMBRAPA, 2014).

Embora seja comum em sistemas de produção agrícola a baixa adoção de tecnologias, como nas áreas de pequenos produtores, o feijão caupi avança para cenários agrícolas onde o aporte tecnológico é alto (FREIRE FILHO et al., 2011). O cultivo de feijão caupi surgiu como oportunidade tecnológica em substituição ao milho safrinha, plantado logo depois da retirada da soja, especialmente em Primavera do Leste no estado do Mato Grosso (SINIMBU, 2009). Os agricultores desta região encontraram nesta cultura a oportunidade de boas produções em suas propriedades na entre safra da soja, período em que as chuvas nem sempre permitem altos rendimentos do milho, por exemplo. Em 2013, a área plantada no Centro-Oeste com feijão-caupi foi de 115.926 ha, com produtividade média de 1.070 kg ha⁻¹, superando média nacional de 397 kg ha⁻¹ (EMBRAPA, 2014).

O feijão-caupi é uma cultura cujo aporte de nitrogênio pode ser atendido pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) quando em associação com estirpes de *Bradyrhizobium* spp. (RUMJANEK et al., 2006; ZILLI et al., 2008), o que representa uma vantagem estratégica para a gestão de nitrogênio em sistemas agrícolas, uma vez que permite a redução ou elimina o uso de fertilizantes nitrogenados. Na região Centro-Oeste e Norte do Brasil, a inoculação de sementes de feijão-caupi com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a cultura proporcionou produtividades médias de 1.500 kg ha⁻¹ no Centro-Oeste e Norte do Brasil, acima das médias regionais (SILVA JÚNIOR et al., 2014). Os resultados encontrados por Silva Júnior et al. (2014) mostram a importância da FBN para promover a produtividade das lavouras de feijão-caupi.

2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio em Feijão-caupi

A produtividade agrícola está associada a diversos fatores para atingir altas produtividades, como, por exemplo, a disponibilidade de nutrientes no solo. Dentre os nutrientes, o nitrogênio (N) é um dos elementos limitantes ao desenvolvimento das plantas, sendo classificado, dentro dos critérios de essencialidade, como macronutriente primário. No entanto, os solos da zona tropical são, em geral, pobres em N, requerendo o suprimento deste elemento para que sejam alcançadas altas produtividades nas lavouras.

No ciclo biogeoquímico do N, a entrada deste elemento no solo possui uma via biológica resultante da interação entre grupos de procariotos diazotróficos e plantas vasculares, resultando no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Esse processo é comum em plantas da família das leguminosas, e identificado pela presença de uma estrutura peculiar na raiz resultante da associação planta-bactéria, o nódulo.

A fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi quando inoculado, dispensa a necessidade de adubação nitrogenada (BRITO et al., 2011). Aumentos de 30 a 50% no rendimento de grãos do feijão-caupi têm sido evidenciados pela prática da inoculação com estirpes de rizóbio eficientes (MARTINS et al., 2003; LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; CHAGAS JUNIOR et al., 2010; SILVA JÚNIOR et al., 2012; MARINHO et al., 2014; SILVA JÚNIOR et al., 2014).

No Brasil, quatro estirpes são recomendadas como inoculante agrícola para feijão-caupi: UFLA 3-84 (=SEMIA 6461), BR 3627 (=SEMIA 6462), INPA 03-11B (=SEMIA 6463) e BR 3262 (=SEMIA 6464), todas pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. As estirpes UFLA 3-84 e INPA 03-11-B, isoladas da região amazônica, foram selecionadas e recomendadas pelo grupo de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e induziram o rendimento de grãos em feijão-caupi de 1272 e 1341 kg ha⁻¹, respectivamente, num Argissolo Vermelho-Amarelo no município de Pedrões-MG. Neste mesmo experimento o controle sem inoculação e sem adubação nitrogenada produziu 1021 kg ha⁻¹, em quanto o tratamento com adubação com N teve rendimento de 1413 kg ha⁻¹, não sendo estatisticamente diferente dos tratamentos com inoculação (LACERDA et al., 2004).

As estirpes BR3267 e BR3262 foram selecionadas e recomendadas por grupos de pesquisa da Embrapa Agrobiologia e Embrapa Roraima, respectivamente (RUMJANEK et al., 2006; ZILLI et al., 2008). A estirpe BR3267 foi isolada de solo do semiárido e promoveu rendimento de grãos de 700 kg.ha⁻¹ em feijão-caupi cultivados sob condição de sequeiro no Nordeste (MARTINS et al., 2003). Posteriormente, foi mostrado que a estirpe BR 3267 promove ganhos de 50% na produtividade de grãos de feijão-caupi em áreas de produtores agrícolas de base familiar (RUMJANEK et al., 2006). A BR3262 foi isolada de um sistema de produção orgânica no Rio de Janeiro e é a estirpe mais recentemente recomendada como inoculante de feijão-caupi. No estado de Roraima, a BR3262 induziu rendimento de grãos superiores a 2300 kg.ha⁻¹ com produtividade de 34% maior que o controle (ZILLI et al., 2009).

Diversos trabalhos reportam a eficiência agrônômica das estirpes UFLA 3-84 (=SEMIA 6461), BR3627 (=SEMIA 6462), INPA 03-11B (=SEMIA 6463) e BR3262 (=SEMIA 6464) em diferentes sistemas de produção agrícola nas regiões Norte (ZILLI et al., 2009; CHAGAS JUNIOR et al., 2010; SILVA JÚNIOR et al., 2014), Nordeste (MARTINS et al., 2003; MARINHO et al., 2014), Sudeste (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; SILVA JÚNIOR et al., 2012; SILVA JÚNIOR et al., 2014) e Centro-Oeste (SILVA JÚNIOR et al., 2014) do Brasil. Os testes mostram que o desempenho das estirpes para promover o rendimento de grãos em feijão-caupi é variável, dependendo do cultivar usado (MELLO & ZILLI, 2009, CHAGAS JUNIOR et al., 2010; MARINHO et al., 2014), das práticas de

manejo adotadas (FREITAS et al., 2012) e a densidade de células da estirpe no inoculante (SILVA JÚNIOR et al., 2014).

A FBN é uma via importante na nutrição de nitrogênio para o feijão-caupi (BRITO et al., 2011), sendo que sua contribuição varia de acordo com o genótipo (BELANE & DAKORA, 2009, 2010, FREITAS et al., 2012; ALCANTARA et al., 2014). Pode-se considerar que a atividade de FBN em campo é produto da interação genótipo da planta e estirpe usada como inoculante sob efeito das condições edafoclimáticas (MELLO & ZILLI, 2009; CHAGAS JÚNIOR et al., 2010). Nem sempre o bom desempenho entre os pares simbióticos (planta x bactéria) alcançados em experimentos controlados em casa-de-vegetação mostram comportamento correspondente em campo (MELLO & ZILLI, 2009).

Variedades de feijão-caupi recomendadas para a região nordeste do Brasil mostraram diferenças quanto a resposta a inoculação com estirpes de rizóbio (VIEIRA et al., 2010), assim como variedades recomendadas para o estado de Roraima (MELLO & ZILLI, 2009). Belane & Dakora (2010) verificaram que genótipos africanos de feijão-caupi apresentam diferentes potenciais para FBN com estimativas de contribuição variando entre 56,2 a 96,3%, com quantidades de N-fixado variando de 62 a 198 kg N ha⁻¹. Os autores encontraram relação direta do N fixado via FBN e a produção de grãos.

No Brasil, Alcantara et al. (2014) avaliaram genótipos de feijão-caupi, usados no programa de melhoramento no Brasil, em resposta a inoculação às estirpes BR3262, BR3267, BR3299 e INPA 3-84. Os autores identificaram que os genótipos respondem a inoculação com contribuição da FBN variando entre 49 a 65%. Freitas et al. (2012) também identificaram variabilidade quanto a resposta da FBN em variedades de feijão-caupi recomendadas para o Nordeste do Brasil, com contribuições variando de 47 a 79%, variando de acordo com a estirpe inoculada. Em ambos os estudos, a variabilidade da contribuição da FBN dependeu do genótipo de feijão-caupi e da estirpe de bactéria usada como inoculante. Essa variabilidade da interação planta e bactéria de todo modo é promissor para seleção de pares simbióticos (planta x bactéria) eficientes.

Silva Júnior et al. (2014) relatam que aos 15 dias após a germinação, o feijão-caupi fixa entre 6 a 26 kg ha⁻¹ de N, dependendo da estirpe utilizada como inoculante. Os autores analisaram o nitrogênio no grão e relataram contribuições da fixação biológica do nitrogênio entre 38 a 56%, novamente variando de acordo com a estirpe inoculada. Essa variabilidade de resposta depende da estirpe inoculada confirma a importância da seleção de bactérias que nodulam e fixam nitrogênio com feijão-caupi.

2.3 Bactérias que Nodulam Leguminosas

Bactérias são encontradas colonizando diversos ambientes. No solo, as bactérias apresentam comunidades complexas que desempenham diversas funções, estabelecendo relações ecológicas, benéficas ou não, com diversos organismos. Uma parte das comunidades de bactérias residentes do solo está relacionada ao ciclo biogeoquímico do nitrogênio, como as bactérias diazotróficas (VITOUSEK et al., 2013). As bactérias diazotróficas conseguem converter o nitrogênio atmosférico N₂ em NH₃ (amônia), em ambientes com baixa concentração de oxigênio (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Esse processo é possível devido à atividade da nitrogenase, enzima responsável pela quebra da tripla ligação entre os dois átomos de nitrogênio (N₂).

Bactérias fixadoras de nitrogênio são organismos importantes no ambiente, pois possibilitam que as plantas, por exemplo, possam ter acesso ao N₂ abundante na atmosfera (~78% N), atuando como importantes vias biológicas para entrada do N no solo (VITOUSEK et al., 2013). Este grupo de bactérias estabelecem relações com raízes de plantas em diferentes

graus de especialização onde, pelo menos, três classes são bem conhecidas: as bactérias associativas, as endofíticas e as simbióticas (SANTI et al., 2013; UDVARDI & POOLE, 2013). A simbiose entre rizóbio e leguminosas talvez represente o grau de associação benéfica mais especializada entre planta e bactéria. Rizóbio é o termo genérico empregado para o grupo de bactérias diazotróficas que formam nódulos em raízes (e ocasionalmente no caule) de leguminosas e fixam nitrogênio. A formação dos nódulos em leguminosas, por bactérias, é estimulado por fatores de nodulação. Os genes *nod*, *nol* e *noe* codificam as proteínas que são responsáveis pela comunicação química entre a bactéria simbiote e a planta hospedeira durante o processo de nodulação (KRISHNAN et al., 1995).

Nos nódulos, após invasão pelo cordão de infecção, o rizóbio se diferencia em bacteroides e é envolto em uma membrana produzida pela planta, formando o simbiosoma. Após a formação do simbiosoma, o rizóbio fixa o nitrogênio que é fornecido à planta, recebendo, em troca, compostos ricos em carbono, aminoácidos e vitaminas (UDVARDI & POOLE, 2013). É no nódulo que ocorre a comunicação mais estreita entre a planta e bactéria simbiote. O nódulo é a estrutura física (fenótipo) tomada como ponto de partida para o isolamento de rizóbios em estudos de diversidade. Neste caso, emprega-se a estratégia de captura com plantas-iscas, que basicamente consiste no conceito de capturar do ambiente (amostra ambiental) grupos de bactérias que apresentem capacidade de estabelecer simbiose por meio da nodulação com o hospedeiro em questão (espécie de interesse).

A simbiose mutualística entre rizóbio e leguminosa é identificada pela presença dos nódulos nas raízes ou caules de leguminosas. O nódulo é a unidade tecidual da planta que abriga o rizóbio, portanto é o fenótipo que indica a capacidade nodulífera em leguminosas. O nódulo pode apresentar crescimento determinado ou indeterminado (quando o meristema do nódulo continua ativo mesmo depois da formação da zona de fixação) e esta característica é intrínseca da planta (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). No nódulo as bactérias se diferenciam em bacteróides que são envoltos em uma membrana. O conjunto formado pela membrana vegetal e bacteróide é chamado de simbiosoma. A membrana do simbiosoma é o elo de comunicação entre a célula bacteriana e o citoplasma da célula vegetal, onde ocorrem as trocas de carbono, derivado da fotossíntese, pelo nitrogênio, vindo da fixação do nitrogênio pela atividade da nitrogenase, enzima bacteriana (UDVARDI & POOLE, 2013). A disponibilidade de carbono e outros fatores importantes para o metabolismo bacteriano fazem do nódulo um habitat estratégico, mesmo que temporário, onde a competição por recursos é praticamente inexistente.

Embora o nódulo seja um ambiente mais restrito à colonização por bactérias, a diversidade bacteriana no nódulo parece ser alta. Segundo Peix et al. (2015), foram descritas 197 espécies de rizóbios que são distribuídas em 14 gêneros nas classes Alpha (α -Proteobacteria) e Betaproteobactéria (β -Proteobacteria). Os gêneros *Rhizobium*, *Ensifer* (= *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* congregam mais de 85% das espécies de bactérias que nodulam leguminosas. Juntas, as espécies pertencentes a estes gêneros formam o grupo clássico de rizóbios. Moreira & Siqueira (2006) descrevem características fenotípicas típicas, em meio YMA (= meio 79) de bactérias pertencentes a estes gêneros pelas quais é possível separá-las em dois grandes grupos fenotípicos. As bactérias que apresentam crescimento rápido (três dias para surgimento das colônias) ou intermediário (quatro a cinco dias para surgimento das colônias) e mostram reação ácida ou neutra no meio de cultivo, normalmente pertencem aos gêneros *Rhizobium*, *Ensifer* (= *Sinorhizobium*) e *Mesorhizobium* (crescimento intermediário). Por outro lado, bactérias com crescimento lento (seis dias ou mais para surgimento das colônias) e reação alcalina no meio de cultivo indicam fenótipo tipo de *Bradyrhizobium* ou *Azorhizobium*. No entanto, a espécie *Azorhizobium doebereinae*, um simbiote comum de *Sesbania virgata* foge a estes padrões

(MOREIRA et al., 2006). Estirpes pertencentes a esta espécie apresentam crescimento rápido e reação alcalina no meio de cultivo YMA (= meio 79) (FLORENTINO et al., 2009; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Importantes descobertas expandiram as fronteiras da pesquisa a cerca da diversidade microbiana da simbiose rizóbio-leguminosa. No ano de 2001, início do século, foi descoberto que o gênero *Burkholderia* (Betaproteobacteria) possuem membros com capacidade para nodular leguminosas (MOULIN et al., 2001). Posteriormente, foi comprovado que *Cupriavidus*, gênero membro da classe Betaproteobactéria, também nodula leguminosa (CHEN et al., 2003; SILVA et al., 2012). Novos levantamentos foram feitos e afirmou-se que *Burkholderia* spp são simbioses comuns em nódulos de espécies de alguns membros da subfamília Mimosoideae (*Mimosa* spp.) em solos tropicais, essencialmente no Brasil (BONTEMPS et al., 2010, BOURNAUD et al., 2013). No entanto, *Burkholderia* spp já foram isoladas de nódulos de leguminosas de importância agrícola como feijão-comum (TALBI et al., 2010) e feijão-caupi (GUIMARÃES et al., 2012), indicando que a faixa de possíveis hospedeiros vai além da subfamília Mimosoideae. De acordo com Peix et al. (2015) 14 diferentes espécies de *Burkholderia* nodulam leguminosas. Embora o gênero *Burkholderia* abrigue espécies consideradas como patógeno humano, o grupo de *Burkholderia* associadas a espécies vegetais apresentam um ramo filogenético consistente e separado das espécies de *Burkholderia* associadas a patologias em humanos (ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2013). A descoberta de que membros dos gêneros *Burkholderia* e *Cupriavidus* têm capacidade de nodular leguminosas representou uma nova fronteira para a pesquisa em ecologia de rizóbio. Por pertencerem a subclasse Betaproteobacteria, os novos simbioses foram chamados de β -rizóbio (beta-rizóbio) (MOULIN et al., 2001).

Outro avanço importante ocorreu dentro da subclasse da Alphaproteobacteria, quando uma nova espécie nodulante não pertencente ao grupo comum de rizóbio foi descrita: *Methylobacterium nodulans*, isolada de nódulo de *Crotalaria* spp. (SY et al., 2001; JOURAND et al., 2004). Posteriormente novas estirpes pertencentes a outros gêneros do filo α -Proteobactérias também foram isoladas de nódulos e confirmadas como nodulantes, como por exemplo: *Devosia neptuniae* (RIVAS et al., 2003), *Phyllobacterium trifolii* (VALVERDE et al. 2005), *Ochrobactrum lupini* (TRUJILLO et al., 2005), *Shinella kummerowiae* (LIN et al., 2008), *Microvirga zambiensis* (ARDLEY et al. 2012), *Microvirga vignae* (RADL et al., 2014). As revisões de Balachandar et al. (2007) e Peix et al. (2015) apresentam características referentes ao isolamento destes novos simbioses. Uma nova espécie isolada a partir de rejeitos da atividade de mineração, descrita como *Aminobacter anthyllidis*, foi comprovada como estirpe nodulante (MAYNAUD et al., 2012). O estudo de Maynaud et al. (2012) explorou dois importantes fatores para a descobertas de novas espécies simbióticas de leguminosas: (i) utilizaram uma leguminosa não comumente empregada como planta-isca e (ii) explorarem uma amostra ambiental incomum (área de mineração). Este estudo ainda levantou uma questão importante sobre a identidade taxonômica dos gêneros *Aminobacter* e *Mesorhizobium*. Os dois gêneros parecem ser sinônimos. Fato semelhante ocorreu entre os gêneros *Ensifer* e *Sinorhizobium*, aonde se chegou a um consenso de que os dois gêneros são sinônimos (YOUNG, 2003).

Ainda dentro da subclasse da Alphaproteobacteria outra descoberta interessante foi feita no gênero *Bradyrhizobium*. Os genes relacionados à nodulação não foram encontrados no genoma das estirpes de *Bradyrhizobium* ORS278 e *Bradyrhizobium* BTai1 que nodulam *Aeschynomene sensitiva* e *Aeschynomene indica*, respectivamente (GIRAUD et al., 2007). Estas estirpes desenvolveram outros mecanismos, independente dos fatores de nodulação, para estabelecer a simbiose e representam uma linhagem genômica interessante dentro do gênero *Bradyrhizobium*. Os mecanismos de interação entre estirpes de *Bradyrhizobium* que

não tem os genes da nodulação com espécies de *Aeschynomene* ainda não são claros. Esta descoberta evidenciou que a presença dos fatores de nodulação comuns (nodABC) não são cruciais para o estabelecimento da simbiose *Bradyrhizobium-Aeschynomene* e levanta a questão de que uma bactéria nodulante não necessariamente possui genes de nodulação (GIRAUD et al., 2007).

2.4 Bactérias Endofíticas de Nódulos de Leguminosas

Embora a capacidade de nodulação venha sendo identificada em novos gêneros e espécies de bactérias pertencentes às subclasses Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria, a diversidade de bactérias presente nos nódulos de leguminosas vai além dos conhecidos alpha e beta-rizóbios. Muresu et al. (2008), por exemplo, isolaram, a partir de nódulos desinfestados de oito diferentes leguminosas, bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* e *Thiobacillus*, mas as estirpes não foram capazes de nodular a espécie hospedeira. Deng et al. (2011) isolaram 115 bactérias de nódulos de *Sphaerophysa salsula* na China, sendo que 65 bactérias não nodularam o hospedeiro e pertenciam a 17 espécies diferentes distribuídas nos gêneros *Paracoccus*, *Sphingomonas*, *Inquilinus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus* e *Bacillus*.

Bactérias isoladas de nódulos de leguminosas e que não são capazes de nodular o hospedeiro de origem são consideradas como bactérias endofíticas. Recentemente, De Meyer et al. (2015) identificaram uma larga diversidade de bactérias endofíticas de nódulos. Os autores caracterizaram 654 isolados obtidos de nódulos de 30 espécies de leguminosas na Bélgica e identificaram 50 diferentes gêneros, sendo a maioria dos isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus*. Segundo os autores, dos 50 gêneros encontrados 33 foram reportados pela primeira vez em nódulos, tais como: *Pantoea*, *Corynebacterium*, *Chryseobacterium*, *Sphingomonas* e *Xanthomonas*. Peix et al. (2015) revisaram a diversidade de bactérias associadas a nódulos de leguminosas e mostraram que 22 espécies foram descritas como endofíticas de nódulos. Os novos gêneros *Tardiphaga* (DE MEYER et al., 2012) e *Endobacter* (RAMÍREZ-BAHENA et al., 2013), por exemplo, foram descritos a partir de bactérias endofíticas isoladas de nódulos de *Medicago sativa* e *Robinia pseudoacacia*, respectivamente.

Normalmente, as bactérias endofíticas que colonizam os nódulos junto com os rizóbios, naturais simbioses da planta hospedeiras. Por exemplo, Bai et al (2002) identificaram a co-ocorrência de *Bacillus* (bactéria endofítica) e *Bradyrhizobium* (rizóbio) em nódulos de soja. De Meyer et al. (2015) também identificaram a co-ocorrência de *Bacillus* e *Bradyrhizobium* em várias leguminosas. Os mecanismos de colonização dos nódulos por bactérias endofíticas ainda não são bem elucidados. No entanto, Pandya et al. (2013) mostraram que *Pseudomonas fluorescens* e *Klebsiella pneumoniae* foram capazes de colonizar os nódulos de *Vigna radiata* via cordão de infecção quando co-inoculadas com *Ensifer adhaerens*, simbionte natural de *V. radiata*.

Bactérias endofíticas de nódulos podem promover a simbiose e o crescimento de planta quando co-inoculadas com os rizóbios específicos da leguminosa (SARR et al., 2010; TARIQ et al., 2012; SÁNCHEZ et al., 2014; PRAKAMHANG et al., 2015). Nos nódulos, as bactérias endofíticas podem atingir a densidade de células na ordem de 10^5 (MURESU et al., 2008; PRAKAMHANG et al., 2014). Quanto à atividade nos nódulos, foi mostrado que estirpes de *Paenibacillus* quando co-inoculado com *Bradyrhizobium* minimizam o estresse oxidativo nos nódulos (RODRIGUES et al., 2013a) e provocam alterações em processos

envolvendo o metabolismo do carbono e do nitrogênio em nódulos de feijão-caupi (RODRIGUES et al., 2013b).

2.5 Técnicas de Biologia Molecular para Caracterizar a Diversidade de Bactérias de Nódulos de Leguminosas

A taxonomia de bactérias que nodulam leguminosas tem passado por constantes alterações. Espécies são realocadas e novos táxons são descritos para acomodar novas estirpes. As alterações na taxonomia de rizóbio e a descoberta crescente de novas espécies são resultados de pelo menos três fatores: (i) o uso de ferramentas de biologia molecular para caracterização da diversidade e identidade genética de procariotos, (ii) levantamento da diversidade de rizóbio em áreas pouco exploradas e (iii) interesse em leguminosas pouco estudadas, especialmente leguminosas nativas.

Em estudos da diversidade de rizóbios, frequentemente são utilizados marcadores moleculares de *fingerprint* para identificação de linhagens de bactérias numa coleção. Os marcadores de *fingerprint* identificam sequências de DNA repetidas (rep-PCR) dentro do genoma da bactéria. Após uma reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é gerado um perfil composto por fragmentos de DNA (bandas) de diversos tamanhos, que pode ser visualizado em gel de agarose. Os marcadores de *fingerprint* comumente utilizados como estratégia para caracterizar coleções numerosas de rizóbio são: REP-PCR (MISHRA et al., 2012), ERIC-PCR (RASHID et al., 2012), BOX-PCR (ROUWS et al., 2014), RAPD (VAN-CAUWENBERGHE et al., 2014) e (GTG)₅ (DE MEYER et al., 2015). O principal objetivo quando se usa marcadores de *fingerprint* é identificar a diversidade de linhagens de bactérias em grandes coleções. Com base nesta caracterização prévia é possível selecionar representantes para serem usados em estudos mais detalhados de filogenia, sem a necessidade de caracterizar toda a coleção (VAN-CAUWENBERGHE et al., 2014). Alternativamente, alguns estudos utilizam a estratégia de identificar linhagens bacterianas dentro de uma população de rizóbios empregando a técnica de restrição do gene 16S rRNA (GUEFRACHI et al., 2013) ou do espaço intergênico 16S-23S (LI et al., 2012). Ambas as técnicas também geram perfis de fragmentos de DNA (bandas).

Stackebrandt & Goebel (1994) sugeriram que bactérias que tenham similaridade do gene 16S rRNA menor que 97% representam espécies diferentes. No entanto, o 16S rRNA não oferece boa resolução a nível de espécie entre estirpes de rizóbio. Por exemplo, *Bradyrhizobium pachyrhizi* e tem 16S rRNA 99,8% similar a *Bradyrhizobium elkanii*, *Mesorhizobium temperatum* e *Mesorhizobium gobiense* possuem 16S rRNA 99,9% e *Rhizobium fabae* tem 16S rRNA 99% similar a *Rhizobium pisi*. De todo modo, a sequência do 16S rRNA é suficiente para identificar a estirpe a nível de gênero. Para superar a baixa resolução taxonômica obtida com a informação da sequência do gene 16S rRNA, tem-se utilizado a estratégia de sequenciamento de genes conservadores do metabolismo microbiano (genes *housekeeping*) (MAIDEN e tal., 2013). Os genes conservadores do metabolismo microbiano constituem um conjunto de genes localizados no cromossomo bacteriano e estão envolvidos em diversos mecanismos para manutenção da célula bacteriana (MAIDEN et al., 2013). Estes genes possuem maior resolução taxonômica comparado ao 16S rRNA podendo resolver a identidade taxonômica a nível de espécie (RIBEIRO et al., 2013). O conjunto destes genes usado para caracterização bacteriana varia conforme o gênero em questão. Em populações de *Bradyrhizobium*, por exemplo, a combinação dos genes *recA*, *atpD* e *glnII* foi suficiente para discriminar estirpes com elevado nível de similaridade do gene 16S rRNA. (ZHANG et al.; 2011; CHAHBOUNE et al., 2012; WANG et al., 2013). Zhang et al. (2012) avaliaram o genoma de 90 espécies de rizóbio das classes Alpha e Betaproteobacteria e

identificaram um conjunto de três genes *housekeeping* (SMc00019, *truA* e *thrA*) que oferecem boa resolução taxonômica e possuem filogenia correspondente ao gene 16S rRNA.

Além dos genes estruturais (16S rRNA e *housekeeping*), a diversidade e filogenia de rizóbios pode ser avaliada pela caracterização dos genes envolvidos na simbiose, com destaque para os genes *nodC* e *nifH*. O gene *nodC* está envolvido na constituição da molécula lipo-quito-oligossacarídeos, os fatores Nod, que são os fatores responsáveis pelo processo de nodulação (KAMST et al. 1997). O gene *nifH* codifica a subunidade nitrogenase redutase do complexo enzimático da nitrogenase, enzima responsável pela conversão do N₂ em amônia (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O sequenciamento dos genes *nodC* e *nifH* podem fornecer informações à respeito da provável faixa hospedeira da estirpe e identificar possíveis simbiovares, que são grupos de bactérias especializadas para nodular com grupos específicos de leguminosas (LAGUERRE et al., 2001; ROGEL et al., 2011).

Análises moleculares permitem avaliar a estrutura e diversidade de comunidades de bactérias em seus ambientes de ocorrência. Com o sequenciamento de genes específicos é possível identificar as bactérias e fazer inferências ecológicas sobre o ambiente de onde foram isoladas. No entanto, é possível analisar comunidades microbianas sem o isolamento prévio, para isso são usadas técnicas independentes de cultivo (SU et al., 2012). Neste caso são analisadas moléculas de DNA ou RNA extraídas de amostra ambiental. A técnica de sequenciamento em larga escala, como 454 pirosequenciamento, tem sido usado para análise de comunidade microbiana sem prévio isolamento (ZANG et al., 2012). Uma grande vantagem do uso de técnicas independentes de cultivo é a possibilidade de avaliar uma comunidade microbiana sem o prévio isolamento, vencendo a barreira que as limitações do uso de meio de cultura impõe para o isolamento dos micro-organismos, dando um panorama geral das comunidades microbianas na amostra estudada.

3. CAPÍTULO I

DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] EM SOLOS DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

3.1 RESUMO

Feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma importante cultura no semiárido do Brasil e pode fixar nitrogênio em simbiose com rizóbio. Apesar disso pouco se sabe a respeito da diversidade genética de bactérias que nodulam feijão-caupi no semiárido do Brasil. O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente uma coleção de bactérias de nódulos de feijão-caupi isolada de solos do semiárido do Brasil. Neste estudo, uma coleção de 86 bactérias de nódulos de feijão-caupi isoladas de solos do semiárido do Brasil foram caracterizadas geneticamente usando sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e dos genes simbióticos *nifH* e *nodC*. A análise mostrou que 54 de 86 dos isolados foram identificados como *Bradyrhizobium*. Os demais 32 isolados pertencem aos gêneros *Rhizobium* (13) e *Microvirga* (1), da classe Alfaproteobactéria; *Burkholderia* (8) e *Ralstonia* (1), da classe Betaproteobactéria; *Acinetobacter* (1), *Cronobacter* (3), *Enterobacter* (1) e *Pantoea* (1), da classe Gamaproteobactéria e *Leifsonia* (3), do filo Actinobactéria. Como *Bradyrhizobium* foi o gênero mais representado, análises filogenéticas foram realizadas com o genes 16S rRNA, *nifH* e *nodC*. De acordo com a análise filogenética da sequência do 16S rRNA os isolados foram distribuídos em cinco linhagens: 16S rRNA tipo I (44 isolados), tipo II (6), tipo III (1), tipo IV (2) e tipo V (1). A análise filogenética do gene 16S rRNA mostrou que a linhagem tipo I foi agrupada dentro do grande grupo de *Bradyrhizobium yuanmingense* filogeneticamente perto da estirpe tipo de *Bradyrhizobium yuanmingense*. A análise filogenética dos genes *nifH* e *nodC* também separou os isolados em cinco linhagens simbióticas (I, II, III, IV e V) e as árvores foram congruentes, dando suporte a teoria da origem monofilética de genes simbióticos em *Bradyrhizobium*. As linhagens simbióticas I e II são próximas e correspondem a todos os isolados com 16S rRNA tipo I, representando, neste estudo, o grupo dominante associado aos nódulos.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*. Simbiontes. *Bradyrhizobium*. Bactérias endofíticas.

3.2 ABSTRACT

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] is an important crop in the Brazil semiarid region and can fix nitrogen in symbiosis with rhizobia. Nevertheless, little is known about the genetic diversity of cowpea root nodule bacteria in the Brazil semiarid region. The aim of this study was to genetically characterize a cowpea root nodule bacterial collection isolated from Brazilian semiarid soils. In this study, a collection of 86 cowpea root nodules bacteria isolated from Brazilian semiarid soils were genetically characterized by using partial sequencing of the 16S rRNA gene and the symbiotic genes *nifH* and *nodC*. The analysis showed 54 out of 86 isolates were identified as *Bradyrhizobium*. The remaining 32 isolates belong to *Rhizobium* (13) and *Microvirga* (1), in the Alphaproteobacteria class; *Burkholderia* (8) and *Ralstonia* (1) in the Betaproteobacteria class; *Acinetobacter* (1), *Cronobacter* (3), *Enterobacter* (1) and *Pantoea* (1) in the Gamaproteobacteria class (3) and *Leifsonia* in the filo Actinobacteria phylum. As *Bradyrhizobium* was the most represented genera, phylogenetic analyzes were made to 16S rRNA, *nifH* and *nodC* genes. According to phylogenetic analysis of the 16S rRNA sequence isolates were divided into five lineages: 16S rRNA type I (44 isolates), type II (6), type III (1), type IV (2) and type IV (1). Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene showed that lineage type I was grouped within the large *Bradyrhizobium japonicum* group phylogenetically close to the type strain of *Bradyrhizobium yuanmingense*. Phylogenetic analysis of *nifH* and *nodC* genes also separated the isolates into five symbiotic lineages (I, II, III, IV and IV) and the *nifH* and *nodC* trees were congruent, supporting the theory of monophyletic origin of symbiotic genes in *Bradyrhizobium*. Symbiotic lineages I and II are nearby and correspond to all 16S rRNA type I isolates with, representing, in this study, the dominant group associated with nodules.

Keywords: *Vigna unguiculata*. Symbionts. *Bradyrhizobium*. Endophytic bacteria.

3.3 INTRODUÇÃO

As regiões semiáridas na África e na América do Sul, excepcionalmente no Brasil, compartilham duas semelhanças: (i) presença de grande número de pequenas propriedades de produção agrícola e (ii) pouca adoção de tecnologias nos sistemas de cultivo. Nestas regiões é comum o cultivo de feijão-caupi [*Vigna unguiculara* (L.) Walp], principalmente pela razão de que esta cultura apresenta boa habilidade para tolerar à seca, altas temperaturas e desenvolver bem em solos com baixa fertilidade (MORTIMORE et al., 1997). A Nigéria, Niger e o Brasil correspondem pela maior fração da produção mundial de grãos de feijão-caupi, que é importante fonte de proteínas para populações de baixa renda (SINGH et al. 2003).

O feijão-caupi desenvolve simbiose com bactérias do solo coletivamente conhecidas como rizóbio. A simbiose leguminosa-rizóbio é facilmente identificada pela presença de estruturas especializadas nas raízes ou caules: os nódulos. Nos nódulos, o rizóbio fixa o nitrogênio retirado da atmosfera e o converte em amônia, forma assimilável pela planta (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O feijão-caupi responde à fixação biológica do nitrogênio e esta resposta depende da estirpe e do cultivar envolvidos no processo (MELO & ZILLI, 2009; PULE-MEULENBERG et al. 2010; ALCANTARA et al., 2014).

Uma ampla diversidade de bactérias nodula feijão-caupi, mas *Bradyrhizobium* spp. são os simbiontes mais comuns (ZILLI et al., 2006; ZHANG et al., 2008; PULE-MUELENBERG et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2012). Até o momento 24 espécies de *Bradyrhizobium* são validadas, sendo que *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense* e *B. canariense*, por exemplo, já foram isoladas de nódulos de feijão-caupi (ZHANG et al., 2008, 2011; BEJARANO et al., 2014). Embora seja considerada uma leguminosa de baixa especificidade hospedeira (GUIMARÃES et al., 2012), até o momento somente duas espécies bacterianas originalmente isoladas de nódulos de feijão-caupi foram descritas: *Bradyrhizobium manausense* (SILVA et al., 2014) e *Microvirga vignae* (RADL et al, 2014), ambas isoladas de solos do Brasil.

Além da ampla diversidade de rizóbios, bactérias endofíticas são isoladas de nódulos de diversas espécies de leguminosas, tais como, por exemplo, feijão-caupi (SOARES et al., 2014), soja (LI et al., 2008), amendoim (ANZUAY et al., 2013; WANG et al., 2013) e *Crotalaria incana* (ASERSE et al., 2013). As bactérias endofíticas isoladas de nódulos normalmente pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Agrobacterium* como indicado nas revisões de Dudeja et al. (2012) e Peix el at. (2015). Essas bactérias endofíticas de nódulos geralmente apresentam traços fisiológicos para promover do crescimento de plantas e podem melhorar a nodulação da planta quando co-inoculadas com o rizóbio específico (SARR et al., 2010; TARIQ et al., 2012; SÁNCHEZ et al., 2014).

Embora esforços tenham sido feitos para conhecer a identidade taxonômica de bactérias associadas aos nódulos de feijão-caupi no Brasil (ZILLI et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2012; SILVA et al., 2012; JARAMILLO et al., 2013;), pouco é conhecido sobre essa diversidade em solos do semiárido (RADL et al., 2014), especialmente em áreas tradicionalmente cultivadas com a cultura. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar uma coleção de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi de solos do semiárido do Brasil.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Origem dos isolados

Os 86 isolados bacterianos utilizados neste estudo (Tabela 1) foram obtidos de levantamento anterior (LEITE et al., 2009) à partir de nódulos de diferentes cultivares de feijão-caupi (IPA 206, BRS Pujante, BRS Marataoã, Canapu roxo e Sempre verde) comuns em pequenas propriedades agrícolas na região do Submédio do Vale do São Francisco, Brasil. Os isolados foram obtidos por meio de isolamento utilizando o meio de cultivo YMA conforme descrito em Leite et al., (2009). Os isolados representam distintos grupos fenotípicos presentes em solos de três pequenas propriedades agrícolas: A1 – área com cultivo de feijão-caupi no momento da coleta de solo localizada no município de Petrolina-PE, A3 – área com cultivo de feijão-caupi no momento da coleta de solo localizada no município de Juazeiro-BA e A4 – área sem histórico tradicional de cultivo de feijão-caupi, onde feijão-caupi foi cultivado um ano antes da coleta de solo, localizada no município de Petrolina-PE (Leite et al., 2009). Os isolados estavam estocados em meio YM líquido (VINCENT, 1970) com 50% de glicerol a -70°C na coleção de culturas do Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia.

3.4.2 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio YMA (VINCENT, 1970) a 28°C. A extração de DNA foi feita à partir de colônias puras utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). A extração seguiu as instruções do manual para extração de DNA genômico de bactérias Gram negativas. O protocolo consistiu numa etapa inicial de lise das células com adição de 600 µl *Nuclei Lysis Solution* e incubação por 5 minutos a 80°C. Após a lise, 3 µl of *RNase Solution* foram adicionados e as amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos em temperatura ambiente. Uma etapa de limpeza foi realizada com adição de 200 µl de *Protein Precipitation Solution*, incubação das amostras em gelo por 5 min e centrifugação a 16000 x g por 3 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µl de isopropanol para precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas a 16000 x g e o sobrenadante descartado. O DNA foi lavado com 600 µl etanol 70% a 16000 x g. O etanol foi removido e o DNA secado em temperatura ambiente por 30 minutos. Após secagem, o DNA foi reidratado com 100 µl de *Rehydration Solution*. A quantidade e qualidade do DNA foi avaliada em espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA). As amostras foram secas em equipamento de concentração à vácuo SpeedVac à 35°C. O DNA desidratado foi transportado para o departamento Research Unit Environmental Genomics, no instituto Helmholtz Zentrum München (Munique, Alemanha), onde foram feitas as reações de amplificação (PCR) e sequenciamento.

3.4.3 Amplificação (PCR) e sequenciamento do gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA foi amplificado usando os *primers* B27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'). As reações de PCR foram feitas em 50 µl contendo 2 µl de amostra do DNA (~10 ng), 0,20 µM de cada *primer*, 1× PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 1,75 mM de MgCl₂, 0,250 mM de cada dNTP, 0,05% de W-1 e 2U de *Taq DNA polymerase* (Cat. Nº 18038-026, Invitrogen, USA). A amplificação teve uma etapa de desnaturação inicial a 95°C

por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento a 56,5°C por 45 s e extensão a 72°C por 45 s; e extensão final a 72°C por 5 min. Uma alíquota de 5 µl do produto da PCR foi aplicada em gel de agarose 1% e migrado por eletroforese. Os géis foram corados com brometo de etídeo, e foi visualizado em transluminador com luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram purificados usando QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Germany) e preparados para sequenciamento usando BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technology, Germany) de acordo com as instruções do manual. Inicialmente o produto da PCR do gene 16S rRNA de todos os isolados foram sequenciados com o primer B27F (acima de 650 pb sequenciados) para identificação dos gêneros bacterianos presentes na coleção. As sequências dos isolados identificados como do gênero *Bradyrhizobium*, por comparação no GenBank, foram também sequenciadas com o primer 1401R (descrito no item 4.2.5), pois este foi o gênero mais frequente na coleção de isolados avaliados. O sequenciamento foi feito em sequenciador capilar ABI 3730 (Applied Biosystems, USA).

3.4.4 Amplificação (PCR) dos genes simbióticos *nifH* e *nodC*

Os genes *nifH* e *nodC* foram amplificados para os isolados identificados como *Bradyrhizobium* (dominante na coleção de isolados avaliados). O gene *nifH* foi amplificado com os primers *nifHF* (5'-TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA-3') e *nifHI* (5'-AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA-3') (LAGUERRE et al., 2001). O gene *nodC* foi amplificado com os primers *nodCF4* (5'-AYGTHGTYGAYGACGGATC-3') e *nodCI* (5'-CGYGACAGCCANTCKCTATTG-3') (LEGUERRE et al., 2001). Para alguns isolados o primer *nodCF* (5'-AYGTHGTYGAYGACGGTTC-3') substitui o primer *nodCF4* (Laguerre et al., 2001). Para ambos os genes, a reação da PCR foi feita em volume final de 50 µl contendo 2 µl de amostra do DNA (~10 ng), 0,40 µM de cada primer, 1 × PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], 1,75 mM de MgCl₂, 0,250 mM de cada dNTP, 0,05% de W-1 e 2U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA, cat n° 18038-026). As condições de amplificação do gene *nifH* foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento a 57°C por 45 s e extensão a 72°C por 45 s; e extensão final a 72°C por 5 min. Para o gene *nodC*, as condições de amplificação foram as mesmas, mas sob 55°C como temperatura de anelamento. As amostras foram preparadas para o sequenciamento da mesma forma estabelecida para o gene 16S rRNA no item 4.2.3. Os primers *nifHI* e *nodCI* foram usados para sequenciar os genes *nifH* e *nodC*, respectivamente.

3.4.5 Análise das sequências

O programa Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems, USA) foi utilizado para verificar a qualidade das leituras e para edições das sequências, quando necessárias. A identificação dos isolados a nível de gênero foi feita comparando as sequências com as depositadas no GenBank usando o algoritmo BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>). As sequências foram alinhadas com as de estirpes tipo e referência de espécies relacionadas usando o programa CLUSTAL W e árvores filogenéticas foram construídas usando o programa MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011). O 16S rRNA dos isolados identificados como *Bradyrhizobium* foi sequenciado no lado direto e reverso e o *contig* da sequência obtidos com o programa DNABASER v.3 (<http://www.dnabaser.com/>). Para sequências do 16S rRNA, *nifH* e *nodC* dos isolados de *Bradyrhizobium* foram realizados testes de modelos de substituição de nucleotídeos feitos no MEGA5.05 para selecionar o modelo que melhor ajusta ao conjunto de sequências alinhadas. O modelo com menor valor BIC (Bayesian Information Criterion) foi selecionado para cálculo das distâncias na construção das árvores filogenéticas no MEGA5.05 usando Maximum-Likelihood (ML) e Neighbor-Joining (NJ) com 500 e 1000 replicatas, respectivamente.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Identificação e diversidade dos isolados com base no 16S rRNA

O potencial de aplicação tecnológica de bactérias diazotróficas em sistemas agrícolas ou florestais, principalmente na forma de inoculantes, desperta o interesse mundial pelo estudo de bactérias associadas à nódulos de leguminosas, pois podem provocar o crescimento das plantas via fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2013; BALDANI & BALDANI, 2005). Além das bactérias comumente chamadas de rizóbios, os nódulos são colonizados por uma diversidade de bactérias endófitas (PEIX el at., 2015; DUDEJA et al., 2012). Neste estudo, 86 bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi foram identificadas com base na sequência parcial do gene 16S rRNA (Tabela 1) e corresponderam a dois filios: Proteobactéria (83 isolados) e Actinobactéria (3 isolados).

O filo Proteobactéria foi representado por 68 isolados na classe Alfaproteobactéria, relacionados aos gêneros *Bradyrhizobium* (54), *Rhizobium* (13) e *Microvirga* (1); nove isolados na classe Betaproteobactéria, identificados os gêneros *Burkholderia* (8) e *Ralstonia* (1) e seis isolados na classe Gamaproteobactéria distribuídos nos gêneros *Acinetobacter* (1), *Cronobacter* (3), *Enterobacter* (1) e *Pantoea* (1). O filo Actinobactéria foi representado por três isolados do gênero *Leifsonia*. Este resultado está de acordo com estudos prévios que reportam diversos gêneros associadas a nódulos de leguminosas (LI et al., 2008, HOQUE et al., 2011, ANZUAY et al., 2013, ASERSE et al., 2013, XU et al., 2014), reforçando o conhecimento que os nódulos integram o *habitat* de uma complexa comunidade de bactérias simbióticas e endófitas (DUDEJA et al., 2012; PEIX el at., 2015) e (iii) que feijão-caupi estabelece simbiose com grupos diversos de bactérias. Embora testes de nodulação não tenham sido feitos neste estudo, quatro gêneros descritos como simbioses de leguminosas foram identificados (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Microvirga* e *Burkholderia*).

3.5.2 Isolados da classe Alfaproteobacteria

Os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* representam a maioria dos isolados identificados na classe Alfaproteobactéria (Tabela 1). Neste estudo, os isolados identificados como *Bradyrhizobium* foram posteriormente caracterizados quanto à afiliação filogenética com as espécies tipo descritas de *Bradyrhizobium* com base no genes 16S rRNA, *nifH* e *nodC* (Item 4.3.6). Treze isolados foram identificados como *Rhizobium* (Tabela 1); seis, com fragmento do 16S rRNA com mais de 1000 pares de base (pb) sequenciados, foram usados para construção de uma árvore filogenética com estirpes tipo e referência de *Rhizobium* (Figura 1). Os isolados J251-1, J452-8, obtidos de solo de Juazeiro e P112-3, P113-5 e P513-6, obtidos de solo de Petrolina, foram agrupados com estirpes relacionadas à espécie *Rhizobium etli*. Os isolados J251-1 e J452-8 possuem 16S rRNA correspondente à estirpe *Rhizobium* sp. IE4771 (Tabela 1) e foram agrupados junto com a estirpe tipo CFN 42^T. IE4771 é uma estirpe simbiote de feijão-comum isolada de uma vila localizada no semiárido do México, previamente indicada como *Rhizobium etli* (SILVA et al., 2003). Posteriormente, análise de filogenia aplicando análise de sequência de multi-locus (MLSA) mostrou que IE4771 representa uma nova linhagem (PEL1) relacionada a *Rhizobium etli* e *Rizobium phaseoli* (RIBEIRO et al., 2013).

Tabela 1. Identificação dos isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi com base na sequência parcial do 16S rRNA (nt, nucleotídeos). Isolados indicados na mesma linha tiveram idêntico resultado do Blastn no NCBI. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>).

Isolado	Fonte		nt	Sequência 16S RNA homologa no NCBI	
	Área	Cultivar		Descrição (similaridade %)	Nº de acesso
J151-2, J151-4, J153-1	A3	IPA206	1281	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SCAUS01 (100)	KF836030
J251-2, J251-8	A3	BRS Pujante	1285	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SCAUS01 (100)	KF836030
J351-1, J351-3, J351-7, J352-4, J352-6, J353-1, J353-5	A3	BRS Marataoã	1283	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SCAUS01 (100)	KF836030
J451-11, J451-12, J453-1	A3	Canapu roxo	1270	<i>Bradyrhizobium</i> sp. JNVU CB4 (100)	KJ871655
J551-2, J551-5, J551-7, J551-9, J551-10, J551-11, J551-12, J552-1, J552-4, J552-6, J552-7, J552-10, J553-1, J553-3, J553-7, J553-9	A3	Sempre verde	1280	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SCAUS01 (99)	KF836030
J151-3, J153-2	A3	IPA206	1279	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SUT-R74 (99)	AB973682
J253-3	A3	BRS Pujante	1283	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> M-35 (99)	KF995091
J451-1, J451-2	A3	Canapu roxo	1276	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SUT-R74 (100)	AB973682
J551-1	A3	Sempre verde	1288	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SUT-R74 (99)	AB973682
J251-1	A3	BRS Pujante	1205	<i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> IE4771 (99)	CP006986
J251-3	A3	BRS Pujante	1116	<i>Rhizobium etli</i> L9 (99)	KJ438827
J251-4	A3	BRS Pujante	702	<i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> IE4771 (100)	CP006986
J252-3, J253-5	A3	BRS Pujante	1162	<i>Burkholderia caribensis</i> BRUESC127 (99)	KF031517
J252-5	A3	BRS Pujante	1166	<i>Burkholderia metallica</i> g33 (99)	KM019869
J351-5	A3	BRS Marataoã	718	<i>Microvirga vignae</i> BR10196 (99)	JX504811
J451-5, J452-1, J452-2	A3	Canapu Roxo	1165	<i>Burkholderia caribensis</i> BRUESC127 (100)	KF031517
J452-4	A3	Canapu Roxo	1177	<i>Burkholderia</i> sp. B18 (99)	KF788040
J452-8	A3	Canapu Roxo	1115	<i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> IE4771 (100)	CP006986
J552-5	A3	Sempre verde	700	<i>Rhizobium</i> sp. KT38 (99)	KJ734020
J553-5	A3	Sempre verde	656	<i>Rhizobium</i> sp. Dz12 (100)	AY210710

Tabela 1. Continua...

P312-9	A1	BRS Marataoã	1278	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SCAUS01 (100)	KF836030
P212-2, P212-7	A1	BRS Pujante	1277	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SCAUS01 (100)	KF836030
P411-1, P411-7, P412-5, P413-2	A1	Canapu roxo	1280	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SCAUS01 (99)	KF836030
P511-1, P511-2, P511-3, P511-4, P511-7, P513-2	A1	Sempre verde	1267	<i>Bradyrhizobium</i> sp. JNVU DC11 (99)	KM016966
P113-1	A1	IPA206	1276	<i>Bradyrhizobium</i> sp. H13-CR (99)	AB601652
P532-1	A1	Sempre verde	1284	<i>Bradyrhizobium</i> sp. PRNB-21 (99)	HM125059
P211-2	A1	BRS Pujante	1280	<i>Bradyrhizobium</i> sp. PRNB-21 (99)	HM125059
P112-3	A1	IPA 206	1173	<i>Rhizobium etli</i> PRF246 (99)	AY117661
P113-5	A1	IPA 206	1200	<i>Rhizobium etli</i> PRF126 (99)	AY117660
P211-1	A1	BRS Pujante	1201	<i>Leifsonia</i> sp. SAP711.6 (99)	JX067673
P211-4	A1	BRS Pujante	1143	<i>Leifsonia</i> sp. 06(2014) (99)	KF922655
P212-3	A1	BRS Pujante	1264	<i>Ralstonia pickettii</i> CNU082081 (100)	KF979148
P311-4	A1	BRS Marataoã	722	<i>Rhizobium</i> sp. 10L.11.4 (100)	KJ128395
P312-7	A1	BRS Marataoã	730	<i>Burkholderia</i> sp. CHNCT3 (100)	EF471220
P313-1	A1	BRS Marataoã	705	<i>Rhizobium</i> sp. 10L.11.4 (100)	KJ128395
P412-2	A1	Canapu Roxo	715	<i>Leifsonia</i> sp. 191aa (99)	KJ607237
P512-5	A1	Sempre verde	1076	<i>Rhizobium petrolearium</i> LW2 (98)	JX042461
P513-6	A1	Sempre verde	1072	<i>Rhizobium etli</i> PRF246 (99)	AY117661
P471-2	A4	Canapu roxo	1276	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> C7-1780.(100)	AB513451
P171-1	A4	IPA 206	1197	<i>Cronobacter pulveris</i> E444 (99)	EF059835
P171-2	A4	IPA 206	1198	<i>Cronobacter pulveris</i> E443 (99)	EF614996
P171-5	A4	IPA 206	1273	<i>Enterobacter ludwigii</i> Z98 (99)	KF835774
P371-2	A4	BRS Marataoã	1175	<i>Cronobacter helveticus</i> LMG 23732 (99)	NR_104980
P372-5	A4	BRS Marataoã	1154	<i>Rhizobium</i> sp. 10L.11.4 (100)	KJ128395
P573-3	A4	Sempre verde	902	<i>Pantoea</i> sp. 1112 (98)	KC236471
P573-4	A4	Sempre verde	655	<i>Acinetobacter</i> sp. G215 (100)	KJ948394

Os isolados P112-3, P113-5 e P513-6 agruparam com duas estirpes (PRF126 e PRF246) simbiontes de feijão-comum isoladas de uma área em Caruaru, Pernambuco, no Nordeste do Brasil (GRANGE & HUNGRIA, 2004). Por fim, o isolado J251-3 apareceu num ramo independente ligada ao grupo PEL1. É comum no semiárido do Brasil, em pequenas propriedades, o cultivo de feijão-caupi e feijão-comum em períodos alternados. Essa prática pode estar contribuindo para o estabelecimento de populações de rizóbio que nodulam ambas as culturas. A análise do 16S rRNA revelou que áreas de cultivo de feijão-caupi em Juazeiro e Petrolina abrigam bactérias filogeneticamente relacionadas à linhagem de *Rhizobium* sp. PEL1 e as estirpes PRF126 e PRF246, simbiontes de feijoeiro (Figura 1). Estas áreas podem abrigar estirpes que possam esclarecer as relações filogenéticas do grupo da linhagem PEL1. O isolado J351-5 foi identificado como *Microvirga*, com fragmento de 718 pb do 16S rRNA 99% similar ao da estirpe *Microvirga vignae* BR10196 (Tabela 1).

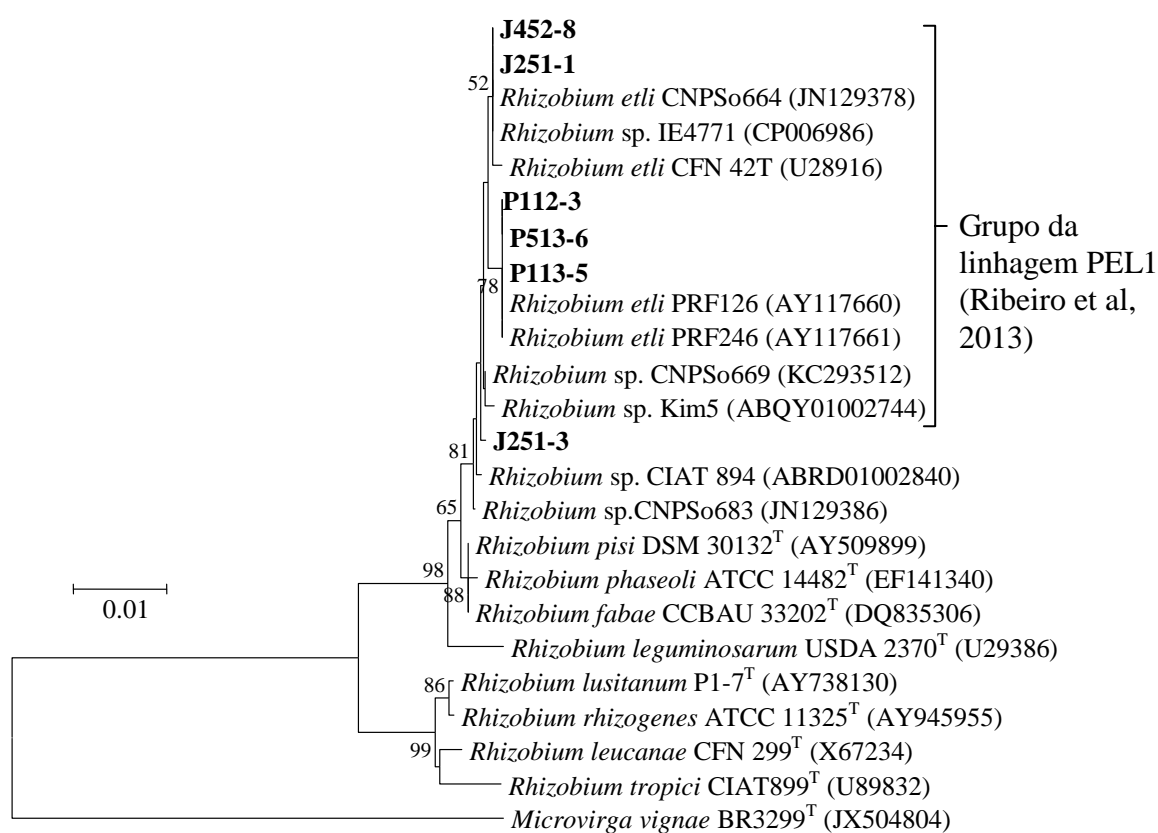


Figura 1. Árvore contruída com o método *Neighbor-Joining* com base no gene 16S rRNA (1015 pb) mostrando as relações filogenéticas entre bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi e estirpes tipo e referência de *Rhizobium*. Os valores de bootstrap foram calculados com base em 1000 replicatas e são indicados quando $\geq 50\%$. *Microvirga vignae* foi usada como *outgroup*. Bar, 1 substituição a cada 100 bases.

O gênero *Microvirga* foi proposto por Kanso & Patel (2003) ao descrever uma bactéria isolado de lago de águas termais. Recentemente, quatro espécies pertencentes a este gênero foram descritas como simbiontes de leguminosas: *Microvirga lupini* e *Microvirga lotononidis*, simbiontes de *Lupinus texensis*, *Microvirga zambiensis*, simbionte de *Listia angolensis* (ARDLEY et al., 2012) e *Microvirga vignae*, isolada de nódulos de feijão-caupi (RADL et al., 2014). *M. vignae* foi isolada de solos do Nordeste do Brasil (RADL et al.,

2014) e a estirpe tipo (BR3299^T) mostrou ser eficiente para promover a nodulação em feijão-caupi (MARINHO et al., 2014).

3.5.3 Isolados da classe Betaproteobacteria

O sequenciamento parcial do 16S rRNA mostrou que nove isolados são membros da classe Betaproteobactéria pertencendo aos gêneros *Burkholderia* (J252-3, J252-5, J253-5, J451-5, J452-1, J452-2, J452-4 e P312-7) e *Ralstonia* (P212-3). Análise de filogênia do 16S rRNA mostrou que os isolados J252-3, J253-5, J451-5, J452-1 e J452-2 são relacionados às estirpes de *Burkholderia* simbiotes de leguminosas e altamente semelhantes (*bootstrep* 100%) à estirpes referência de *Burkholderia caribensis* (Figura 2). Já os isolados J252-5 e J452-4 foram agrupados dentro do *clade* Bcc (*Burkholderia cepacia*-complex) numa brecha associada às espécies *B. cepacia*, *B. cenocepacia* e *B. metallica*. O isolado P312-7, não incluído nesta análise, por conta do curto fragmento de 16S rRNA sequenciado (730 pb), também foi agrupado junto com J252-5 e J452-4 numa análise independente (dado não mostrado).

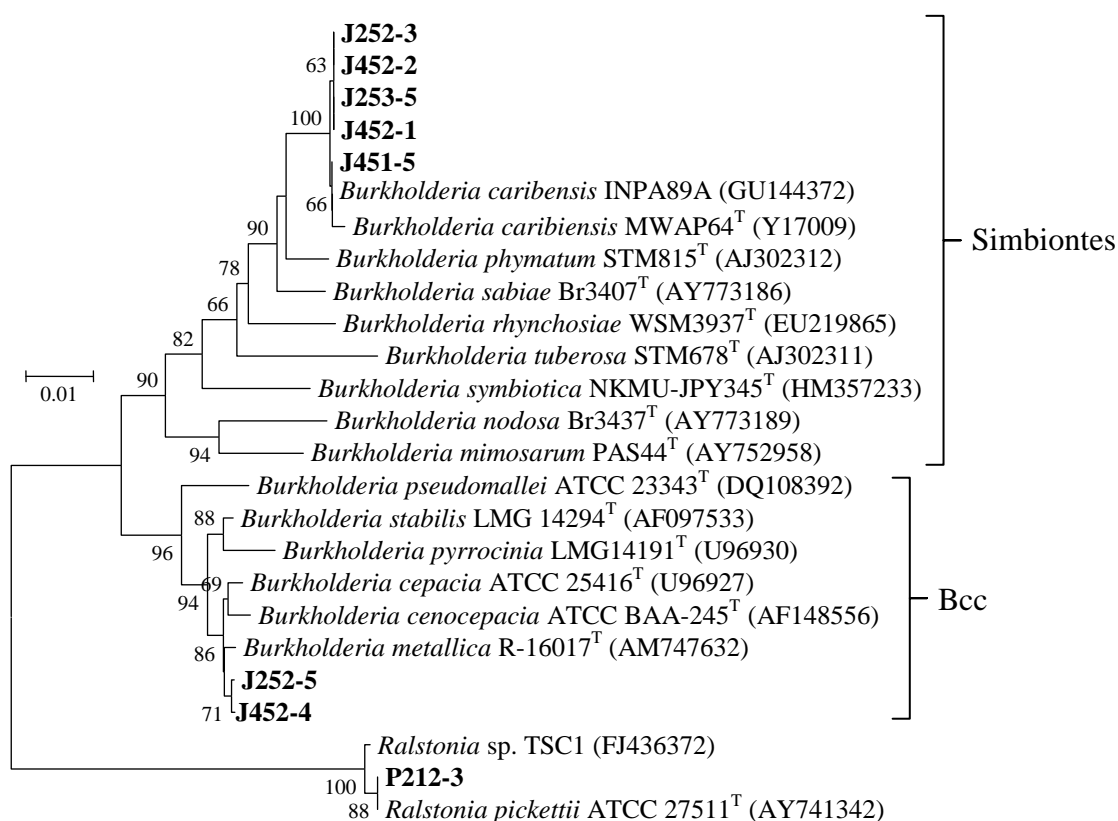


Figura 2. Árvore contruída com o método *Neighbor-Joining* com base no gene 16S rRNA (1120 pb) mostrando as relações filogenéticas entre bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi e algumas estirpes tipo e referência dos gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia*. Os valores de *bootstrep* foram calculados com base em 1000 replicatas e são indicados quando $\geq 50\%$. A estirpe tipo MWAP64^T da espécie *Burkholderia caribiensis* não foi isolada de nódulo de leguminosa. Bcc: *Burkholderia cepacia*-complex. Bar, 1 substituição a cada 100 bases.

Moulin et al. (2001) foram pioneiros em identificar que espécies de *Burkholderia*, membros da classe Betaproteobactéria, nodulam leguminosas. *Burkholderia* spp. são típicos simbiontes de *Mimosa* spp. (BOURNAUD et al., 2013) e são bacterias mais associadas a espécies de *Mimosa* na região central do Brasil (BONTEMPS et al., 2010). Guimarães et al. (2012) caracterizaram uma coleção de 119 bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi de solos da Amazônia e identificaram uma estirpe de *Burkholderia* (UFLA 03-216). Após teste de nodulação, os autores categorizaram a estirpe como nodulante de feijão-caupi, mas ineficiente para promover a massa da parte aérea da planta.

O isolado P212-3 foi identificado como *Ralstonia pickettii*. Sarr et al. (2009) isolaram uma estirpe de *Ralstonia* (TSC1) de nódulo de feijão-caupi filogeneticamente associada a *Ralstonia pickettii*. Posteriormente, foi mostrando que a estirpe TSCI não induz nódulos em feijão-caupi, mas é capaz de colonizar as raízes e nódulos (SARR et al., 2010). *Cupriavidus taiwanensis* (sinônimo *Ralstonia taiwanensis*) é o simbionte predominante em nódulos de *Mimosa* spp em Taiwan (CHEN et al., 2003). Recentemente, *Cupriavidus necator* foi identificado como uma espécie nodulante de diversas leguminosas, incluindo feijão-caupi (SILVA et al., 2012). Até o momento, não há registros que outras espécies do gênero *Ralstonia* sejam simbiontes indutores de nódulos em leguminosas.

3.5.4 Isolados da classe Gamaproteobacteria

Os isolados P171-1, P171-2, P171-5, P371-2, P573-3 e P573-4 foram obtidos de solo sem longo histórico de feijão-caupi e são membros da classe Gamaproteobactérias. O resultado da análise de Blast mostrou que os isolados P171-1 e P171-2 possuem 16S rRNA correspondente a espécie *Cronobacter pulveris* e o isolado P371-2 a espécie *Cronobacter helveticus*, ambos com 99% de similaridade do 16S rRNA com os das estirpes referência (Tabela 1). *Cronobacter pulveris* e *Cronobacter helveticus*, anteriormente membros do gênero *Enterobacter*, são espécies filogeneticamente relacionadas (espécies “irmãs”) (BRADY et al., 2013) e foram recentemente reclassificadas para o novo gênero *Franconibacter* (STEPHAN et al., 2014).

Aserse et al. (2013) isolaram uma estirpe de *Cronobacter dublinensis* de nódulo de *Crotalaria incana*, o que indica, junto com o resultado deste estudo, que *Cronobacter* spp. são parte da comunidade de bactérias associadas à nódulos. O isolado P171-5 foi identificado como *Enterobacter ludwigii*. *E. ludwigii* já foi isolado de nódulos de amendoim na China (WANG et al., 2013). Embora, estirpes de *E. ludwigii* são conhecidas como promotoras do crescimento de plantas (SHOEBITZ et al., 2009) é desconhecido a capacidade de membros desta espécie para promover a simbiose rizóbio-leguminosa. Finalmente, os isolados P573-3 e P573-4 foram identificados como *Pantoea* sp. e *Acinetobacter* sp, respectivamente.

Os gêneros *Acinetobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter* e *Pantoea* são conhecidos como endófitos (SCHMID et al., 2009; CHAUDHARY et al., 2012; LIMA et al., 2014) e promovem o crescimento de plantas (SHI et al., 2011; QUECINE et al., 2012; NAVEED et al., 2014). Estes gêneros já foram isolados de nódulos de diversas leguminosas como feijão-caupi (SOARES et al., 2014), amendoim (ANZUAY et al., 2013), soja (LI et al., 2008), *Acacia* spp. (HOQUE et al., 2011) e *Crotalaria incana* (ASERSE et al., 2013). Bactérias endofíticas isoladas de nódulos podem promover a simbiose e o crescimento da planta quando co-inoculadas com os rizóbios específicos (TARIQ et al., 2012; SÁNCHEZ et al., 2014). Reações de PCR utilizando primers nodCI/nodCF para o gene *nodC* (LAGUERRE et al., 2001) e PolF/PolF para *nifH* (POLY et al., 2001) foram feitos para identificar estes genes e deram resultados negativos para estes isolados de Gamaproteobacteria. Testes de inoculação

na planta serão necessários para avaliar a afinidade associativa destes isolados com feijão-caupi.

3.5.5 Isolados do gênero *Leifsonia* (Actinobacteria)

Os isolados P211-1 e P211-4, obtidos de nódulos do cultivar BRS Pujante, e P412-2 do cultivar Canapu Roxo, foram identificados como do gênero *Leifsonia*, com 16S rRNA 99% similar a diferentes estirpes (Tabela 1). Estirpes de *Leifsonia* já foram isoladas de nódulos de feijão-comum (CARDOSO et al., 2012), siratro (SILVA, 2012) e *Clitoria terantea* (NUNES, 2013). A figura 3 mostra as relações filogenéticas, com base no 16S rRNA, entre estirpes tipo e referência do gênero *Leifsonia* e estirpes isoladas de nódulos de leguminosas (●) deste estudo e dos estudos de Cardoso et al. (2012) e Nunes (2013). Adicionalmente, foram incluídas na análise três estirpes [06(2014), 10(2014), e 24(2014)] isoladas de solo rizosférico e raiz de sisal (*Agave sisalana*) na região semiárida da Bahia (SANTOS et al., 2014).

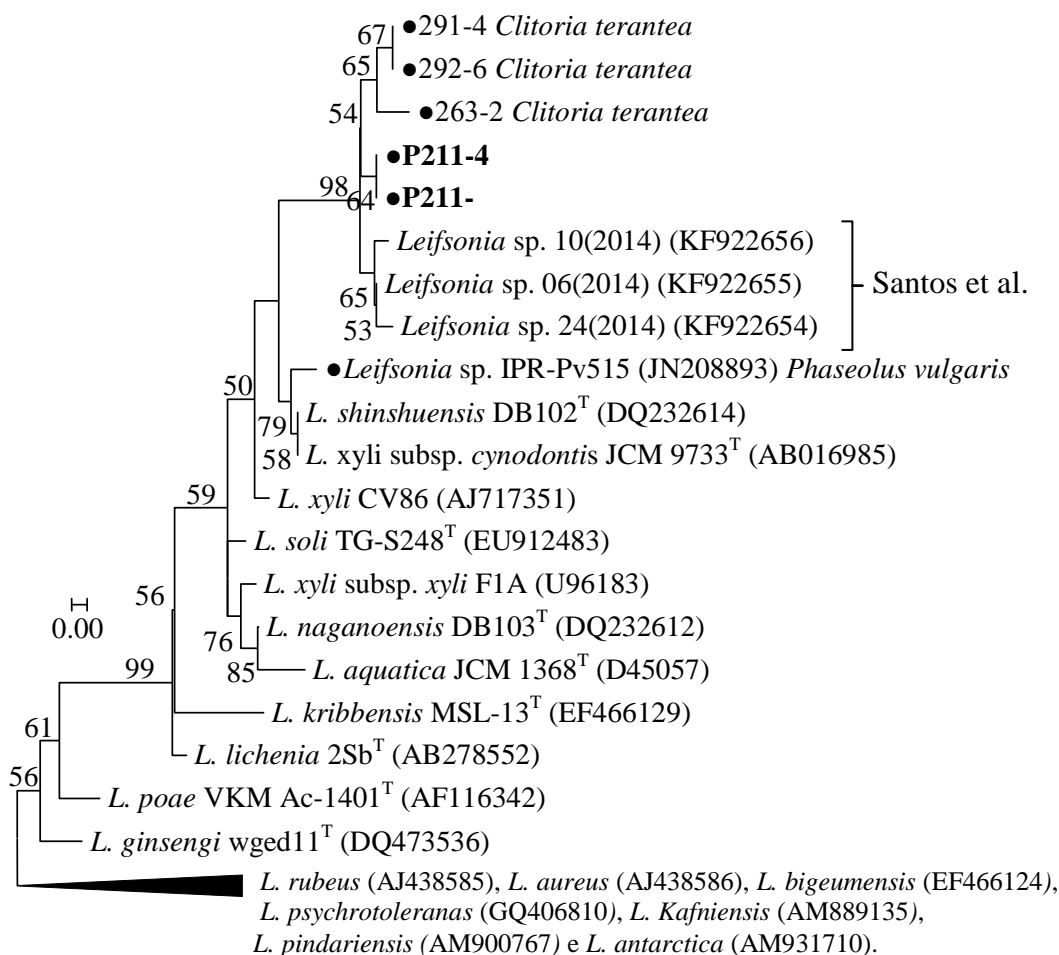


Figura 3. Árvore contruída com o método *Neighbor-Joining* com base no gene 16S rRNA (965 pb) mostrando as relações filogenéticas entre bactéria isoladas de nódulos de feijão-caupi e estirpes tipo e referência dos gêneros *Leifsonia*. Os valores de bootstrap foram calculados com base em 1000 replicatas e são indicados quando $\geq 50\%$. Bar, 1 substituição a cada 1000 bases. “●”, estirpes isoladas de nódulos. Sequências do isolados de *Clitoria terantea* gentilmente cedidas por Nunes (2013).

O resultado da análise indica que as estirpes de *Leifsonia* isoladas da região semiárida do Brasil de diferentes fontes (solo e hospedeiros) correspondem a um grupo de estirpes semelhantes (*bootstrap* de 98%). Estas estirpes formam um ramo filogeneticamente associada às espécies *L. shinshuensis* e *L. xyli* subsp. *cynodontis* e a estirpe *Leifsonia* sp. IPR-Pv515, isolada de nódulo de feijão-comum (CARDOSO et al., 2012). *Leifsonia xyli* é um conhecido patógeno de cana-de-açúcar que causa o raquitismo da soqueira (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). No entanto, Santos et al. (2014) mostraram que estirpes do gênero *Leifsonia* promovem o crescimento de raízes de pepino. Assim como os isolados da classe Gamaproteobactéria identificados neste estudo, a natureza associativa das estirpes de *Leifsonia* com feijão-caupi precisa ser esclarecida.

3.5.6 Isolados de *Bradyrhizobium* spp.

A maioria dos isolados (62%) foram identificados como *Bradyrhizobium* (Tabela 1 e 2). Até o momento não há registros da identidade taxonômica de estirpes *Bradyrhizobium* de áreas de cultivos de feijão-caupi no semiárido do Brasil. Por isso, decidiu-se seguir uma análise mais detalhada das relações filogenéticas dos isolados deste gênero com base nos genes 16S rRNA, *nifH* e *nodC*.

Sequências do gene 16S rRNA dos 54 isolados de *Bradyrhizobium* com 1220 nucleotídeos foram alinhados com as de estirpes tipo de *Bradyrhizobium* para construção da árvore filogenética usando o método *Maximum likelihood*. Após análise filogenética cinco tipos de 16S rRNA (I, II, III, IV e V), com 100% de similaridade, foram identificados e distribuídos dentro dos dois grandes grupos de *Bradyrhizobium* previamente descritos (MENNA et al., 2009) (Figura 4). O 16S rRNA tipo I correspondeu o maior grupo com 44 isolados (Tabela 2). Os isolados representantes deste grupo (P212-7 e J151-4) são filogeneticamente relacionados à *Bradyrhizobium yuanmingense*, espécie isolada de *Lespedeza cuneata*, com similaridade de 99,7% do gene 16S rRNA. O tipo II representa um grupo de seis isolados (J151-3, J153-2, J253-3, J451-1, J451-2 e J551-1) relacionados à *Bradyrhizobium liaoningense* e *Bradyrhizobium daqingense*, ambos isolados de soja, com 100% e 99,9% de similaridade, respectivamente. Os tipos III (P113-1) e IV (P211-1 e P532-1) são filogeneticamente associados à *Bradyrhizobium ingae* e *Bradyrhizobium iriomotense*, isolado de *Inga laurina* e *Entada koshunensis*, respectivamente. O isolado P471-2 representa o 16S rRNA tipo V foi agrupado no grande grupo II de *Bradyrhizobium* associado a *Bradyrhizobium pachyrhizi* e *Bradyrhizobium elkanii* com similaridade maior que 99%.

O feijão-caupi é tradicionalmente cultivado no Norte e Nordeste do Brasil e, mais recentemente, no Centro-Oeste. A identidade genética de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de feijão-caupi no Brasil já foi identificada em isolados obtidos de solos do Cerrado e Amazônia (ZILLI et al., 2006; GUIMARÃES, 2012, 2013; SILVA et al., 2012; JARAMILLO et al., 2013; OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014). Para o Nordeste, somente o estudo de Radl et al. (2014) reporta a identidade de rizóbio que nodula feijão-caupi na região semiárida. No presente estudo 54 bactérias de crescimento lento foram identificadas como *Bradyrhizobium*. A maioria foi agrupada dentro do subgrupo de espécies relacionadas à *Bradyrhizobium japonicum*, grande parte filogeneticamente associada à *Bradyrhizobium yuanmingense*.

Tabela 2. Linhagens de *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos de feijão-caupi de solos de Juazeiro-BA (J) e Petrolina-PE (P) com base nos genes 16S rRNA, *nifH* e *nodC*.

Isolado	16S rRNA	<i>nifH</i>	<i>nodC</i>	Espécie de <i>Bradyrhizobium</i> filogeneticamente relacionada*	
J151-4	I	Ia	I	<i>B. yuanmingense</i>	
J251-2	I	Ia	I		
J351-1, J352-4	I	Ia	I		
J451-12	I	Ia	I		
J551-2, J552-7, J553-1, J551-10, J552-6, J551-7	I	Ia	I		
J551-11, J553-7	I	Ia	I		
J552-4, J553-3	I	Ia	I		
J552-1	I	Ia	I		
J352-6	I	Ib	I		
J351-3	I	Ib	I		
J551-5	I	Ib	I		
J552-10, J553-9, J551-12	I	Ib	I		
J153-1	I	Ib	I		
J151-2	I	II	II		
J251-8	I	II	II		
J351-7, J353-1, J353-5	I	II	II		
J451-11, J453-1	I	II	II		
J551-9	I	II	nd		
J151-3	II	III	nd	<i>B. liaoningense/B. daqingense</i>	
J153-2	II	III	III		
J253-3	II	III	III		
J451-1	II	III	III		
J451-2	II	III	nd		
J551-1	II	III	nd		
P212-7	I	Ia	I	<i>B. yuanmingense</i>	
P312-9	I	Ia	I		
P411-7, P412-5	I	Ia	I		
P511-7	I	Ia	I		
P212-2	I	II	II		
P411-1, P413-2	I	II	II		
P511-2, P511-3, P511-4, P513-2	I	II	II		
P511-1	I	II	nd		
P113-1	III	II	II		<i>B. ingae/B. iriomotense</i>
P532-1	IV	V	nd		
P211-2	IV	V	IV	<i>B. elkanii/B. pachyrhizi</i>	
P471-2	V	V	V		

*Com base na reconstrução filogenética usando o método *Maximum likelihood* (Figura 1).

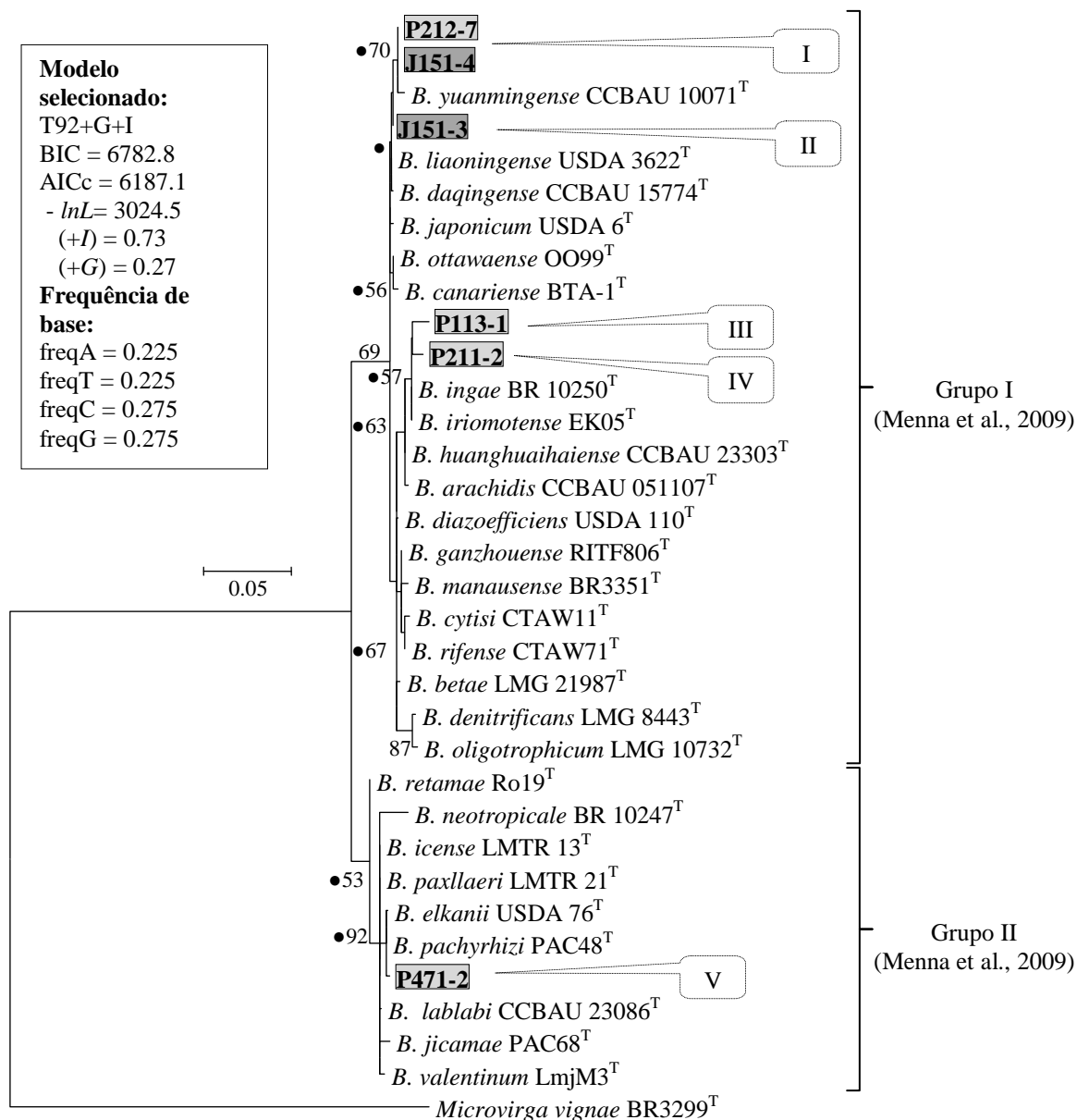


Figura 4. Árvore mostrando as relações filogenéticas entre estirpes representativas dos grupos I a V de *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos de feijão-caupi e estirpes tipo (T) de *Bradyrhizobium* com base no gene 16S rRNA (1220 pb). A árvore foi construída com o método de Maximum likelihood (ML). Os valores de bootstrap foram calculados com base em 500 replicatas e são indicados quando $\geq 50\%$. Brechas com círculo preto mostraram valores de bootstrap $\geq 50\%$ em análise independente usando o método de neighbor joining. Bar, 5 substituições a cada 100 bases. J: Juazeiro-BA e P: Petrolina-PE, Brasil. *Microvirga vignae* BR3299T foi usada como outgroup.

O feijão-caupi é considerado um hospedeiro de baixa especificidade, podendo estabelecer simbiose com uma ampla diversidade de rizóbios. No entanto, *Bradyrhizobium* spp são os simbiossitos mais comuns de feijão-caupi (ZILLI et al., 2004; ZHANG et al., 2008; PULE-MEULENBERG et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2012), e *Bradyrhizobium yuanmingense* é a espécie predominante em nódulos de feijão-caupi em seu centro de origem (África) e de diversidade (Índia) (APPUNU et al., 2009; KRASOVA-WADE et al., 2014). Na

zona semiárida do Sub-Saara Africano, estirpes filogeneticamente associadas à *B. yuanmingense* e *B. daqingense* foram frequentes em nódulos de feijão-caupi, *Vigna radiata* e amendoim (GRÖNEMEYER et al. 2014). As espécies *B. yuanmingense*, *B. liaoningense* e *B. daqingense* são filogeneticamente próximas (Figura 3). Krasova-Wade et al (2014) analisaram 327 nódulos de feijão-caupi no Senegal e encontraram que 90% eram colonizados por *Bradyrhizobium* com sequência do ITS (espaço intergênico entre 16S rRNA e 23S rRNA) filogeneticamente associado às espécies *B. yuanmingense*, *B. daqingense* and *B. arachidis*. Na Índia, Appunu et al. (2009) identificaram que *B. yuanmingense* é o simbiote dominante em nódulos de feijão-caupi em solos com mais de 100 anos de histórico de cultivo com a espécie.

Um resultado interessante neste trabalho de Appunu et al. (2009) é que a diversidade intra-específica, ou seja, às diferenças genéticas entre as estirpes *B. yuanmingense*, foi muito baixa, indicando que possivelmente tenha ocorrido uma coevolução onde feijão-caupi teria selecionando um grupo específico de *Bradyrhizobium*. Neste estudo, 54 isolados foram caracterizados e identificados como *Bradyrhizobium* (Tabela 2). Destes 53 foram obtidos de solos com histórico de mais de 10 anos de cultivo com feijão-caupi. Cinquenta isolados obtidos destas duas áreas foram agrupados no *clade yuanmingense-liaoningense-daqingense*, destes 44 estritamente ligados a *B. yuanmingense*. Como o gene 16S rRNA tem baixa resolução para identificação de espécies do gênero *Bradyrhizobium* (WILLEMS et al., 2001), análises filogenéticas envolvendo outros genes (RIVAS et al., 2009) serão necessárias para identificar que táxon estes isolados representam.

Em consideração a importância do feijão-caupi na agricultura no Brasil, até 2011 somente o trabalho de Zilli et al. (2006) trouxe informações à respeito da identidade genética e relações filogenéticas de bactérias que nodulam feijão-caupi no Brasil. No entanto, este cenário está mudando. Esforços têm sido feitos para conhecer a diversidade de rizóbio que nodula feijão-caupi no Brasil, principalmente em solos nos biomas Amazônia e Cerrado (ZILLI et al., 2006, GUIMARÃES, 2012, 2013; SILVA et al., 2012, 2014; JARAMILLO et al., 2013, OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014). Guimarães et al. (2012) avaliaram uma coleção de 119 isolados e identificaram que estirpes de *Bradyrhizobium* de feijão-caupi isoladas de solos no oeste da Amazônia pertencem à diferentes espécies, a maioria relacionada à *B. elkanii*. Posteriormente, estirpes desta área foram indicadas como um novo táxon de *Bradyrhizobium*, para o qual o nome *Bradyrhizobium amazonense* foi proposto (GUIMARÃES, 2013). Silva et al (2014) também caracterizaram a diversidade de *Bradyrhizobium* de solos da Amazônia e encontraram um grupo de estirpes que representavam uma nova espécie, *Bradyrhizobium manausense*. Em solos do Cerrado no Piauí, Zilli et al (2004) identificaram que, estirpes relacionadas a *B. elkanii* são dominantes em nódulos de feijão-caupi em áreas sem histórico de cultivo. Neste estudo, somente o isolado P471-2 foi associado a *B. elkanii*, e foi obtido, também, de solo sem histórico frequente de cultivo de feijão-caupi.

Relações filogenéticas dos isolados com base nas ilhas simbióticas foram investigadas usando os genes *nifH* e *nodC* e são apresentadas nas figuras 5 e 6. Para o gene *nifH* foram obtidas 54 sequências e para o gene *nodC* foram obtidas 48 sequências.

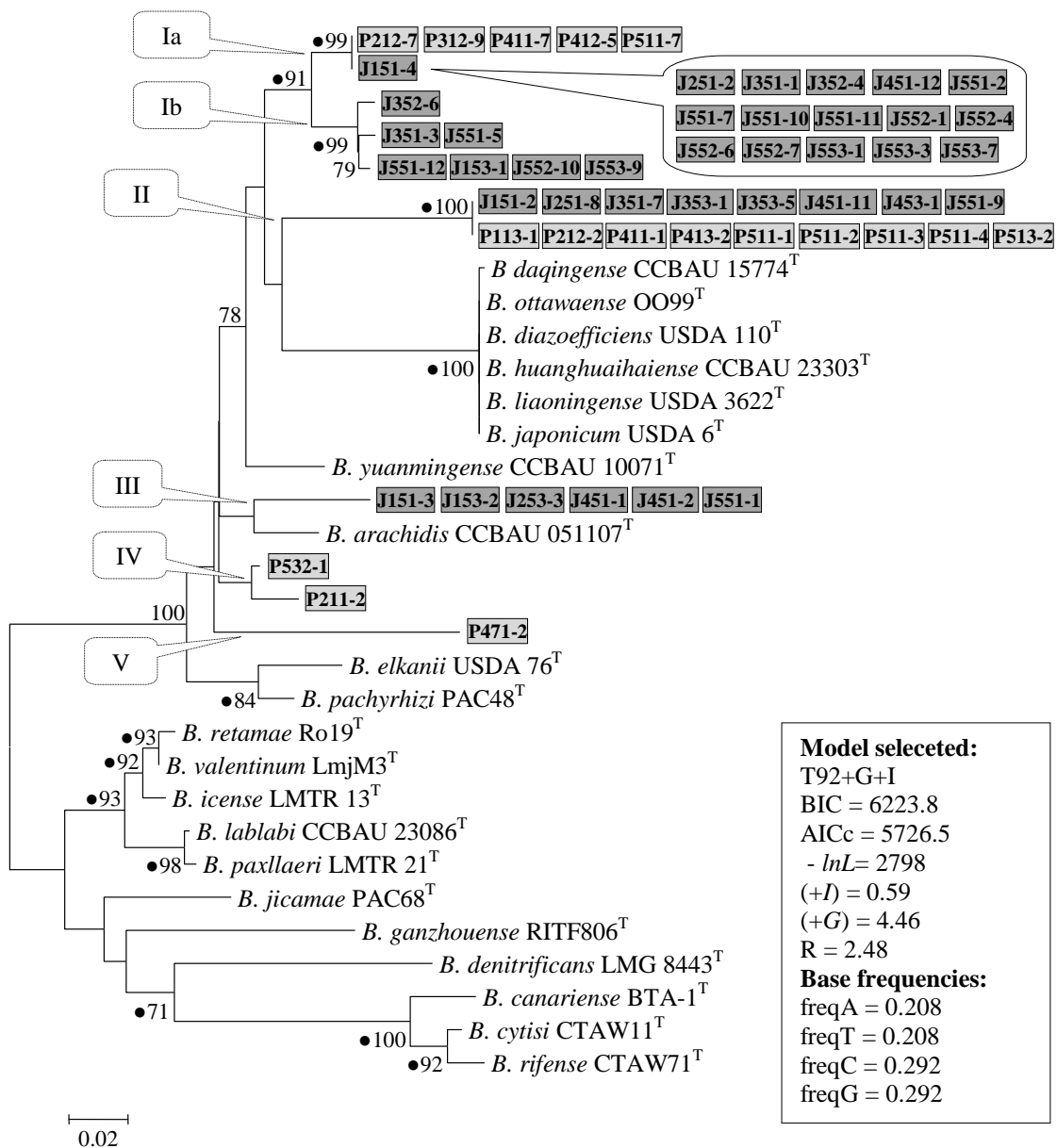


Figura 5. Árvore mostrando as relações filogenéticas entre 54 isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi e estirpes tipo (T) de *Bradyrhizobium* com base no gene *nifH* (489 pb). A árvore foi construída com o método de Maximum likelihood (ML). Os valores de bootstrap foram calculados com base em 500 replicatas e são indicados quando $\geq 70\%$. Brechas com círculo preto mostraram valores de bootstrap $\geq 70\%$ em análise independente usando o método de neighbor joining. Bar, 2 substituições a cada 100 bases. J: Juazeiro-BA e P: Petrolina-PE, Brasil. Os códigos Ia, Ib, II, III, IV e V representam diferentes linhagens do gene *nifH*.

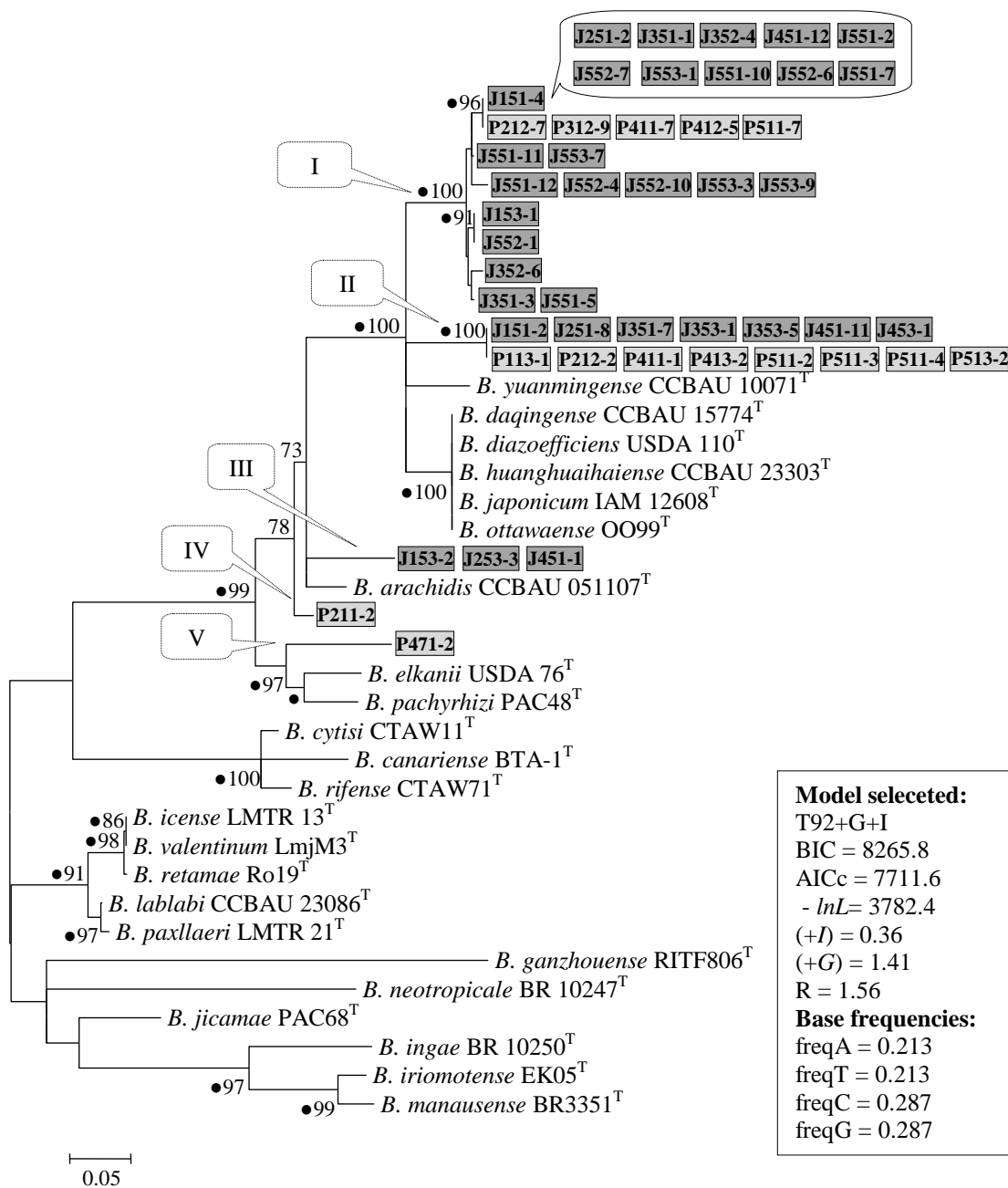


Figura 6. Árvore mostrando as relações filogenéticas entre 48 isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi e estirpes tipo (T) de *Bradyrhizobium* com base no gene *nodC* (411 pb). A árvore foi construída com o método de Maximum likelihood (ML). Os valores de bootstrap foram calculados com base em 500 replicatas e são indicados quando $\geq 70\%$. Brechas com círculo preto mostraram valores de bootstrap $\geq 70\%$ em análise independente usando o método de neighbor joining. Bar, 5 substituições a cada 100 bases. J: Juazeiro-BA e P: Petrolina-PE, Brasil. Os códigos I, II, III, IV e V representam diferentes linhagens do gene *nodC*.

O gene *nifH* dos 54 isolados foi equenciado e fragmentos de 489 nucleotídeos foram alinhados com as sequências de estirpes tipo de *Bradyrhizobium*. Após análise filogenética, usando o método *Maximum likelihood*, cinco linhagens (I, II, III, IV, V) foram definidas (Figura 5). Os 44 isolados com 16S rRNA tipo I (Tabela 2) foram separados em duas linhagens (I e II). A linhagem I reuniu 28 isolados com similaridade mínima de 96,5% e dividida em dois subgrupos: Ia, com 21 isolados obtidos de solos de Juazeiro e Petrolina com *nifH* 100% similar e Ib, com sete isolados de Juazeiro separados em três brechas fortemente relacionadas (*bootstrap* 99%) com *nifH* 98,5% similar. A linhagem II corresponde a um grupo de 16 isolados com 16S rRNA tipo I e o isolado P113-1, 16S rRNA tipo III, com sequência do gene *nifH* 100% similar. As linhagens I e II foram agrupadas num grande grupo com a espécie *Bradyrhizobium yuanmingense* e seis espécies de *Bradyrhizobium* isoladas de soja. A linhagem III correspondeu seis isolados obtidos de solo de Juazeiro com gene *nifH* 100% similar e formaram uma brecha vizinha a recente espécie descrita *Bradryrhizobium arachidis*, isolada de amendoim na China (WANG et al., 2013). Os isolados P532-1 e P211-2 compartilham 97,8% de similaridade do *nifH* e formaram a linhagem IV numa brecha associada à linhagem III e a espécie *Bradryrhizobium arachidis*. O isolado P471-2, único no grupo II de *Bradyrhizobium* (Figura 4), formou uma brecha independente.

Depois de várias tentativas usando as combinações de *primer* nodCF/nodCI e nodCF4/nodCI (LAGUERRE et al., 2001) o gene *nodC* não foi amplificado para os isolados J151-3, J451-2, J551-1, J551-9, P511-1 e P532-1. Para os demais 48 isolados, o *nodC* foi sequenciado e fragmentos de 411 nucleotídeos foram comparados com de estirpes tipo de *Bradyrhizobium*. Semelhante ao *nifH*, cinco linhagens (I, II, III, IV e V) foram identificadas (Figura 6). A linhagem I agrupou a maioria (28) dos isolados com 16S rRNA tipo I com similaridade mínima de 98,2% entre os isolados. Os demais isolados (14) com 16S rRNA tipo I foram agrupados juntamente com o isolado P113-1 (16S rRNA tipo III) na linhagem II, com *nodC* 100% similar e relacionado ao da espécie *Bradyrhizobium yuanmingense*. Os isolados J153-2, J253-3 e J451-1 possuem *nodC* 100% similar e filogeneticamente associado à espécie *Bradyrhizobium arachidis*. P211-2 corresponde à linhagem IV e formou uma brecha isolada ligada ao grande grupo onde estão incluídas as linhagens I, II e III. O isolado P471-2 (linhagem V) formou um ramo independente relacionado às espécies *Bradryrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium pachyrhizi*, isoladas de soja e *Pachyrhizus erosus*, respectivamente.

Em estudo realizado por Menna & Hungria (2011), a árvore construída com o gene *nifH* foi consistente com as árvores do genes da nodulação *nodA*, *nodZ* e *nodY/K*. Neste estudo, as árvores filogenéticas dos genes *nifH* e *nodC* tiveram topologia similar, sendo os isolados distribuídos, em ambos os casos, em cinco linhagens (I, II, III, IV e V). As árvores dos genes *nifH* e *nodC* foram correspondentes entre si e com a árvore do 16S rRNA. A única exceção foi o isolado P113-1, que possui 16S tipo III, mas os genes na simbiose, *nifH* e *nodC*, correspondem a linhagem II. Isso indica que P113-1 tenha provavelmente adquirido estes genes por transferência lateral, evento identificado entre estirpes de *Bradyrhizobium* (MENNA & HUNGRIA, 2011). Juntos, estes resultados suportam a teoria na origem monofilética dos genes simbióticos em *Bradyrhizobium* e distribuição via transferência lateral (MENNA & HUNGRIA, 2011). As linhagens I e II dos genes *nifH* e *nodC* reúnem todos os isolados com 16S rRNA tipo I, sendo aqueles relacionados a *B. yuanmingense*. Análise de similaridade mostrou que as sequências dos genes *nifH* e *nodC* do isolados 16S rRNA tipo I possuem *nifH* mais similar a estirpe tipo de *B. yuanmingense*, simbionte de *Lespedeza cuneata* e que não nodula soja (YAO et al., 2002); e o gene *nodC* mais próximo do conjunto das espécies de *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos de soja: *B. daqingense*, *B. diazoefficiens*, *B. huanghuaihaiense*, *B. japonicum*, *B. ottawaense*.

Tabela 3. Similaridade dos genes *nifH* e *nodC* entre isolados de *Bradyrhizobium* com 16S rRNA tipo I e estirpes tipo de *Bradyrhizobium*.

Linhagem	<i>B. yuanmingense</i> ^T		Espécies de soja*	
	<i>nifH</i>	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>	<i>nodC</i>
I	93,60%	90,70%	91,30%	92,60%
II	90,40%	90,30%	88,60%	91,10%
<i>B. yuanmingense</i> ^T	-	-	91,40%	93,30%

* *B. daqingense*, *B. diazoefficiens*, *B. huanghuaihaiense*, *B. japonicum*, *B. ottawaense*.

Os isolados da linhagem III possuem ilha simbiótica relacionada à da estirpe de *B. arahidis*, isolada de nódulo de amendoim. As linhagens IV e V não agruparam com nenhuma estirpe tipo de *Bradyrhizobium* e representam novas linhagens. A presença de *Bradyrhizobium* com diferentes linhagens de *nifH* e *nodC* indica a possível existência de diferentes simbiovares de *Bradyrhizobium* que nodulam feijão-caupi em áreas do semiárido do Brasil, essencialmente na espécie *B. yuanmingense*. Ensaio de nodulação em diferentes hospedeiros serão necessários para confirmar esta hipótese.

3.6 CONCLUSÕES

Nódulos de feijão-caupi são colonizados por bactéria dos gêneros *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Leifsonia*, *Microvirga*, *Pantoea*, *Ralstonia* e *Rhizobium*.

Cinco linhagens de *Bradyrhizobium* foram identificadas em área de cultivo de feijão-caupi em Juazeiro-BA e Petrolina-PE, cidades localizadas no semiárido brasileiro.

A maioria das estirpes de *Bradyrhizobium* em áreas com longo histórico cultivo de feijão-caupi em Juazeiro-BA e Petrolina-PE são filogeneticamente relacionadas à espécie *Bradyrhizobium yuanmingense*.

4. CAPÍTULO II

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS NÓDULOS DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] ANALIZADAS POR PIROSEQUENCIAMENTO

4.1 RESUMO

Feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma leguminosa de baixa especificidade hospedeira que pode interagir com uma larga diversidade de bactérias como mostrado por diversos isolamentos de bactérias dos nódulos. Todavia, estratégias dependentes de cultivo podem limitar o acesso às frações da comunidade de bactérias de amostras ambientais. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade das comunidades bacterianas associadas aos nódulos de feijão-caupi usando método independente de cultivo. Os cultivares BRS Pujante e BRS Acauã foram cultivados em um Argissolo Amarelo sem histórico de cultivo de feijão-caupi. Aos 35 dias após a germinação, nódulos (N) foram coletados. Amostra de solo (BS) e solo rizossférico (RS) foram coletados na profundidade de 0-20 cm. O DNA das amostras foi extraído para análises das comunidades bacterianas usando 454 pirosequenciamento do gene ribossomal 16S rRNA. O seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA das comunidades bacterianas mostraram uma alta diversidade distribuídos nos três ambientes (BS, RS e N). As comunidades bacterianas associadas aos nódulos foram significativamente diferentes ($p > 0,01$) das comunidades de bactérias que cercam os nódulos (LS e RS). Nas amostras BS e RS, os filos Actinobacteria, Bacteriodetes, Proteobacteria foram os grupos mais abundantes. Em nódulos, os filos Proteobacteria e Bacteriodetes foram dominantes, com Gammaproteobacteria (58,8%) e Alphaproteobacteria (37,4%) como as classes mais representativas no filo Proteobacteria e Flavobacteriia (84,8%) e Sphingobacteriia (10,9%) as classes mais dominantes no filo Bacteriodetes. Em nível de gênero, *Chryseobacterium*, *Entrebacter* e *Bradyrhizobium* foram predominantes em todas as amostras de nódulos, com *Chryseobacterium* mais abundante nos nódulos de BRS Acauã e *Enterobacter* nos nódulos de BRS Pujante.

Palavras-chave: Nódulos de leguminosas. Diversidade. Comunidades de bactérias. Rizóbio.

4.2 ABSTRACT

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] is a low host specificity legume that can nodulate with a large bacteria diversity as revealed by several bacterial isolations from nodules. However, culture-dependent methods can select fraction of the bacterial community from environmental samples. Culture-independent methods can overcome the culture-dependent methods to access bacterial communities. The aim of this study was to evaluate the bacterial diversity communities associated to cowpea root nodules using independent method of cultivation. The BRS Pujante and BRS Acauã cropped in a Ultisol without history record with cowpea cultivation. At 35 days after germination, nodules (N) were collected from the roots. Soil (BS) and rhizospheric soil (RS) were sampled in a 0-20 cm deep. The samples were subjected to DNA extraction and the bacterial communities were accessed by using 454 pyrosequencing of 16S rRNA ribosomal gene. The partial 16S rRNA sequencing of bacterial communities showed a high diversity distributed in the three environments (BS, RS and N). Bacterial communities associated to nodules were significantly different ($p > 0.01$) from the bacterial communities surrounding the nodules (LS and RS). In the BS and RS samples, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria were the most abundant phylum. In nodules, Proteobacteria and Bacteroidetes were dominant phylum, with Gammaproteobacteria (58.8%) and Alphaproteobacteria (37.4%) as the manjor representatives classes in Proteobacteria and Flavobacteriia (84.8%) and Sphingobacteriia (10.9%) the most dominant classes in Bacteroidetes. In a genus leval, *Chryseobacterium*, *Entreobacter* and *Bradyrhizobium* were predominant in all nodules samples, with *Chryseobacterium* more abundant in BRS Acauã and *Enterobacter* in BRS Pujante nodules.

Keywords: Legume root nodules. Diversity. Bacterial communities. Rhizobia.

4.3 INTRODUÇÃO

Rizóbios são bactérias do solo que podem interagir simbioticamente com plantas leguminosas através da indução da formação de nódulos nas raízes ou caule. Nos nódulos, a bactéria converte o nitrogênio atmosférico em amônia, forma assimilável pela planta, e recebe, da planta, compostos orgânicos para o metabolismo da célula bacteriana (UDVARDI & POOLE, 2013). As bactérias que podem induzir a formação de nódulos em leguminosas pertencem as classes Alphaproteobactéria (α -rizóbio) e Betaproteobactéria (β -rizóbio) (SAWADA et al., 2003). Na classe Alphaproteobactéria estão os gêneros clássicos de rizóbio *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (= *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium* e *Rhizobium* (PEIX et al., 2015).

Mais recentemente, bactérias capazes de nodular leguminosas foram identificadas em outros gêneros da classe Alphaproteobactérias, como: *Methylobacterium* (SY et al., 2001), *Devosia* (RIVAS et al., 2003), *Ochrobactrum* (TRUJILLO et al., 2005), *Phyllobacterium* (VALVERDE et al., 2005), *Shinella* (LIN et al., 2008), *Aminobacter* (MAYNAUD et al., 2012), *Microvirga* (ARDLEY et al., 2012; RADL et al., 2014). Na classe Betaproteobactéria, a capacidade de induzir a formação de nódulos em leguminosas foi identificado nos gêneros *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001) e *Cupriavidus* (CHEN et al., 2003) e nos últimos dez anos vem aumentando o número de espécies dos chamados beta-rizóbios. A diversidade de alpha e beta-rizóbios foi recentemente revisada por Peix et al. (2015)

Além dos rizóbios, outras bactérias podem colonizar os nódulos como endofíticas (PANDYA et al., 2013). Um número crescente de bactérias endofíticas tem sido isoladas de nódulos de diversas leguminosas e pertencem a uma diversidade de gêneros tais como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Dyella*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Microbacterium*, *Micromonospora*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Variovorax*, *Xanthomonas* (LI et al., 2008; HOQUE et al., 2011; ANZUAY et al., 2013; ASERSE et al., 2013; SOARES et al., 2014; DE MEYER et al., 2015). Estas bactérias não induzem a nodulação, mas podem co-existir nos nódulos com o rizóbio (MURESU et al., 2008; PANDYA et al., 2013) e promover a simbiose entre a leguminosa e o rizóbio (TARIQ et al., 2012; SÁNCHEZ et al., 2014,).

Tradicionalmente, bactérias de nódulos são isoladas usando o meio de cultivo YMA composto por manitol (fonte de carbono), extrato de levedura (fonte de nitrogênio) e sais minerais (FRED & WAKSMAN, 1928; VINCENT, 1970). Essa abordagem permitiu o isolamento e identificação de diversas bactérias simbióticas (SAWADA et al., 2003; PEIX et al., 2015) e endofíticas de nódulos (DUDEJA et al., 2012; DE MEYER et al., 2015), mostrando que os nódulos abrigam uma alta diversidade.

Além dos métodos tradicionais de cultivo e isolamento de bactérias, o uso de técnicas independentes de cultivo podem auxiliar para pré-descrever a diversidade presente em amostras ambientais. Neste caso, o perfil e a identidade da comunidade bacteriana são avaliados com base em moléculas de DNA e RNA (FISCHER et al., 2011; VIDEIRA et al., 2013). O gene 16S rRNA é mais frequentemente usado devido a larga base de dados para comparação. Neste caso, o uso de sequenciamento de alto desempenho, como 454 pirosequenciamento do 16S rRNA, tem sido largamente usado para estudar a diversidade de comunidades microbianas de diferentes fontes ambientais, como solo (UROZ et al., 2010) e plantas (BODENHAUSEN et al., 2013).

O feijão-caupi [*Vigna unguiculara* (L.) Walp] é frequentemente cultivado em zonas tropicais (SINGH et al. 2003) e estabelece interação simbiótica com uma ampla diversidade de rizóbios (GUIMARÃES et al., 2012; ZHANG et al., 2008). Devido a baixa especificidade hospedeira, o feijão-caupi é muito usado como planta-isca para captura de rizóbio em estudos de diversidade (MARTINS et al., 1995; ZILLI et al., 2001; LEITE et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2012; JARAMILLO et al., 2013). Essa baixa especificidade na interação com os rizóbios pode também refletir na interação com bactérias endófitas de nódulos.

Recentemente, diversas bactérias, potencialmente endofíticas, foram isoladas de nódulos de feijão-caupi (SARR et al., 2009; COSTA et al., 2013; JARAMILLO et al., 2013; SOARES et al., 2014) e podem representar uma fração da comunidade bacteriana associada aos nódulos com uso potencial para promoção do crescimento da planta (SARR et al., 2010).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de comunidades de bactérias associadas aos nódulos de cultivares de feijão-caupi em uma área sem histórico de presença da cultura usando técnica indendente de cultivo.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Desenho experimental e coleta de amostras de solo e nódulos

Um experimento foi montado em campo num Argissolo Amarelo na Estação Experimental de Bebedouro, da Embrapa Semiárido, que fica na cidade de Petrolina, Pernambuco (09°09'S; 40°22'W). Essa área foi escolhida porque possui frequente rotação de culturas e sem histórico de cultivo de feijão-caupi, portanto sem influência do estímulo de feijão-caupi nas comunidades microbianas. Antes da implantação do experimento, a área tinha sido cultivada com melância. Amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0-20 cm e analisadas segundo descrito em EMBRAPA (1997) e os resultados foram: pH (H₂O)= 6,3; P= 11,92 mg.dm⁻³; K= 0,33 mg.dm⁻³; Ca= 2,0 cmolc.dm⁻³; Mg²⁺= 0,4 cmolc.dm⁻³; Al³⁺= 0,05 cmolc.dm⁻³; H+Al³⁺= 0,66 cmolc.dm⁻³; S= 2,78 cmolc.dm⁻³; CTC= 3,44 cmolc.dm⁻³; V= 81 %; matéria orgânica: 6,3 g.kg⁻¹. Para análise da diversidade de bactérias associadas aos nódulos de feijão-caupi, foram utilizadas as cultivares BRS Pujante e BRS Acauã. Estas duas cultivares foram melhoradas para as condições da região do Submédio do Rio São Francisco e são contrastantes para os parâmetros de nodulização em condições de campo (MARINHO et al., 2014). Cada cultivar correspondeu a um tratamento com quatro repetições distribuídas em blocos ao acaso. Sementes não inoculadas foram cultivadas em maio de 2013 em parcela experimental de 12 m² com oito linhas de 3 m. Foi utilizado um espaçamento de 0,50 x 0,25 entre as plantas. O experimento foi adubado com 20 kg de P₂O₅ ha⁻¹, com superfosfato simples e 20 kg de K₂O ha⁻¹, com cloreto de potássio. Aos 35 dias após a emergência das plantas, durante o florescimento, 20 nódulos foram coletados de 4 plantas em cada parcela (5 nódulos por planta). Amostras de solo rizosférico foram coletadas nas mesmas plantas. Amostra de solo fora da influência rizosférica (*bulk soil*) foram coletadas dentro de cada bloco na profundidade de 0-20 cm. As amostras de nódulos e solos foram mantidas refrigeradas até análises futuras.

4.2.2 Extração de DNA

Os nódulos foram desinfestados com álcool 70% por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos e seis lavagens em água destilada e autoclavada. Em cada etapa os nódulos foram agitados vigorosamente. Uma alíquota de 100 µl da água da última lavagem foi inoculada em placas com meio YMA (VINCENT, 1970) e meio LB (BERTANI, 1952) para chegar a eficiência da desinfestação. Após a desinfestação, 20 nódulos por amostras foram macerados em nitrogênio líquido. A extração de DNA foi feita em duas replicatas com 0,5g cada de nódulo macerado. Para as amostras de solo rizosférico e do *bulk soil*, o DNA foi extraído de 0.5 g. A extração seguiu o protocolo descrito por Griffith et al. (2000). Resumidamente, o material (nódulos macerados ou amostra de solo) foi adicionado em uma matriz de lise (MP Biomedicals, Germany) e submetido a extração com fenol:clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v). Posteriormente as amostras foram homogeneizadas por 30 s a 5.5 m.s⁻¹ em Fastprep (MP, Germany). As amostras foram centrifugadas em 16000 x g por 5 minutos a 4°C. Após centrifugação, as amostras passaram por duas etapas de limpeza com cloforórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). Em seguida, o DNA foi precipitado com PEG (10%) por 2 h em gelo. Após a precipitação, O DNA foi lavado com etanol a 70% e seco em temperatura ambiente por 30 min. Após a extração, o

DNA foi resuspendido em água ultra pura e transportado refrigerado em bolsas de gelo em gel para o departamento Research Unit Environmental Genomics (EGEN), no Helmholtz Zentrum München (Alemanha), onde foram feitas as reações de amplificação para o pirosequenciamento (item 5.2.3). No EGEN, a qualidade do DNA das amostras foi verificado em gel de agarose 1% e quantificado utilizando Quant-iT PicoGreen dsDNA kit (Invitrogen, Paisley, UK).

4.2.3 Pirosequenciamento do gene 16S rRNA

O 16S da comunidade de bactérias de cada amostra foi amplificado usando os primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3') e 984R (5'-GTAAGGTTTCYTCGCG-3') com adição dos adaptadores, A e B, respectivamente, das sequências chaves (com 4 bases) e dos múltiplos identificadores (MID) (Tabela 1). A sequência MID adicionada ao primer 27F contém 10 bases com combinações diferentes e é usada para identificar as amostras após o sequenciamento. Para cada amostra foi usado um primer 27F com MID diferente. A reação de PCR foi feita em um volume final de 25 µl contendo: 1X PCR do tampão de reação com MgCl₂ (1,5 mM na reação); 0,20 mM de dNTPs; 0.3% de BSA; 0,2 µM de cada primer; 0,05 U/ml Taq polymerase (Roche) e 5 ng de DNA da amostra. A reação de amplificação foi feita com uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. A integridade do produto de PCR foi checada em gel de agarose 1% e posteriormente os produtos da reação foram purificados utilizando o *kit* NucleoSpin gel and PCR clean up (Machery Nagel, Germany) para eliminar o resto de primer e dNTPs. A concentração e pureza dos produtos de PCR foram checados em Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA) usando DNA7500 lab chip (Agilent, USA). As amostras foram diluídas para uma concentração equimolar de 10¹¹ moléculas/µl num *pool* (biblioteca) que foi usado para o sequenciamento. O pirosequenciamento foi realizado em sequenciador 454 GS FLX Titanium system (Roche, Germany) do Research Unit Environmental Genomics (EGEN), no Helmholtz Zentrum München, Alemanha.

Tabela 1. Sequência dos primers 27F usados para amplificação do 16S rRNA das amostras de Solo, rizosfera e nódulos.

Amostra	Fonte	Cultivar	Primer	Sequência MID + 27F (5'→3')
S	Solo	-	27F_MID1	ACGAGTGCGTaga gtt tga tcm tgg ctc
S	Solo	-	27F_MID2	ACGCTCGACAaga gtt tga tcm tgg ctc
S	Solo	-	27F_MID14	CGAGAGATACaga gtt tga tcm tgg ctc
S	Solo	-	27F_MID16	TCACGTACTAaga gtt tga tcm tgg ctc
R-P	Rizosfera	BRS Pujante	27F_MID8	CTCGCGTGTcaga gtt tga tcm tgg ctc
R-P	Rizosfera	BRS Pujante	27F_MID10	TCTCTATGCGaga gtt tga tcm tgg ctc
R-P	Rizosfera	BRS Pujante	27F_MID15	ATACGACGTAaga gtt tga tcm tgg ctc
R-P	Rizosfera	BRS Pujante	27F_MID21	CGTAGACTAGaga gtt tga tcm tgg ctc
R-A	Rizosfera	BRS Acauã	27F_MID19	TGTACTACTCaga gtt tga tcm tgg ctc
R-A	Rizosfera	BRS Acauã	27F_MID7	CGTGTCTCTAaga gtt tga tcm tgg ctc
R-A	Rizosfera	BRS Acauã	27F_MID11	TGATACGTCTaga gtt tga tcm tgg ctc
R-A	Rizosfera	BRS Acauã	27F_MID13	CATAGTAGTGaga gtt tga tcm tgg ctc
N-P	Nódulos	BRS Pujante	27F_MID18	TCTACGTAGCaga gtt tga tcm tgg ctc
N-P	Nódulos	BRS Pujante	27F_MID22	TACGAGTATGaga gtt tga tcm tgg ctc

Tabela 1. Sequência dos primers 27F usados para amplificação do 16S rRNA das amostras de Solo, rizosfera e nódulos.

Amostra	Fonte	Cultivar	Primer	Sequência MID + 27F (5'→3')
N-P	Nódulos	BRS Pujante	27F_MID23	TACTCTCGTGaga gtt tga tcm tgg ctc
N-P	Nódulos	BRS Pujante	27F_MID27	ACGCGAGTATaga gtt tga tcm tgg ctc
N-A	Nódulos	BRS Acauã	27F_MID17	CGTCTAGTACaga gtt tga tcm tgg ctc
N-A	Nódulos	BRS Acauã	27F_MID20	ACGACTACAGaga gtt tga tcm tgg ctc
N-A	Nódulos	BRS Acauã	27F_MID24	TAGAGACGAGaga gtt tga tcm tgg ctc
N-A	Nódulos	BRS Acauã	27F_MID25	TCGTCGCTCGaga gtt tga tcm tgg ctc

4.2.4 Análise dos dados

O GS Run Processor (Roche, Germany) foi usado para uma filtragem inicial das leituras do pirosequenciamento em ordem de remover falhas, leituras de baixa qualidade e os adaptadores das sequências. As sequências foram processadas para análises e checagem de qualidade usando o programa Mothur (SCHLOSS et al. 2009) e submetidas a análise de PyroNoise implementado no Mothur (QUINCE et al. 2009). Sequências menores que 200 nucleotídeos, ou com quimeras foram removidas. As sequências foram alinhadas usando *SILVA-based bacterial reference alignment* (http://www.mothur.org/wiki/454_SOP, release 119) e classificadas usando RDP database (release trainset10_082014.rdp.fasta) com 80% de confiança para atingir melhor classificação taxonômica. Unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foram estabelecidas para sequências com similaridade de 97%, uma vez que é a distância mais reduzida de agrupamento recomendado para sequências de 454 (KUNIN et al., 2010). UTOs que ocorreram somente uma única vez foram excluídas para evitar superestimação da diversidade. O agrupamento das UTOs e a avaliação dos dados foram feitos usando o programa Mothur (SCHLOSS et al., 2009). As árvores filogenéticas com as sequências representativas das UTOs foram geradas usando o programa ARB (LUDWIG et al., 2004). As UTOs foram comparadas com 16S rRNA da base de dados LTP (YARZA et al., 2008). A análise de dados foi feita com colaboração da Doutora Doreen Fischer, Pós-Doutora membra do equipe Research Unit Environmental Genomics (EGEN), no Helmholtz Zentrum München, Alemanha.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Número de UTOs e índices ecológicos

Sequenciamento de alto rendimento (454 pirosequenciamento) foi utilizado para acessar a diversidade de bactérias em solo, rizosfera e em nódulos de feijão-caupi colhidos de experimento feito em Argissolo Amarelo na cidade de Petrolina, Pernambuco. Análises estatísticas foram feitas para avaliar diferenças no número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) e nos índices ecológicos de riqueza, diversidade e abundância das UTOs (Tabela 2). As UTOs foram definidas com base em 97% de identidade das sequências, valor usualmente empregado para comparar e distinguir sequências de 16S rRNA. Após o sequenciamento e checagem da qualidade, foram obtidas 164.500,00 sequências, sendo 8.225,00 de cada repetição dos ambientes analisados (solo, rizosfera e nódulos). Considerando o número global de sequências, 15.054,00 UTOs foram identificadas, destas 9.689,00 (64%) eram UTOs com uma única sequência.

Curvas de rarefação obtidas com a relação entre o número de sequências (8225 sequências) e a média do número de UTOs das quatro repetições mostram que o esforço de sequenciamento não foi suficiente para detectar a diversidade total da comunidade microbiana no solo e rizosfera, uma vez que as curvas não atingiram a zona curvilínea (Figura 1).

Tabela 2. Valores estatísticas de UTOs e perfil ecológico de comunidades de bactérias com base no sequenciamento parcial do 16S rRNA de amostras ambientais (solo, rizosfera e nódulos).

Ambiente	Número de sequências	Número de UTOs	Índice		
			Chao1	Shannon	Simpson
Solo	8225	2232b	4085b	5,94a	0,01b
Rizosfera					
BRS Acauã	8225	2753a	5417a	6,28a	0,01b
BRS Pujante	8225	2581a	5293a	6,20a	0,01b
Nódulo					
BRS Acauã	8225	101c	168c	1,51b	0,41a
BRS Pujante	8225	112c	265c	1,72b	0,36a

Maiores números de UTOs foram encontrados nas duas amostras de rizosfera e foram significativamente ($p < 0,01$) diferentes dos encontrados nas amostras de solo e nódulos (Tabela 2 e Figura 1). Este resultado está em desacordo com estudo prévio que mostrou maior riqueza de UTOs no solo que na rizosfera (UROZ et al., 2010). A maior riqueza de UTOs encontrada na rizosfera neste estudo pode ser explicada pelo motivo de que o experimento foi irrigado, devido a falta de chuva durante o experimento, e portanto está prática pode ter estimulado positivamente o aumento da riqueza de bactérias na rizosfera.

Diversos fatores contribuem para alterações das comunidades bacterianas do solo, entre eles o regime hídrico (KAVAMURA et al., 2013; TORRES-CORTÉZ et al., 2012). No entanto, não ocorreu mudanças na diversidade (Shannon) e abundância (Simpson) de UTOs. Em relação às UTOs encontradas nos nódulos, os índices de riqueza (Chao1), diversidade

(Shannon) e abundância (Simpson) mostram que não houve efeito da cultivar de feijão-caupi nos padrões ecológicos das comunidades de bactérias da rizosfera e associadas aos nódulos ($p > 0,05$). Análises de *metastats* feitas no MOTHUR mostram que não há diferenças qualitativas nas comunidades encontradas na rizosfera e nódulos, indicando que as duas cultivares mostraram mesmo impacto na comunidade bacteriana do solo.

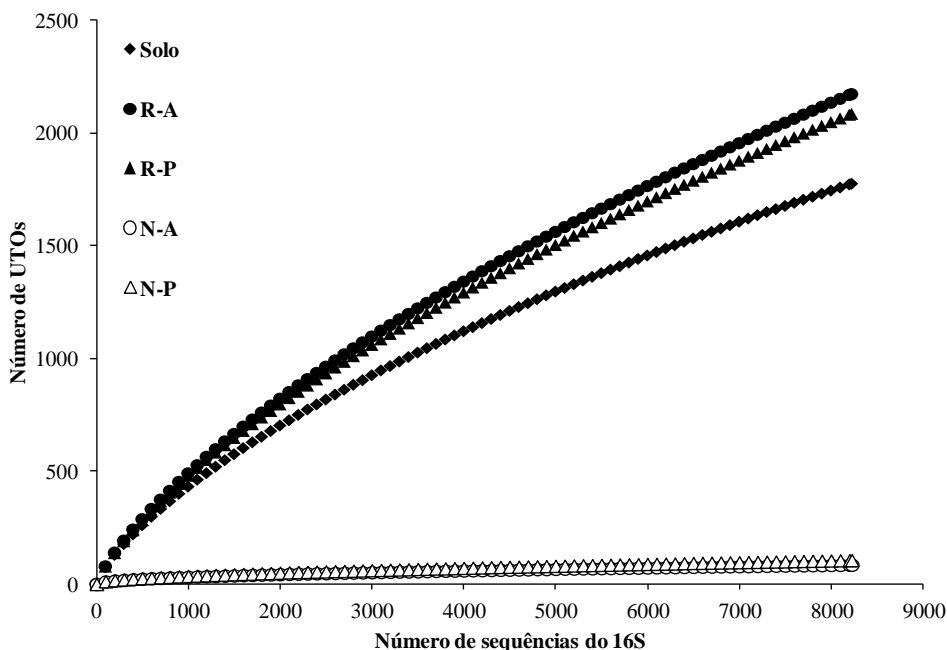


Figura 1. Curvas de rarefação do gene 16S rRNA mostrando a relação entre o número de seqüências e o número de UTOs (média de quatro repetições) de amostras solo, rizosfera (R) e nódulos de duas cultivares de feijão-caupi, BRS Acauã (A) e BRS Pujante (P).

4.3.2 Análise taxonômica com base da seqüência parcial do gene 16S rRNA

A seqüência representativa de cada UTO foi usada para identificação taxonômica no RDP *classifier*. A abundância relativa de cada grupo taxonômico identificado na análise é mostrada na figura 2. A nível de filo, as 15.054,00 UTOs corresponderam a 21 grupos taxonômicos. Nas amostras de solo e rizosfera, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria e bactérias não classificadas (*unclassified bacteria*) foram os grupos mais dominantes representando mais de 70% das UTOs. Este resultado está de acordo com estudo prévio que identificou Actinobactéria como o filo mais abundante em amostras de solo coletadas na Caatinga (KAVAMURA et al., 2013). Embora 21 grupos taxonômicos a nível de filo tenham sido identificados, uma alta proporção de UTOs obtidas da amostra de solo (1861 UTOs) e das duas amostras de rizosfera (2168 e 2119 UTOs) correspondeu a um grupo de bactérias ainda não descritas (*unclassified*). Esse grupo representa uma diversidade microbiana do solo ainda não explorada.

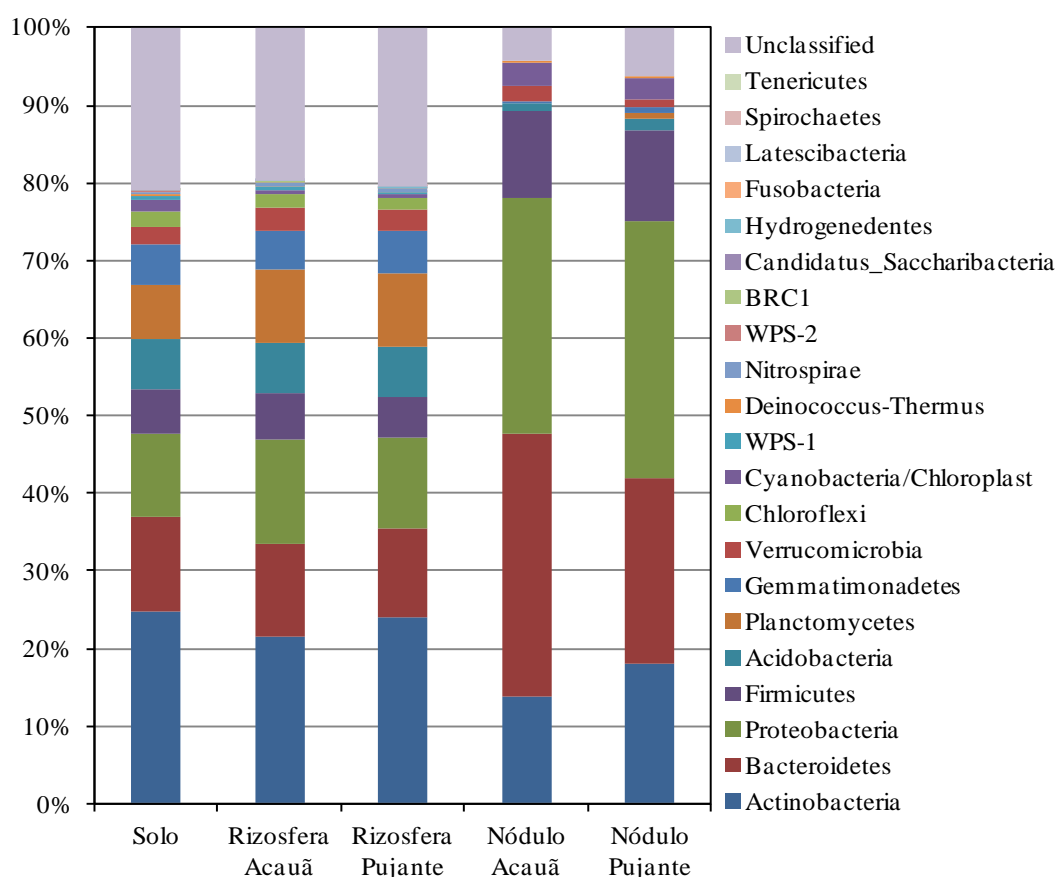


Figura 2. Abundância relativa do número de UTOs do gene 16S rRNA dos filos encontrados nas amostras de solo e rizosfera e nódulos de duas cultivares de feijão-caupi (BRS Acauã e BRS Pujante).

Nos nódulos, os filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria e Firmicutes corresponderam a maioria (>85%) das UTOs encontradas, sendo que Bacteroidetes (49 UTOs e 33.439,00 das sequências) e Proteobacteria (42 UTOs e 27.096,00 das sequências) foram os filos mais abundantes. Juntos, os filos Bacteroidetes e Proteobacteria representaram 96% das sequências encontradas nos nódulos. Era esperado que nas amostras de nódulos Proteobacteria fosse o filo mais representativo, uma vez que as bactérias que induzem a formação de nódulos em leguminosas são todas classificadas neste filo (PEIX et al., 2015). No entanto, uma alta proporção de UTOs e sequências de Bacteroidetes foram encontradas nas amostras de nódulos com abundância maior que Proteobacteria.

Considerando o número de sequências, no filo Proteobacteria, as classes mais abundantes foram Gammaproteobacteria (58,8%) e Alphaproteobacteria (37,4%). No filo Bacteroidetes, as classes mais abundantes foram Flavobacteriia (84,8%) e Sphingobacteriia (10,9%). Vale ressaltar que os grupos taxonômicos encontrados nos nódulos representam uma amostragem de nódulos aleatoriamente coletados em diferentes partes do sistema radicular, e, portanto, as proporções encontradas são diretamente influenciadas pela amostragem.

Num nível mais detalhado da identidade das sequências, as UTOs obtidas dos nódulos representaram 101 grupos taxonômicos ao nível de gênero (Figura 3A), sendo que 35 grupos não foram bem definidos a este nível (NI, não identificados) de acordo com a classificação do RDP. Do total de grupos taxonômicos encontrados, 17 *taxon* foram raros, uma vez que somente uma sequência foi encontrada (Figura 3A). Por outro lado, 19 *taxon* tiveram

freqüência acima de 100 seqüências e representam os grupos dominantes nas amotras de nódulos, incluindo NI Enterobacteriaceae, NI Xanthomonadaceae e NI Burkholderiales (Figura 3B).

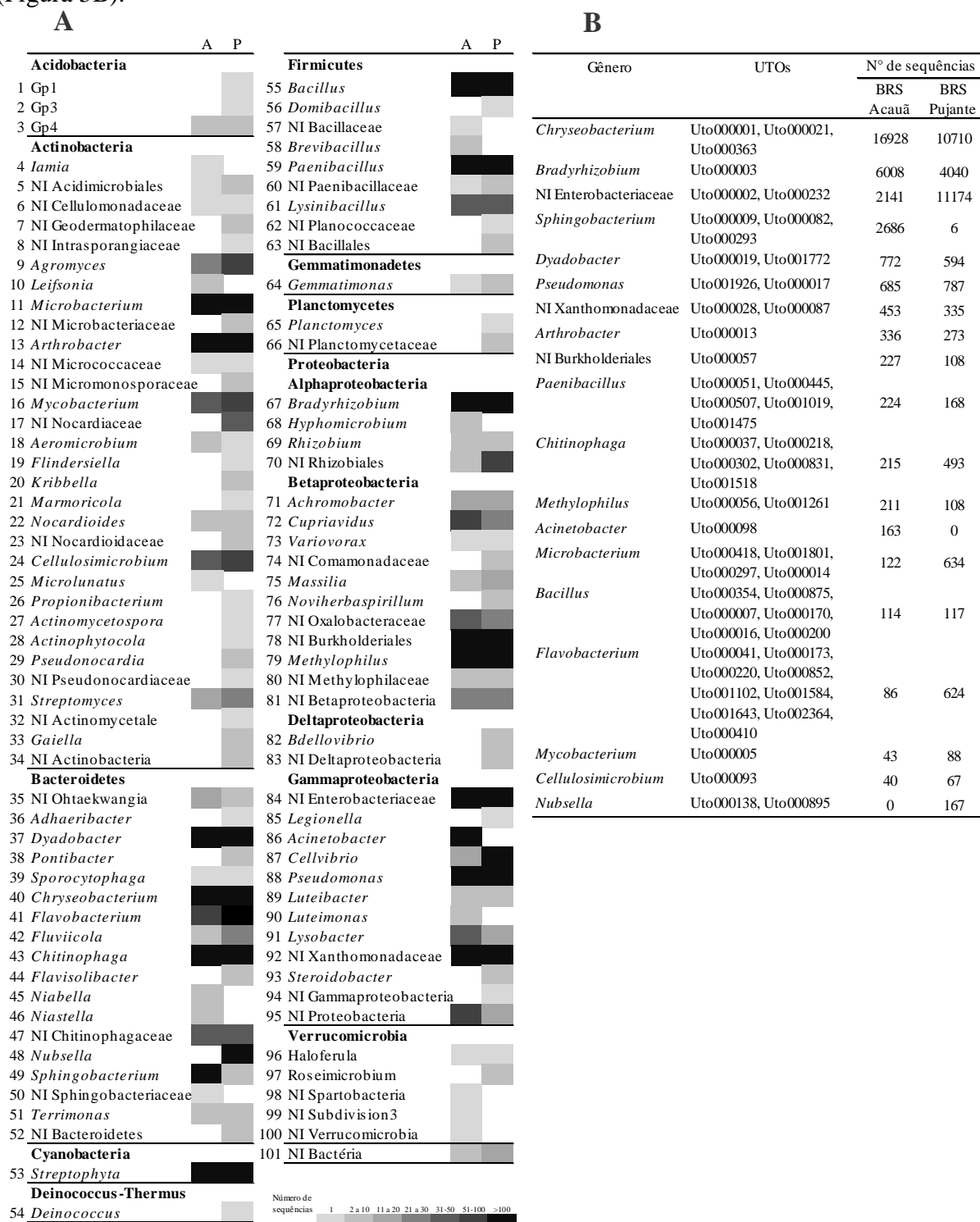


Figura 3. Grupos taxonômicos encontrados nas amotras de nódulos (A) e gêneros mais abundantes (>100 seqüências) com respectivo número de UTOs ocorrentes (B).

Considerando o número de UTOs, *Flavobacterium* (9 UTOs) e *Bacillus* (6 UTOs) foram os gêneros com maior número de UTOs diferentes (Figura 3B), indicando que

membros distintos destes gêneros estão associados aos nódulos. Em relação a ocorrência de gêneros nos nódulos (Figura 4), 31 gêneros foram encontrados nos nódulos de ambos os cultivares, nove foram encontrados somente em nódulos do cultivar BRS Acauã e 21 gêneros foram exclusivos em nódulos do cultivar BRS Punjante. Dos 31 gêneros comuns nas duas amostras de nódulos, somente os gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Cupriavidus* são conhecidos como simbiontes indutores de nódulos de leguminosas. Embora os gêneros *Acinetobacter* e *Nubsella* estejam no grupo de gêneros mais frequentes (Figura 3B), *Acinetobacter* foi encontrado somente em nódulos do cultivar BRS Acauã e *Nubsella* no nódulos do cultivar BRS Pujante. No anexo 1 é possível verificar com mais detalhes a distribuições dos grupos taxonômicos encontrados nas amostras de nódulos.

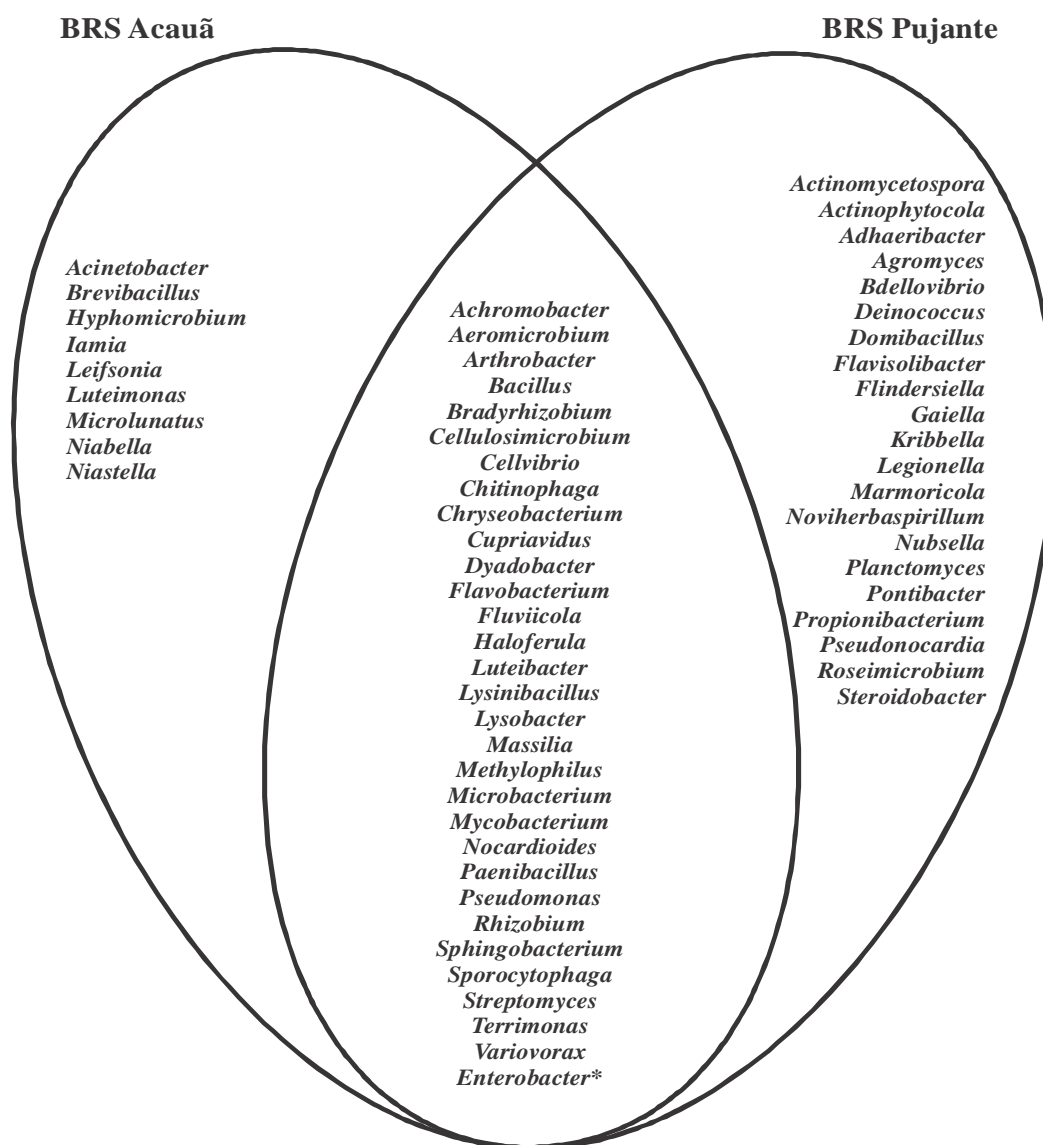


Figura 4. Diagrama de Venn mostrando a ocorrência dos gêneros de bactérias associadas a nódulos de duas cultivares (BRS Acauã e BRS Pujante) de feijão-caupi cultivado em um Argissolo Amarelo em Petrolina-PE. *Gênero que corresponde ao BLAST das UTOs Uto000002 e Uto000232 (Figura 3B) no NCBI.

O estudo da diversidade de bactérias associadas à nódulos de leguminosas é tradicionalmente feito empregando método dependente de cultivo, onde o meio YMA (FRED & WAKSMAN, 1928; VINCENT, 1970) é frequentemente utilizado para o isolamento de bactérias. No entanto, o uso de meios de cultivo pode favorecer e /ou limitar o crescimento de grupos bacterianos. O emprego de técnicas independentes de cultivo pode superar a limitação metodológica do uso de meios seletivos para estudo de comunidades microbianas. Neste caso, o DNA ambiental extraído da amostra é analisado sem um prévio cultivo e isolamento das bactérias, permitindo o conhecimento do panorama geral da diversidade existente na amostra. Neste sentido, Fischer et al. (2011) usaram técnica independente de cultivo e identificaram sequências de DNA de *Bradyrhizobium* em amostras de raiz de cana-de-açúcar. Até então, *Bradyrhizobium* não tinha sido identificado associado as raízes de poaceas, utilizando o método tradicional de isolamento de bactérias endofíticas (BALDANI et al., 2014). Posteriormente, com base nos resultados do trabalho de Fischer et al. (2011), novas abordagens de isolamento foram utilizadas para isolar estirpes de *Bradyrhizobium* de raízes de cana-de-açúcar (ROUWS et al., 2014). Atualmente todas as bactérias conhecidas como rizóbio são Proteobactérias membros das classes Alphaproteobactéria e Betaproteobactéria (PEIX et al., 2015). No entanto, diversos estudos têm mostrado que os nódulos são colonizados por diversas bactérias para além do grupo do rizóbio e são consideradas endofíticas de nódulos (LI et al., 2008; ASERSE et al., 2013; XU et al., 2014). Recentemente, De Meyer et al. (2015) avaliaram uma coleção de mais de 654 isolados obtidos de nódulos de leguminosas nativas na Bélgica e identificaram 50 gêneros bacterianos de diferentes classes, indicando que o nódulo é um excelente ambiente para isolamento de uma variedade de bactérias.

Utilizando 454 pirosequenciamento neste trabalho, diversos gêneros foram identificados associados aos nódulos de feijão-caupi. Muitos dos gêneros isolados de nódulos de leguminosas nativas no estudo de De Meyer et al. (2015) foram indentificados nas amotras de nódulos de feijão-caupi neste trabalho, tais como: *Acinetobacter*, *Aeromicrobium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Chryseobacterium*, *Dyadobacter*, *Enterobacter*, *Leifsonia*, *Lysinibacillus*, *Massilia*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Variovorax*. Os gêneros *Acinetobacter*, *Brevibacillus* e *Leifsonia* foram identificados somente nos nódulos do cultivar BRS Acauã, os demais foram encontrados nos nódulos dos dois cultivares (Figura 4). Os gêneros *Acromobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Paenibacillus*, por exemplo, já foram previamente isolados de nódulos de feijão-caupi (GUIMARÃES et al., 2012; JARAMILLO et al., 2013). *Acinetobacter*, *Enterobaceter* e *Leifsonia* foram identificados entre os isolados de nódulos de feijão-caupi caracterizados no Capítulo II deste estudo. Embora muitas bactérias consideradas endofíticas têm sido isoladas de nódulos, ainda não está claro qual a função destas bactérias nos nódulos.

Considerando os gêneros conhecidos como rizóbios, na classe Alphaproteobacteria, foram identificados somente os gêneros *Bradyrhizobium* (10.048,00 sequências) e *Rhizobium* (11 sequências). Nesta classe, 61 sequência da Uto000061 foram classificadas no RDP como NI Rhizobiales. A análise de BLAST desta UTO no banco de sequências do NCBI mostrou que a Uto000061 é similar a sequência de 16S rRNA de *Devosia*, um gênero que abriga membros com capacidade de nodular leguminosas (RIVAS et al., 2003) ou endofiticamente (BAUTISTA et al., 2010) nódulos de leguminosas. Nas amostra de solo e rizosfera foram identificadas 2 UTOs de *Microvirga* (Uto0000695, 19 sequências; Uto001646, 4 sequências), um gênero recentemente descrito como simbiote de feijão-caupi no semiárido do Brasil. No entanto, sequências de *Microvirga* não foram encontradas nas amostras de nódulos. Na classe Betaproteobacteria, foi identificado nos nódulos sequências do gênero *Cupriavidus* (Uto000174, 75 sequências).

No Brasil, o estirpes do gênero *Cupriavidus* já foram isoladas de nódulos de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) e foram capazes de nodular feijão-caupi (SILVA et al., 2012). Quanto ao gênero *Burkholderia*, típico beta-rizóbio de *Mimosa* spp. na região semiárida do Brasil (BONTEMPS et al., 2010; REIS JUNIOR et al., 2010) e identificado em nódulos de feijão-caupi (Capítulo II), neste estudo não foram identificadas sequências deste gênero em nenhum dos ambientes analisados (solo, rizosfera e nódulos). Provavelmente, a comunidade de *Burkholderia* neste solo avaliado esteja muito baixa ou não represente possíveis simbiontes de feijão-caupi, portanto não sendo identificadas neste estudo.

Sequências do gênero *Methylophilus* foram identificadas em sete das oito amostras de nódulos. O gênero *Methylophilus* compreende um grupo de bactérias metilotróficas facultativas capazes de crescer utilizando metanol como única fonte de energia (JENKINS et al., 1987). Bactérias metilotróficas do gênero *Methylobacterium* já foram descritas como nodulantes de leguminosas tropicais (SY et al., 2001; MADHAIYAN et al., 2009). Utilizando meio M72, com metanol como fonte de carbono, Madhaiyan et al. (2009) conseguiram isolar diversas estirpes de *Methylobacterium* de nódulos de 14 diferentes leguminosas na Índia, incluindo feijão-caupi. Todas as estirpes de *Methylobacterium* foram capazes de nodular e expressar atividade da nitrogenase em nódulos de siratro (*Macroptilium atropurpureum*). “Rizóbios metilotróficos” podem, portanto, serem isolados de nódulos utilizando meio enriquecido com metanol em substituição ao manitol, tradicional fonte de carbono usada no meio YM para isolar bactérias de nódulos (FRED & WAKSMAN, 1928; VINCENT, 1970). Essa estratégia pode ser aplicada para tentar isolar *Methylophilus* de nódulos de feijão-caupi, sendo a área onde este estudo foi desenvolvido um sítio promissor para o isolamento de *Methylophilus*.

4.3.3 UTOs mais frequentes

Dezenove UTOs foram encontradas como mais frequentes nas amostras de nódulos (Figura 5), destas 8 UTOs eram de Bacteroidetes (Uto000001 *Chryseobacterium*, Uto000009 *Sphingobacterium*, Uto000019 *Dyadobacter*, c *Chryseobacterium*, Uto000037 *Chitinophaga*, Uto000041 *Flavobacterium*, Uto000082 *Sphingobacterium* e Uto000138 *Nubsella*), 7 UTOs de Proteobacteria (Uto000002 NI Enterobacteriaceae, Uto000003 *Bradyrhizobium*, Uto000017 *Pseudomonas*, Uto000028 NI Xanthomonadaceae, Uto000056 *Methylophilus*, Uto000057 NI Burkholderiales e Uto000098 *Acinetobacter*), duas UTOs de Actinobacteria (Uto000013 *Arthrobacter* e Uto000014 *Microbacterium*) e uma UTOs de Firmicutes (Uto000051 *Paenibacillus* e). A Uto000012 *Streptophyta* corresponde a sequência do 16S rRNA do cloroplasto. De modo geral, a Uto000001 de *Chryseobacterium*, Uto000002 de NI Enterobacteriaceae e Uto000003 *Bradyrhizobium* dominaram as amostras com algumas diferenças. A Uto000001, por exemplo, foi mais frequente nos nódulos do cultivar BRS Acauã, com exceção para a amostra A1, onde ocorreu maior abundância da Uto000003 de *Bradyrhizobium*. Nas amostras do cultivar BRS Pujante, houve maior abundância da Uto000002 de NI Enterobacteriaceae, com exceção da amostra A4, onde houve maior ocorrência da Uto000001 de *Chryseobacterium*. Quando a ocorrência, as UTOs 1, 2, 3, 13, 14, 17, 19, 28, 37, 51, 57 foram encontradas em todas as oito amostras de nódulos (BRS Acauã e BRS Pujante) e correspondem, respectivamente, aos taxon *Chryseobacterium*, NI Enterobacteriaceae, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Dyadobacter*, NI Xanthomonadaceae, *Chitinophaga*, *Paenibacillus*, NI Burkholderiales.

As três UTOs mais frequentes (Uto000001, Uto000002 e Uto000003) e a Uto000021, também de *Chryseobacterium* encontrado em sete das oito amostras de nódulos, foram usadas

para reconstrução filogenéticas para identificar as associações com espécies de bactérias descritas (Figura 6). As UTOs de *Chryseobacterium* representam dois *taxon* distintos dentro do gênero (Figura 6A), em que a Uto000001 apareceu filogeneticamente associada a espécie *Chryseobacterium aquifrigidense* e a Uto000021 formou uma brecha associada a espécie *Chryseobacterium daecheongense*. A Uto000002 foi classificada no RDP como NI Enterobacteriaceae. A análise de filogênia agrupou a Uto000002 dentro do *clade* do gênero *Enterobacter*, numa brecha vizinha à espécie *Enterobacter ludwigii* (Figura 6B). Uma estirpe relacionada a espécie *Enterobacter ludwigii* foi previamente isolada de nódulo de feijão-caupi (Capítulo II). Por fim, a Uto000003 de *Bradyrhizobium* foi agrupada dentro do *clade* do grande grupo de espécies associadas a *Bradyrhizobium japonicum* numa brecha ligada a espécie *Bradyrhizobium yuanmingense*.

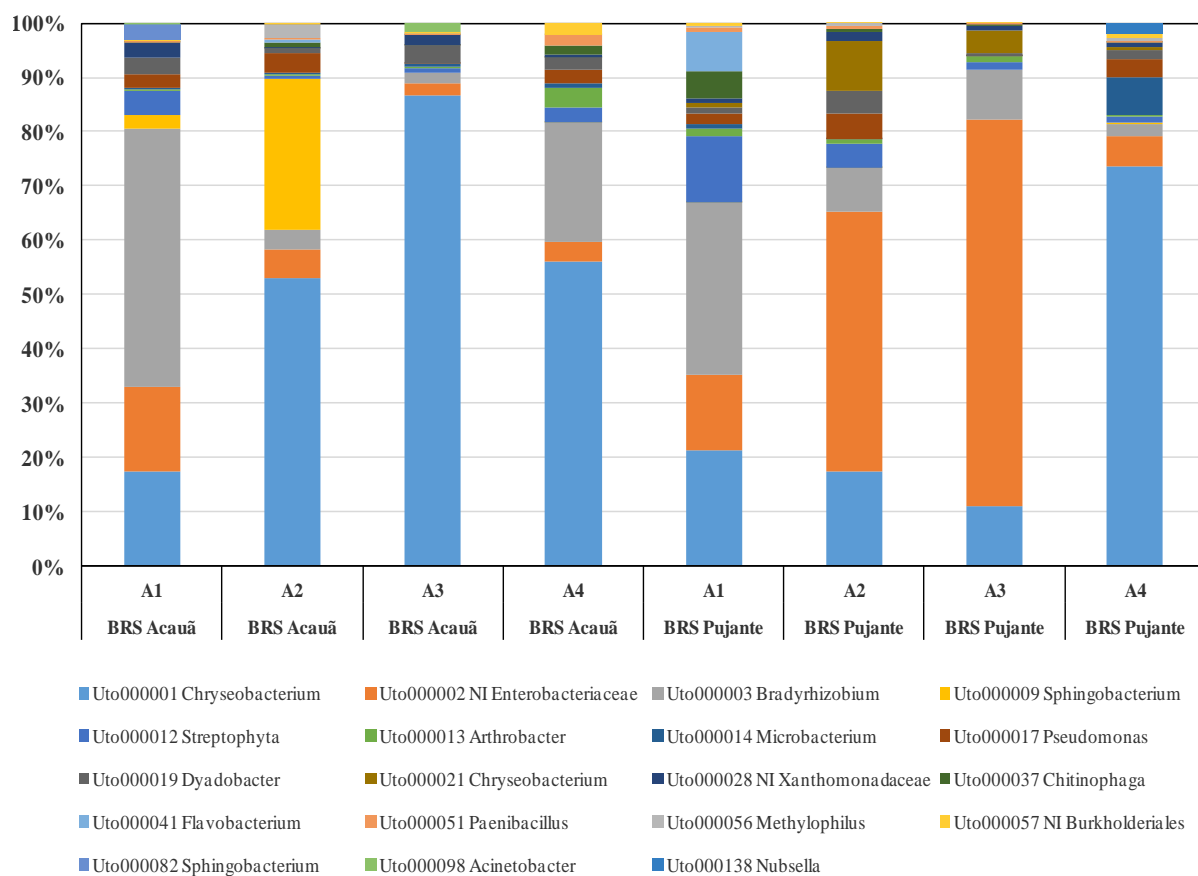


Figura 5. UTOs mais frequentes nas amostras (A1-4) de nódulos dos cultivares de feijão-caupi BRS Acauã e BRS Pujante.

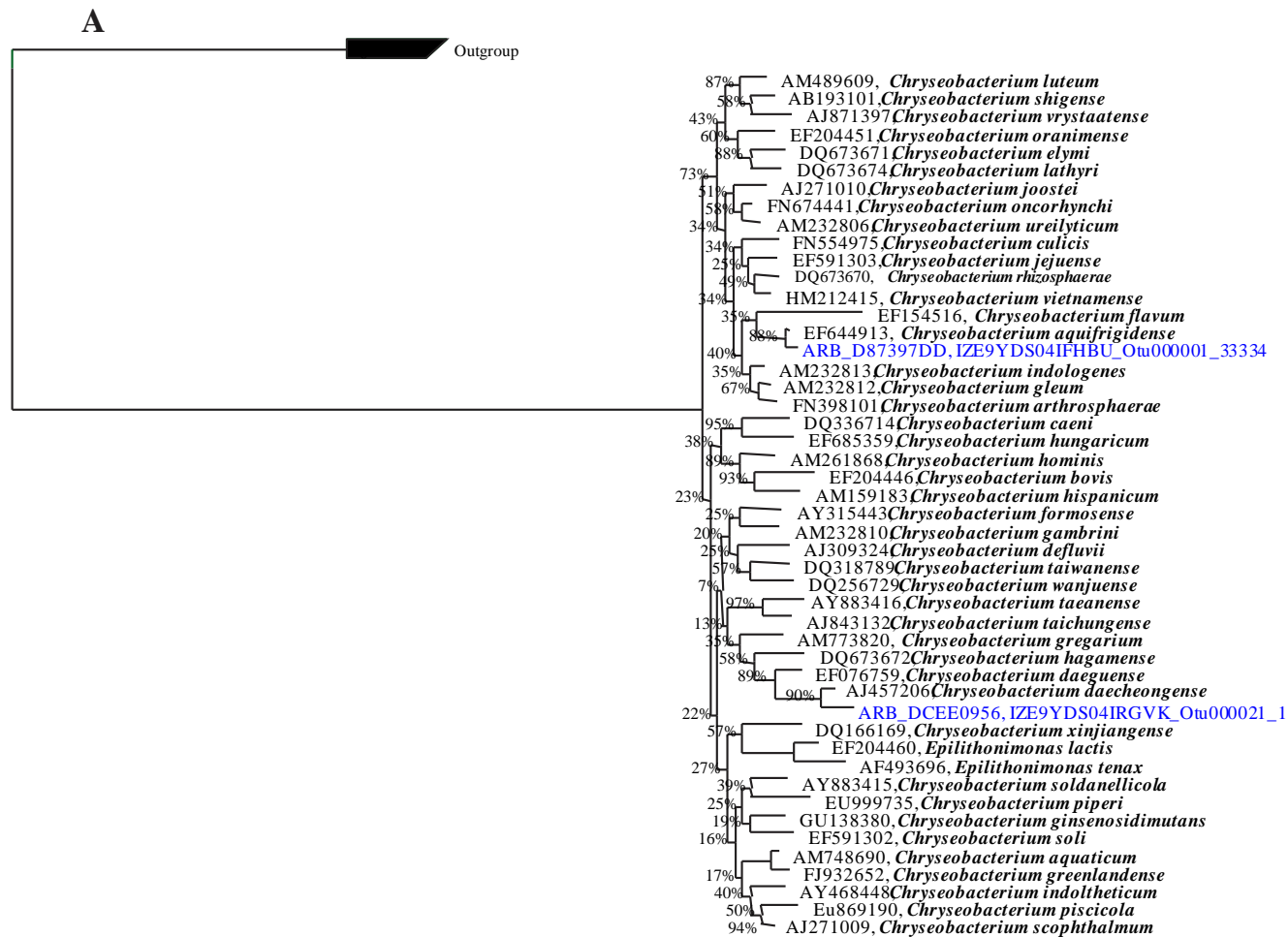


Figura 6. Relações filogenéticas entre as UTOs (azul) mais frequentes nos nódulos identificadas com *Chryseobacterium* (A), NI Entreobacteriaceae (B) e *Bradyrhizobium* (C) com o 16S rRNA de estirpes tipos de gêneros relacionados. A análise filogenética foi feito no ARB usando o método Neighbour-joining. O número de acesso da sequência das estirpes tipo é fornecido antes do nome da espécie.

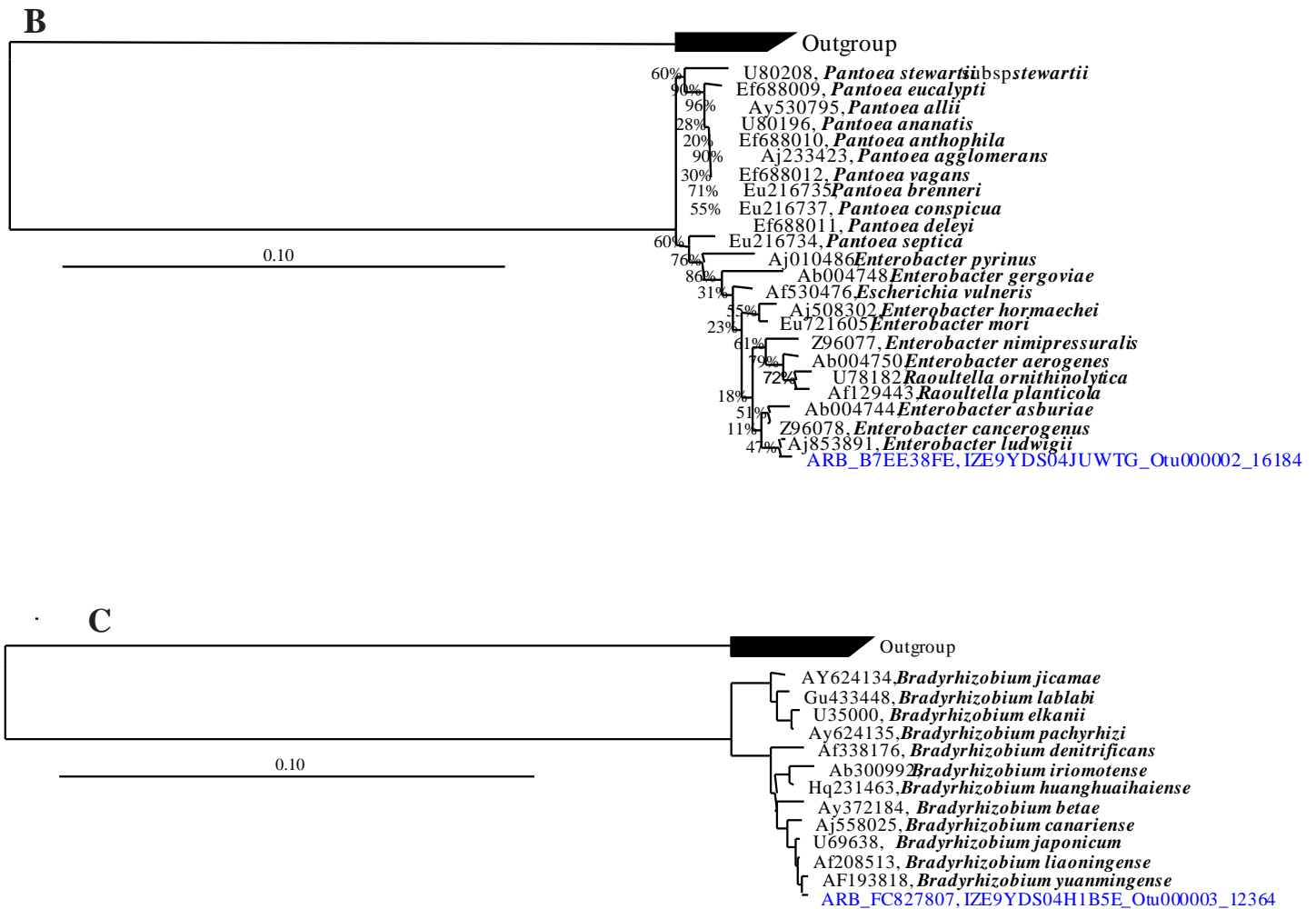


Figura 6. Continuação.

Os grupos taxonômicos mais frequentes encontrados nas amostras de nódulos representam diversos gêneros de bactérias com competência rizosférica para colonizar as raízes de diversas espécies de plantas; muitos, inclusive, bem conhecidos como promotores do crescimento vegetal, como, por exemplo, *Enterobacter*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* (NAVEED et al., 2014; ÇAKMAKÇI et al.; 2006; VESSEY, 2003). As bactérias desenvolveram diversos mecanismos pelos quais podem beneficiar o crescimento da planta hospedeira, tais como fixação biológica do nitrogênio, produção de compostos indólicos, solubilização de fosfato, controle de fitopatogénos ou indução de resistência sistêmica a fatores bióticos e abióticos (MEHTA et al., 2015; KUMAR et al., 2012; BARRIUSO et al., 2008; BALDANI & BALDANI, 2005). Algumas estirpes bacterianas, inclusive, apresentam mais de um destes traços promotores do crescimento de plantas (AHMAD et al., 2008). No gênero *Acinetobacter*, por exemplo, uma única estirpe é capaz de solubilizar fosfato, solubilizar zinco, produzir siderofóro e ácido indolacético-AIA (ROKHBAKHSH-ZAMIN et al., 2011).

Os gêneros *Chryseobacterium*, *Dyadobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Sphingobacterium* já foram reportados em nódulos de leguminosas (DE MEYER et al., 2015). Não há relatos de isolamento de bactérias dos gêneros *Chitinophaga*, *Methylophilus* e *Nubsella* de nódulos de leguminosas. O gênero *Chitinophaga* abriga bactérias com competência para colonizar a rizosfera (LEE & WHANG, 2014) e raízes (LI et al., 2013) de plantas, bem como bactérias com habilidades para o intemperismo mineral de rochas ricas em potássio (WANG et al. 2014). O gênero *Methylophilus* possui seis espécies validadas (<http://www.bacterio.net/methylophilus.html>), algumas isoladas de rizosfera (DORONINA et al. 2012) ou associadas a plantas (GOGLEVA et al. 2010). Pouco se sabe sobre a ecologia do gênero *Nubsella*, descrito em 2008 e com apenas uma espécie (ASKER et al., 2008).

A ocorrência de maior abundância do gênero *Chryseobacterium* (Uto000001 + Uto000021) nas amostras de nódulos foi supresa. Era esperado nos nódulos maior frequência de gêneros conhecidos como clássicos rizóbios de feijão-caupi, como, por exemplo, *Bradyrhizobium*. No entanto, *Bradyrhizobium* foi o terceiro gênero mais abundante e somente um tipo de 16S rRNA relacionada a espécie *Bradyrhizobium yuanmingense* foi identificado (Figura 6C). Estirpes de *Chryseobacterium* já foram isoladas de nódulo de feijão-comum em Cuba (SÁNCHEZ et al., 2014), de *Cytisus scoparius*, *Lotus pedunculatus* e *Robinia pseudoacacia* na Bélgica (DE MEYER et al., 2015) e de *Cicer arietinum* no Paquistão (ALI et al., 2014).

O isolamento de *Chryseobacterium* a partir de nódulos de diferentes leguminosas e em diferentes países sugerem que o gênero *Chryseobacterium* faz parte da comunidade de bactérias capazes de colonizar nódulos de leguminosas. No entanto, a natureza dessa interação, se endofítica ou simbiótica, ainda não é bem clara. De Meyer et al. (2015) isolaram 50 gêneros de nódulos de diferentes leguminosas, incluindo *Chryseobacterium*. Os autores prospectaram os genes relacionados à fixação do nitrogênio (*nifH*) e à nodulação (*nodC*) utilizando PCR e obtiveram resultados negativos. Todavia, os autores recomendam testes de nodulação para confirmar a natureza da interação. *Chryseobacterium* coloniza uma variedade de nichos, tais como: amostras clínicas (HOLMES et al., 2013), sedimentos marinhos (KÄMPFER et al., 2009), solo (WEON et al., 2008) e associado às plantas, colonizando a rizosfera (KÄMPFER et al., 2014) e filosfera (BEHRENDT et al., 2007). Já foi mostrado que estirpe do gênero *Chryseobacterium* melhora a performance simbiótica de *Sinorhizobium* em soja (LUCAS-GARCÍA et al., 2004) e promove melhorias dos parâmetros de nodulação em feijão-comum e soja em ambiente salino (ESTÉVEZ et al., 2009).

O aumento crescente de trabalhos mostrando a diversidade de bactérias endofíticas de nódulos aponta um campo de pesquisa atraente para identificação e caracterização de possíveis associações entre leguminosas e bactérias endofíticas. Embora diversos gêneros têm sido isolados de nódulos, ainda pouco se sabe sobre quais as contribuições que estas bactérias desempenham nos nódulos. Foi mostrando que nódulos de *Lupinus angustifolius* e *Medicago sativa* naturalmente abrigam estipes de *Micromonospora* (TRUJILLO et al., 2010; MARTÍNEZ-HIDALGO et al., 2014) e que algumas estipes promoveram a performance simbiótica de *Medicago sativa* com o simbionte original *Ensifer meliloti* (MARTÍNEZ-HIDALGO et al., 2014). Bactérias com mecanismos diferentes para promover o crescimento de planta podem aumentar o desempenho produtivo de culturas agrícolas em campo, quando combinadas num inoculante misto (HUNGRIA et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; SCHULTZ et al., 2014; SÁNCHEZ et al., 2014). Usando técnica independente de cultivo, foi possível indentificar, neste estudo, diversos gêneros que abrigam bactérias relacionadas a promoção do crescimento de plantas. Muito destes gêneros já foram reportados em nódulos de diversas leguminosas.

Com base nestes resultados, estratégias de cultivo podem ser desenvolvidas para isolamento de grupos alvos, tais como *Chrysobacterium*, o gênero mais frequente, *Chitinophaga* e *Nubsella*, gêneros pouco conhecidos e *Methylophilus*, um potencial “rizóbio metilotrófico”.

4.6 CONCLUSÕES

As comunidades bacterianas encontradas nos diferentes ambientes corresponderam a 22 grupos taxonômicos no nível de filo e seguiu um gradiente de diversidade onde rizosfera>solo>nódulo.

Os fillos Actinobacteria, Bacteriodetes e Proteobacteria foram mais frequentes nos ambientes solo e rizosfera, e Bacteriodetes e Proteobacteria nas amostras de nódulos.

Os cultivares BRS Acauã e BRS Pujante mostram mesmo impacto na alteração das comunidades bacterianas do solo, não havendo diferenças significativas na composição das comunidades encontradas na rizosfera dos dois cultivares.

Os gêneros *Chryseobacterium*, *Enterobacter* e *Bradyrhizobium* foram mais frequentes nos nódulos e ocorreram em todas as amostras.

Os gêneros *Chitinophaga*, *Methylophilus* e *Nubsella* foram identificados pela primeira vez associados a nódulos de leguminosas.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A partir de uma coleção de 86 isolados obtidos de nódulos de feijão-caupi, cultivado em amostras de solo de áreas com histórico tradicional de cultivo da cultura, foi possível identificar os gêneros *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Microvirga* e *Rhizobium*, que abrigam membros com capacidade de nodular leguminosas, e *Acinetobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Leifsonia*, *Pantoea* e *Ralstonia*, previamente identificados como endofíticos de nódulos de leguminosas.

Utilizando método independente de cultivo, foi possível identificar que os diferentes genótipos de feijão-caupi causaram mesmo impacto na alteração das comunidade de bactérias do solo, uma vez que as comunidades na rizosfera foram semelhante em ambas os cultivares. O perfis das comunidades bacterianas associadas aos nódulos nos dois cultivares se sobreporam em grande parte, indicando um grupo comum e com alta diversidade de bactérias associadas aos nódulos de feijão-caupi na área avaliada, com destaque para *Chryseobacterium*, *Enterobacter* e *Bradyrhizobium*.

Usando duas abordagens, isolamento prévio das bactérias e avaliação independente de cultivo, para caracterizar a diversidade de bactérias associadas aos de nódulos de feijão-caupi foi possível confirmar a hipótese de que nos solos do semiárido do Brasil há uma alta diversidade de bactérias associadas aos nódulos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As fronteiras agrícolas do cultivo de feijão-caupi no Brasil expandiram nos últimos 10 anos. Tradicionalmente cultivado nas regiões Norte e Nordeste, em área de pequenos agricultores, o feijão-caupi agora configura o grupo de culturas produtoras de grãos cultivadas na região do Centro-Oeste. Os esforços em melhoramento de novos cultivares e a seleção de estirpes de *Bradyrhizobium* eficientes para fixação biológica do nitrogênio (FBN) contribuíram para a expansão do feijão-caupi para áreas mais tecnificadas. Este avanço desperta ainda mais o interesse em pesquisa científica para entender e selecionar genótipos (planta e bactérias) promissores para fixação biológica do nitrogênio nos sistemas agrícolas.

O feijão-caupi pode estabelecer simbiose com uma ampla diversidade de rizóbio. No entanto, estudos recentes mostraram que o feijão-caupi pode selecionar grupos específicos de bactérias quando cultivado por anos sucessivos na mesma área. Os resultados da diversidade de *Bradyrhizobium* encontrado neste trabalho, alinham-se aos encontrados em regiões na África e Índia com histórico frequente de cultivo de feijão-caupi. A região Norte e Nordeste do Brasil possuem áreas com longa tradição em cultivo de feijão-caupi e são regiões de contraste climático. Estes dois fatores juntos formam um cenário interessante para a prospecção de rizóbio de feijão-caupi, pois talvez nestas áreas a presença frequente de feijão-caupi tenha selecionado o rizóbio adaptado às condições endofoclimáticas. Em adição a isso, tanto na região Norte como na região Nordeste existem programas de melhoramento de feijão-caupi, onde ano após ano cultivos sucessivos dessa cultura são realizados. Estas áreas representam importantes *hotspots* da diversidade de bactérias associadas a nódulos de feijão-caupi.

Em área sem longo cultivo de feijão-caupi é possível identificar uma alta diversidade de bactérias associadas aos nódulos. Com o resultado da análise independente de cultivo foi possível verificar que uma alta diversidade de bactérias associadas aos nódulos de feijão-caupi, confirmando que *Bradyrhizobium* é o gênero comum. No entanto, novos gêneros parecem ser potenciais simbiontes, como *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, mas serão necessárias coletas de amostras de solo na área de estudo e o estabelecimento de estratégias de cultivo em laboratório para isolar bactérias destes gêneros e então testar a capacidade de nodulação em feijão-caupi.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, v. 163, n. 2, p. 173–181, 2008.
- ALCANTARA, R. M. C. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; ROCHA, M. M.; CARVALHO, J. S. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. *Revista Ciência Agronômica*, v. 45, n. 1, p. 1-9, 2014.
- ALI, A.; KHALID, R.; ALI, S.; AKRAM, Z.; HAYAT, R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from chickpea (*Cicer arietinum*). *British Microbiology Research Journal*, v. 6, n. 1, p. 32-40, 2015.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- AMANN, R. I., LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995.
- ANZUAY, M. S.; ORNELLA FROLA, O.; ANGELINI, J. G.; LUDUEÑA, L. M.; FABRA, A.; TAURIAN, T. Genetic diversity of phosphate-solubilizing peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated bacteria and mechanisms involved in this ability. *Symbiosis*, v. 60, n. 3, p. 143-154, 2013.
- APPUNU, C.; N'ZOUÉ, A.; MOULIN, L.; DEPRET, G.; LAGUERRE, G. *Vigna mungo*, *V. radiata* and *V. unguiculata* plants sampled in different agronomical-ecological-climatic regions of India are nodulated by *Bradyrhizobium yuanmingense*. *Systematic and applied microbiology*, v. 32, n. 7, p. 460–70, 2009.
- ARDLEY, J. K.; PARKER, M. A.; MEYER, S. E.; TRENGOVE, R. D.; O'HARA, G. W.; REEVE, W. G.; YATES, R. J.; DILWORTH, M. J.; WILLEMS, A.; HOWIESON, J. G. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, p. 2579–2588, 2012.
- ASERSE, A. A.; RÄSÄNEN, L. A.; ASEFFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTRÖM, K. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 23, p. 10117–10134, 2013.
- ASKER, D.; BEPPU, T.; UEDA, K. *Nubsella zeaxanthinifaciens* gen. nov., sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium of the family Sphingobacteriaceae isolated from freshwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 601-606, 2008.
- BAI, Y. M.; D'AOUST, F.; SMITH, D. L.; DRISCOLL, B. T. Isolation of plant-growthpromoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 230-238, 2002.

- BALACHANDAR, D.; RAJA, P.; KUMAR, K.; SUNDARAM, S. P. Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, v. 2, n. 2, p. 049-057, 2007.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, v. 1, n. 1-2, p. 413-431, 2014.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.
- BARRIUSO, J.; SOLANO, B. R.; GUTIÉRREZ MAÑERO, F. J. Protection against pathogen and salt stress by four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* sp. on *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*, v. 98, n. 6, p. 666-672, 2008.
- BAUTISTA, V. V.; MONSALUD, R. G.; YOKOTA, A. *Devosia yakushimensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, p. 627-632, 2010.
- BEHRENDT, U.; ULRICH, A.; SPRÖER, C.; SCHUMANN, P. *Chryseobacterium luteum* sp. nov., associated with the phyllosphere of grasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, p. 1881-1885, 2007.
- BEJARANO, A.; RAMÍREZ-BAHENAA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; PEIX, A. *Vigna unguiculata* is nodulated in Spain by endosymbionts of Genisteeae legumes and by a new symbiovar (vignae) of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 37, n. 3, p. 533-540, 2014.
- BELANE, A. K.; ASIWE, J.; DAKORA, F. D. Assessment of N₂ fixation in 32 cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) genotypes grown in the field at Taung in South Africa, using ¹⁵N natural abundance. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 55, p. 11450-11458, 2011.
- BELANE A. K.; DAKORA F. D. Symbiotic N₂ fixation in 30 cowpea field-grown cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes in the Upper West Region of Ghana measured using ¹⁵N natural abundance. *Biology and Fertility of Soils*, v. 46, n. 2, p. 191-198, 2010.
- BELANE, A. K.; DAKORA, F. D. Measurement of N₂ fixation in 30 cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes under field conditions in Ghana, using the ¹⁵N natural abundance technique. *Symbiosis*, v. 48, n. 1-3, p. 47-56, 2009.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 62, n. 3, p. 293-300, 1951.
- BODENHAUSEN, N.; HORTON M. W.; BERGELSON, J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, v. 8, n. 2, e56329, 2013. (doi: 10.1371/journal.pone.0056329)
- BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; REIS JUNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; FARIA, S. M.; SPRENT, J. I. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Molecular Ecology*, v. 19, n. 1, p. 44-52, 2010.
- BOURNAUD, C.; FARIA, S. M.; SANTOS, J. M. F.; TISSEYRE, P.; SILVA, M.; CHAINTREUIL, C.; GROSS, E.; EUAN K. JAMES, E. K.; YVES PRIN, Y.; MOULIN, L. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the

Piptadenia Group (Tribe Mimoseae). PLoS One, v. 8, n. 5, e63478, 2013. (doi:10.1371/journal.pone.0063478)

BRADY, C.; CLEENWERCK, I.; VENTER, S.; COUTINHO, T.; DE VOS, P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. Systematic and Applied Microbiology, v. 36, n. 5, p. 309–319, 2013.

BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. Bragantia, v. 70, n. 1, p. 206-215, 2011.

CARDOSO, J. D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N(2) with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Applied Microbiology and Biotechnology, v. 93, n. 5, p. 2035–2049, 2012.

ÇAKMAKÇI, R.; DÖNMEZ, F.; AYDIN, A.; ŞAHİN, F. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. Soil Biology and Biochemistry, v. 38, p. 1482–1487, 2006.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R. R.; SANTOS, G. R.; CHAGAS L. F. B. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO. Revista Ciência Agronômica, v. 41, n. 4, p. 709-714, 2010.

CHAUDHARY, H. J.; PENG, G.; HU, M.; HE, Y.; YANG, L.; LUO, Y.; TAN, Z. Genetic diversity of endophytic diazotrophs of the wild rice, *Oryza alta* and identification of the new diazotroph, *Acinetobacter oryzae* sp. nov. Microbial Ecology, v. 63, n. 4, p. 813-821, 2012.

CHAHBOUNE, R.; CARRO, L.; PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; BARRIJAL, S.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. Systematic and Applied Microbiology, v. 35, n. 5, p. 302-305, 2012.

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.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; Moreira, F. M. de S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013.

DAMASCENO-SILVA, K. J. Estatística da produção de feijão-caupi. Grupo Cultivar. 2009. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/arquivos/estatistica.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2011.

- DE MEYER, S. E.; DE BEUF, K.; VEKEMAN, B.; WILLEMS, A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, v. 83, p. 1-11, 2015.
- DENG, Z. S.; ZHAO, L. F.; KONG, Z. Y.; YANG, W. Q.; LINDSTRÖM, K.; WANG, E. T.; WEI, G. H. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 76, n. 3, p. 463-475, 2011.
- DORONINA, N. V.; GOGLEVA, A. A.; TROTSSENKO, Y. A. *Methylophilus glucosoxydans* sp. nov., a restricted facultative methylotroph from rice rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, p. 196-201, 2012.
- DUDEJA, S. S.; GIRI, R.; SAINI, R.; SUNEJA-MADAN, P.; ERIKA KOTHE, E. Interaction of endophytic microbes with legumes. *Journal of Basic Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 248-260, 2012.
- EMBRAPA MEIO-NORTE. Cultivo de Feijão-Caupi. Jan/2003. Disponível em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/index.ht>> Acesso em: 10 dez 2014. (Embrapa Meio-Norte. Sistemas de Produção, 2).
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de métodos de análise de solo. 2ª edição. Rio de Janeiro,: CNPS/ EMBRAPA, 1997. 212p.
- ESTÉVEZ, J.; DARDANELLI, M. S.; MEGÍAS, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N. Symbiotic performance of common bean and soybean co-inoculated with rhizobia and *Chryseobacterium balustinum* Aur₉ under moderate saline conditions. *Symbiosis*, v. 49, n. 1, p. 29-36, 2009.
- ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; VINUESA, P.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; HIRSCH, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Current Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 51-60, 2013.
- FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M. ; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTTER, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant and Soil*, v. 356, n. 1-3, p. 83-99, 2012.
- FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. S. Características simbióticas e fenotípicas de *Azorhizobium doebereineriae*, microossimbiote de *Sesbania virgata*. *Revista Árvore*, v. 33, n. 2, p. 215-226, 2009.
- FRED, E. B.; WAKSMAN, A. S. Laboratory manual of general microbiology, with special reference to the microorganism of the soil. New York: Mc-Graw-Hill, 1928. 145p.
- FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; ROCHA, M. de M.; SILVA, K.J.D.; NOGUEIRA, M. do S. da R.; RODRIGUES, E.V. Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil. In: REUNIÃO DE BIOFORTIFICAÇÃO NO BRASIL, 4., 2011. Teresina. Palestras e resumos. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 21 p. 1 CD-ROM.
- FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SILVA, A. F. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. *Biomass and Bioenergy*, v. 45, p. 109-114, 2012.

FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 2, p. 470-476, 2008.

GIRAUD, E.; MOULIN L.; VALLENET, D.; BARBE, V.; CYTRYN, E.; AVARRE, J. C.; JAUBERT, M.; SIMON, D.; CARTIEAUX, F.; PRIN, Y.; BENA, G.; HANNIBAL, L.; FARDOUX, J.; KOJADINOVIC, M.; VUILLET, L.; LAJUS, A.; CRUVEILLER, S.; ROUY, Z.; MANGENOT, S.; SEGURENS, B.; DOSSAT, C.; FRANCK, W. L.; CHANG, W. S.; SAUNDERS, E.; BRUCE, D.; RICHARDSON, P.; NORMAND, P.; DREYFUS, B.; PIGNOL, D.; STACEY, G.; EMERICH, D.; VERMÉGLIO, A.; MÉDIGUE, C.; SADOWSKY, M. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, v. 316, n. 5829, p.1307-1312, 2007.

GOGLEVA, A. A.; KAPARULLINA, E. N.; DORONINA, N. V.; TROTSSENKO, Y. A. *Methylophilus flavus* sp. nov., and *Methylophilus luteus* sp. nov., aerobic, methylotrophic bacteria associated with plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, p. 2623-2628, 2010.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5488–5491, 2000.

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.

GRÖNEMEYER, J. L.; KULKARNI, A.; BERKELMANN, D.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Identification and characterization of rhizobia indigenous to the Okavango region in Sub-Saharan Africa. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014. doi:10.1128/AEM.02417-14.

GUIMARÃES, A. A. Genotypic, phenotypic and symbiotic characterization of *Bradryhizobium* strains isolated from Amazonia and Minas Gerais soils. 2013. 88f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, 2012.

GUEFRACHI, I.; REJILI, M.; MAHDHI, M.; MARS, M. Assessing genotypic diversity and symbiotic efficiency of five rhizobial legume interactions under cadmium stress for soil phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, v. 15, n. 10, p. 938-951, 2013.

HOLMES, B.; STEIGERWALT, A. G.; NICHOLSON, A. C. DNA-DNA hybridization study of strains of *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* and *Empedobacter* and of other usually indole-producing non-fermenters of CDC groups IIc, IIe, IIh and Ili, mostly from human clinical sources, and proposals of *Chryseobacterium bernardetii* sp. nov., *Chryseobacterium carnis* sp. nov., *Chryseobacterium lactis* sp. nov., *Chryseobacterium nakagawai* sp. nov. and *Chryseobacterium taklimakanense* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 4639-4662, 2013.

HOQUE, M. S.; BROADHURST, L. M.; THRALL, P. H. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, p. 299–309, 2011.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils*, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013.

JARAMILLO, P. M. D.; GUIMARÃES, A. A.; FLORENTINO, L. A.; SILVA, K. B.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. *Scientia Agricola*, v. 70, n. 6, p. 397-404, 2013.

JENKINS, O.; BYROM, D.; JONES, D. *Methylophilus*: a new genus of methanol-utilizing bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 37, n. 4, p. 446-448, 1987.

JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BE NA, G.; SY, A.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; DE 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.

KÄMPFER, P.; MCINROY, J. A.; GLAESER, S. P. *Chryseobacterium zae* sp. nov., *Chryseobacterium arachidis* sp. nov., and *Chryseobacterium geocarposphaerae* sp. nov. isolated from the rhizosphere environment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 3, p. 491-500, 2014.

KÄMPFER, P.; LODDERS, N.; VANEECHOUTTE, M.; WAUTERS, G. Transfer of *Sejongia antarctica*, *Sejongia jeonii* and *Sejongia marina* to the genus *Chryseobacterium* as *Chryseobacterium antarcticum* comb. nov., *Chryseobacterium jeonii* comb. nov. and *Chryseobacterium marinum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 2238-2240, 2009.

KAMST, E.; PILLING, J.; RAAMSDONK, L. M.; LUGTENBERG, B. E. N. J. J.; SPAINK, H. P. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *Journal of bacteriology*, v. 179, n. 7, p.2103–2108, 1997.

KANSO, S.; PATEL, B. K. *Microvirga subterranea* gen. nov., sp. nov., a moderate thermophile from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 401–406, 2003.

KAVAMURA, VANESSA, N.; TAKETANI, R. G.; LANÇONI, M. D.; ANDREOTE, F. D.; MENDES, R.; DE MELO, ITAMAR, S. Water Regime Influences Bulk Soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* Bacterial Communities in the Brazilian Caatinga Biome. *PLoS One*, v. 8, n. 9, e73606-xx, 2013.

KRASOVA-WADE, T. K.; QUÉRÉ, A. L.; LAGUERREC, G.; N'ZOUÉ, A.; NDIONE, J. A.; DOREGO, F.; SADIO, O.; NDOYE, I.; NEYRA, M. Eco-geographical diversity of cowpea bradyrhizobia in Senegal is marked by dominance of two genetic types. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 37, n. 2, p. 129-139, 2014.

KRISHNAN, H. B.; KUO, C. I.; PUEPPKE, S. G. Elaboration of flavonoid-induced proteins by the nitrogenfixing soybean *Rhizobium fredii* is regulated by both *nodD1* and *nodD2*, and is

dependent on the cultivar-specificity locus, *nodXTWBTUV*. *Microbiology*, v. 141, p. 2245-2251, 1995.

KUNIN, V.; ENGELBREKTSON, A.; OCHMAN, H.; HUGENHOLTZ, P. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 118-123, 2010.

KUMAR, P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, v. 167, n. 8, p. 493–499, 2012.

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; MAGALHÃES, F. M. M.; ANDRADE, M. J. B. de; SOARES, A. L. de. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. *Revista Ceres*, v. 51, p. 67-82, 2004.

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.

LEE, J. C.; WHANG, K. S. *Chitinophaga ginsengihumi* sp. nov., isolated from soil of ginseng rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 2599-2604, 2014

LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco River Valley. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 33, n. 5, p. 1215-1226, 2009.

LI, L.; SUN, L.; SHI, N.; LIU, L.; GUO, H.; XU, A.; ZHANG, X.; YAO, N. *Chitinophaga cymbidii* sp. nov., isolated from *Cymbidium goeringii* roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 1800-1804, 2013.

LI, M.; LI, Y.; CHEN, W. F.; SUI, X. H.; LI, Y. JR.; LI, Y.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Genetic diversity, community structure and distribution of rhizobia in the root nodules of *Caragana* spp. from arid and semi-arid alkaline deserts, in the north of China. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 35, N. 4, p. 239-245, 2012.

LI, J. H., WANG, E. T., CHEN, W. F., CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 40, n. 1, p. 238–246, 2008.

LIMA, J. V. L.; WEBER, O. B.; CORREIA, D.; SOARES, M. A.; SENABIO, J. A. Endophytic bacteria in cacti native to a Brazilian semi-arid region. *Plant and Soil*, v. 389, n. 1-2, p. 25-33, 2015.

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

LUCAS-GARCÍA, J. A.; PROBANZA, A.; RAMOS, B.; BARRIUSO, J.; GUTIÉRREZ-MAÑERO, F. J. Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs)

and *Sinorhizobium fredii* on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Glycine max* cv. Osumi. *Plant and Soil*, v. 267, n. 1-2, p. 143–153, 2004.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR, BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JOBB, G.; FÖRSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A. W.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KÖNIG, A.; LISS, T.; LÜSSMANN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE, A.; SCHLEIFER, K. H. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. 4, p. 1363–1371, 2004.

MADHAIYANA, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SUNDARAM, S. P.; SAA, T. Nodulation and plant-growth promotion by methylotrophic bacteria isolated from tropical legumes. *Microbiological Research*, v. 164, n. 1, p. 114–120, 2009.

MAIDEN, M. C.; VAN RENSBURG, M. J.; BRAY, J. E.; EARLE, S. G.; FORD, S. A.; JOLLEY, K. A.; MCCARTHY, N. D. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 10, p. 728–736, 2013.

MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; SANTOS, C. A. F.; AIDAR, S. T.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JÚNIOR, P. I. Field performance of new cowpea cultivars inoculated with efficient nitrogen-fixing rhizobial strains in the Brazilian Semiarid. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 49, n. 5, p. 395-402, 2014.

MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; GALINDO-VILLARDÓN, P.; IGUAL, J. M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. *Micromonospora* from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising Plant Probiotic Bacteria. *Scientific Reports*, v. 17, n. 4, Artigo id. 6389, 2014.

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B.; RUMAJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving yield in the Semi-Arid region of Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, v. 38, n. 6, p. 333-339, 2003.

MARTINS, L. M. V.; RUMAJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. Diversity of Cowpea Nodulating Rhizobia Isolated from the Semi-Arid Northeastern Region of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 67, supl. 3, p. 467-471, 1995.

MAYNAUD, G.; WILLEMS, A.; SOUSSOU, S.; VIDAL, C.; MAURE, L.; MOULIN, L.; CLEYET-MAREL, J. C. BRUNEL, B. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 35, n. 2, p. 65-72, 2012.

MEHTA, P.; WALIA, A.; KULSHRESTHA, S.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Efficiency of plant growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for enhancement of tomato growth under net house conditions. *Journal of Basic Microbiology*, v. 55, n. 1, p. 33-44, 2015.

MELO, S. R.; ZILLI, J. E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 9, p. 1177-1183, 2009.

MENNA, P.; HUNGRIA, M. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and

maintenance by both horizontal and vertical transfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, p. 3052-3067, 2011.

MENNA, P., BARCELLOS, F.G. & HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 2934-2950, 2009.

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

MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E.; VAN-SLUYS, M. A.; KITAJIMA, J. P.; TRUFFI, D.; DO AMARAL, A. M.; HARAKAVA, R.; DE OLIVEIRA, J. C.; WOOD, D.; DE OLIVEIRA, M. C.; MIYAKI, C.; TAKITA, M. A.; DA SILVA, A. C.; FURLAN, L. R.; CARRARO, D. M.; CAMAROTTE, G.; ALMEIDA, N. F. JR.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; EL-DORRY, H. A.; FERRO, M. I.; GAGLIARDI, P. R.; GIGLIOTI, E.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G. H.; KIMURA, E. T.; FERRO, E. S.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; MAURO, S. M.; MACHADO, M. A.; MARINO, C. L.; MENCK, C. F.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; SIQUEIRA, W.; DE SOUZA, A. A.; TSAI, S. M.; ZANCA, A. S.; SIMPSON, A. J.; BRUMBLEY, S. M.; SETÚBAL, J. C. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 17, n. 8, p. 827-836, 2004.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; PITAR, R. M.; YOUNG, J. P. W. *Azorhizobium doebereinae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 29, n. 3, p. 197-206, 2006.

MOREIRA, P. X.; BARBOSA, M. M.; GALLÃO, M. I.; LIMA, A. C.; AZEREDO, H. M. C.; BRITO, E. S. Estrutura e composição química do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). In: BRITO, E. S. Feijão-caupi. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 97 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

MORTIMORE, M. J.; SINGH, B. B.; HARRIS, F.; BLADE, S. F. Cowpea in traditional cropping systems. In: SINGH, B. B.; MOHAN-RAJ, D. R.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. *Advances in Cowpea Research*. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agriculture Sciences (JIRCAS). IITA, Ibadan, Nigéria, 1997. 375p.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*, v. 411, n. 6840, p. 948-950, 2001.

MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F. D.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 63, n. 3, p. 383-400, 2008.

- NAVEED, M.; MITTER, B.; YOUSAF, S.; PASTAR, M.; AFZAL, M.; SESSITSCH, A. The endophyte *Enterobacter* sp. FD₁₇: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biology and Fertility of Soils*, v. 50, n. 2, p. 249-262, 2014.
- NUNES, G. F. O. Caracterização fenotípica e filogenética de bactérias isoladas de nódulos de cunha (*Clitoria ternatea*) e estilosantes (*Stylosanthes capitata*) cultivadas em solos do Vale do São Francisco. 2013. 98f. Dissertação (Mestrado em Horticultura Irrigada). Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro - BA.
- OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M.; L SOARES, L. B.; BOMFETI, C. A.; SILVA, K.; AVELAR FERREIRA, P. A. A.; MOREIRA, F. M. S. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 4, p. 1239-1250, 2014.
- PANDYA, M.; NARESH KUMAR, G.; RAJKUMAR, S. Invasion of rhizobial infection thread by non rhizobia for colonization of *Vigna radiata* root nodules. *FEMS Microbiology Letters*, v. 348, n. 1, p. 58-65, 2013.
- PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. Bacterial Associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 34, n. 1-3, p. 17-42, 2015.
- PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPOLITO, G. S.; SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. *Revista Ciência Agronômica*, v. 44, n. 2, p. 363-370, 2013.
- POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, v. 152, n. 1, p. 95-103, 2001.
- PRAKAMHANG, J.; TITTABUTR, P.; BOONKERD, N.; TEAMTISONG, K.; UCHIUMI, K.; ABE, M.; TEAUMROONG, N. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. *Applied Soil Ecology*, v. 85, p. 38-49, 2015.
- PULE-MEULENBERG, F.; BELANE, A. K.; KRASOVA-WADE, T.; DAKORA, F. D. Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. *BMC Microbiology*, v. 10, v. 89, p. 1-12, 2010.
- QUECINE, M. C.; ARAÚJO, W. L.; ROSSETTO, P. B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVA, P. T.; MONDIN M.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 21, p. 7511-7518, 2012.
- QUINCE, C.; LANZÉN, A.; CURTIS T. P.; DAVENPORT, R. J.; HALL, N.; HEAD, I. M.; READ, L. F.; SLOAN, W. T. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods*, v. 6, n. 9, p. 639-641, 2009.
- RADL, V.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; LEITE, J.; PASSOS, S. R.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; BALDAN, J. I.; ZILLI, J. E. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 725-730, 2014.

- RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; TEJEDOR, C.; MARTÍN, I.; VELÁZQUEZ, E.; PEIX, A. *Endobacter medicaginis* gen. nov., sp. nov., isolated from alfalfa nodules in an acidic soil. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 1760-1765, 2013.
- RASHID, M. H.; SCHÄFER, H.; GONZALEZ, J.; WINK, M. Genetic diversity of rhizobia nodulating lentil (*Lens culinaris*) in Bangladesh. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 35, n. 2, p. 98-109, 2012.
- 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. M.; NORÉN, A.; RUBIO, 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, n. 4, p. 934-946, 2010.
- RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DALL'AGNOLA, R. F.; GRAHAM, P. H.; MARTINEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Research in Microbiology*, v. 164, n.7, p. 740-748, 2013.
- RIVAS, R.; MARTENS, M.; DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*. v. 32, n. 2, p. 101-110, 2009.
- RIVAS, R.; WILLEMS, A.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; KROPPESTEDT, R. M.; MARTINEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELAZQUEZ, E. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 26, n. 1, p. 47-53, 2003.
- RODRIGUES, A. C.; BONIFACIO, A.; ANTUNES, J. E. L.; SILVEIRA, J. A. G.; FIGUEIREDO, M. V. B. Minimization of oxidative stress in cowpea nodules by the interrelationship between *Bradyrhizobium* sp. and plant growth-promoting bacteria. *Applied Soil Ecology*, v. 64, p.2 45-251, 2013a.
- RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, J. A. G.; BONIFACIO, A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Metabolism of nitrogen and carbon: Optimization of biological nitrogen fixation and cowpea development. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 67, p. 226-234, 2013b.
- ROGEL, M. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTINEZ ROMERO, E. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 96-104, 2011.
- ROKHBAKHSH-ZAMIN, F.; SACHDEV, D.; KAZEMI-POUR, N.; ENGINEER, A.; PARDESI, K. R.; ZINJARDE, S.; DHAKEPHALKAR, P. K.; CHOPADE, B. A. Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, n. 6, p. 556-566, 2011.
- ROUWS, L. F. M.; LEITE, J.; DE MATOS, G. F.; ZILLI, J. E.; COELHO, M. R. R.; XAVIER, G. R.; FISCHER, D.; HARTMANN, A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Endophytic *Bradyrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. *Environmental Microbiology Reports*, v. 6, n. 4, p. 354-363, 2013.

- RUNJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; MORGADO, L. B.; NEVES, M. C. P. Feijão-caupi tem uma nova estirpe de rizóbio, BR 3267, recomendada como inoculante. Embrapa Agrobiologia, 2006. 16 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15)
- SÁNCHEZ, A. C.; GUTIÉRREZ, R. T.; SANTANA, R. C.; URRUTIA, A. R.; FAUVART, M.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal of Soil Biology*, v. 62, p. 105-112, 2014.
- SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, v. 111, p. 743-767, 2013.
- SANTOS, A. F. J.; MARTINS, C. Y. S.; SANTOS, P. O.; CORRÊA, E. B.; BARBOSA, H. R.; SANDOVAL, A. P. S.; OLIVEIRA, L. M.; SOUZA, J. T.; SOARES, A. C. F. Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm): potential for plant growth promotion. *Plant and Soil*, v. 385, n. 1-2, p. 37-48, 2014.
- SARR, P. S.; YAMAKAWA, T.; ASATSUMA, S.; FUJIMOTO, S.; SAKAI, M. Investigation of endophytic and symbiotic features of *Ralstonia* sp. TSC1 isolated from cowpea nodules. *African Journal of Microbiology*, v. 4, n. 19, p. 1959-1963, 2010.
- SARR, P. S.; YAMAKAWA, T.; FUJIMOTO, S.; SAEKI, Y.; THAO, H. T. B.; MYINT, A. K. Phylogenetic diversity and symbiotic effectiveness of root-nodulating bacteria associated with cowpea in the South-West area of Japan. *Microbes and Environments*, v. 24, n. 2, p. 105-112, 2009.
- SAWADA, H.; KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 49, n. 3, p. 155-179, 2003.
- SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.
- SCHMID, M.; IVERSEN, C.; GONTIA, I.; STEPHAN, R.; HOFMANN, A.; HARTMANN, A.; JHA, B.; EBERL, L.; RIEDEL, K.; LEHNER, A. Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp. *Research in Microbiology*, v. 160, n. 8, p. 608-614, 2009.
- SCHUTZ, N.; SILVA, J. A.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; REIS, V. M. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 38, n. 2, p. 407-414, 2014.
- SHI, Y.; LOU, K.; LI, C. Growth promotion effects of the endophyte *Acinetobacter johnsonii* strain 3-1 on sugar beet. *Symbiosis*, v. 54, n. 3, p. 159-166, 2011.
- SHOEBITZ, M.; RIBAUDO, C. M.; PARDO, M. A.; CANTORE, M. L.; CIAMPI, L.; CURÁ, J. A. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 41, n. 9, p. 1768-1774, 2009.

- SILVA, S. M. S.; MAIA, J. M.; ARAÚJO, Z. B.; FREIRE FILHO, F. R. Composição química de 45 genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 2p. (Embrapa Meio-Norte. Comunicado Técnico, 149).
- SILVA, A. T. Diversidade de bactérias simbióticas e não simbióticas isoladas de nódulos de siratro. 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.
- SILVA, C.; VINUESA, P.; EGUIARTE, L. E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SOUZA, V. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 2, p. 884-893, 2003.
- SILVA, F. V.; MEYER, S. E.; SIMOES-ARAÚJO, J. L.; BARBÉ, T. C.; XAVIER, G. R.; O'HARA, G.; ARDLEY, J.; RUMJANEK, N. G.; WILLEMS, A.; ZILLI, J. E. *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vigna unguiculata* grown in Brazilian Amazon rainforest soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 2358-2363, 2014.
- SILVA, F. V.; SIMOES-ARAÚJO, J.L.; SILVA JÚNIOR, J. P.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Genetic diversity of rhizobia isolates from amazon soils using cowpea (*Vigna unguiculata*) as trap plant. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 682-691, 2012.
- SILVA JUNIOR, E. B.; SILVA, K.; OLIVEIRA, S. S.; OLIVEIRA, P. J.; BODDEY, R. M.; ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R. Nodulação e produção de feijão-caupi em resposta à inoculação com diferentes densidades rizobianas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 49, n. 10, p. 804-812, 2014.
- SILVA JUNIOR, E. B.; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; OLIVEIRA, P.J.; RUMJANEK, N. G.; BODDEY, R. M.; XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de nova formulação de inoculante rizobiano para feijão-caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n. 1, p. 138-141, 2012.
- SILVA, K.; FLORENTINO, L. A.; DA SILVA, K. B.; DE BRANDT, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F. M. S. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 35, n. 2, p. 175-182, 2012.
- SINGH, B. B.; AJEIGBE; H. A.; TARAWALI, S. A.; FERNANDEZ-RIVERA, S.; ABUBAKAR, M. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. *Field Crops Research*, v. 84, n. 1-2, p. 169-177, 2003.
- SINIMBU, F. Safra recorde de feijão caupi no Mato Grosso. 2009. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2009>>. Acesso em: 15 set. 2011.
- SOARES, B. L.; FERREIRA, P. A. A.; OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M.; RUFINI, M.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Cowpea symbiotic efficiency, pH and aluminum tolerance in nitrogen-fixing bacteria. *Scientia Agricola*, v. 71, n. 3, p. 171-180, 2014.
- SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG): I - caupi. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, n. 5, p. 765-802, 2006.

- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal Systematic Bacteriology*, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.
- STEPHAN, R.; GRIM, C. J.; GOPINATH, G. R.; MAMMEL, M. K.; SATHYAMOORTHY, V.; TRACH, L. H.; CHASE, H. R.; FANNING, S.; D. TALL, B. Re-examination of the taxonomic status of *Enterobacter helveticus*, *Enterobacter pulveris* and *Enterobacter turicensis* as members of the genus *Cronobacter* and their reclassification in the genera *Franconibacter* gen. nov. and *Siccibacter* gen. nov. as *Franconibacter helveticus* comb. nov., *Franconibacter pulveris* comb. nov. and *Siccibacter turicensis* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 3402-3410, 2014.
- SU, C.; LEI, L.; DUAN, Y.; ZHANG, K.; YANG, J. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 3, p. 993-1003, 2012
- SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 1, p. 214-220, 2001.
- TALBI, C.; DELGADO, M. J.; GIRARD, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; BEDMAR, E. J. Burkholderia phymatum Strains Capable of Nodulating *Phaseolus vulgaris* Are Present in Moroccan Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 3, p. 4587-4591, 2010.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
- TARIQ, M.; HAMEED, S.; YASMEEN T.; ALI, A. Non-rhizobial bacteria for improved nodulation and grain yield of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 84, p. 15012-15019, 2012.
- TORRES-CORTÉZ, G.; MILLÁN, V.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A. J.; AGUIRRE-GARRIDO, J. F.; RAMÍREZ-SAAD, H. C.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; TORO, N.; MARTÍNEZ-ABARCA, F. Bacterial community in the rhizosphere of the cactus species *Mammillaria carnea* during dry and rainy seasons assessed by deep sequencing. *Plant and Soil*, v. 357, n. 1-2, p. 275-288, 2012.
- TRUJILLO, M. E.; ALONSO-VEJA, P.; RODRÍGUEZ, R.; CARRO, L.; CERDA, E.; ALONSO, P.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *The ISME Journal*, v. 4, n. 10, p. 1265-1281, 2010.
- 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, n. 3, p. 1318-1327, 2005.
- UDVARDI, M.; POOLE, P. S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review Plant Biology*, v. 64, p. 781-805, 2013.

- UROZ, S.; BUÉE, M.; MURAT, C.; FREY-KLETT, P.; MARTIN, F. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environmental Microbiology Reports*, v. 2, n. 2, p. 281-288, 2010.
- VAILLANCOURT, R. E.; WEEDEN, N. F. Chloroplast DNA Polymorphism Suggests Nigerian Center of Domestication for the Cowpea, *Vigna unguiculata* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, v. 79, n. 10, p. 1194-1199, 1992.
- VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; FERNANDEZ-SANTOS, F.; VIZCAINO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-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-CAUWENBERGHE, J.; VERSTRAETE, B.; LEMAIRE, B.; LIEVENS, B.; MICHIELS, J.; HONNAY, O. Population structure of root nodulating *Rhizobium leguminosarum* in *Vicia cracca* populations at local to regional geographic scales. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 37, n. 8, p. 613-621, 2014.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.
- VIDEIRA, S. S.; SILVA, M. C. P.; SOUZA, P. G.; DIAS, A. C. F.; NISSINEN, R.; DIVAN, V. L. B. ; ELSAS, J. D.; BALDANI, J. I.; SALLES, J. F. Culture-independent molecular approaches reveal a mostly unknown high diversity of active nitrogen-fixing bacteria associated with *Pennisetum purpureum* – a bioenergy crop. *Plant and Soil*, v. 373, n. 1-2, p. 737-754, 2013.
- VIEIRA, C. L.; FREITAS, A. D.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V.; ARAÚJO, M. S. Inoculação de variedades locais de feijão macassar com estirpes selecionadas de rizóbio. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola*, v. 14, n. 11, p. 1170-1175, 2010.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of rootnodule bacteria. London, International Biological Programme, 1970. 164p.
- VITOUSEK, P. M.; MENGE, D. N. L.; REED, S. C.; CLEVELAND, C. C. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 368, n. 1621, 2013. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/368/1621/20130119>>. Acesso em: 02 jan. 2014.
- WANG, K.; YAN, P. S.; DING, Q. L.; WU, Q. X.; WANG, Z. B.; PENG, J. Diversity of culturable root-associated/endophytic bacteria and their chitinolytic and aflatoxin inhibition activity of peanut plant in China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2013.
- WANG, Q.; CHENG, C.; HE, L. Y.; HUANG, Z.; SHENG, X. F. *Chitinophaga jiangningensis* sp. nov., a mineral-weathering bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 260-265, 2014.
- WANG, R.; CHANG, Y.L.; ZHENG, W.T.; ZHANG, D.; ZHANG, X.X.; SUI, X.H.; WANG E. T.; HU, J. Q.; ZHANG, L. Y.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 36, n. 2, p. 101-105, 2013.

- WEON, H. Y.; KIM, B. Y.; YOO, S. H.; KWON, S. W.; STACKEBRANDT, E.; GO, S. J. *Chryseobacterium soli* sp. nov. and *Chryseobacterium jejuense* sp. nov., isolated from soil samples from Jeju, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 58, p. 470-473, 2008.
- WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. 2001. Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 111-117, 2001.
- XU, L.; ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEN, W.; WEI, G. Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 37, n. 6, p. 457-465, 2014.
- YAO Z. Y.; KAN, F. L.; WANG, E. T.; WEI, G. H.; CHEN, W. X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.52, p.2219-30, 2002.
- YARZA, P., RICHTER, M.; PEPLIES, J.; EUZEBY, J.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W.; GLÖCKNER, F. O.; ROSSELLO-MORA, R. The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 31, n. 4, p. 241-250, 2008.
- YOUNG, J. M. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems 2003 legitimate? Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 2107-2110, 2003.
- ZHANG, Y. M.; TIAN, C. F.; SUI, X. H.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Robust Markers Reflecting Phylogeny and Taxonomy of Rhizobia. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, e44936, 2012.
- ZHANG, T.; SHAO, M.; YE, L. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The ISME Journal*, v. 6, n. 6, p. 1137-1147, 2012.
- ZHANG, S.; XIE, F.; YANG, J.; LI, Y. Phylogeny of bradyrhizobia from Chinese cowpea miscellany inferred from 16S rRNA, *atpD*, *glnII*, and 16S-23S intergenic spacer sequences. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 57, n. 4, p. 316-327, 2011.
- ZHANG, Y. F.; WANG, E. T.; TIAN, C. F.; WANG, F. Q.; HAN, L. L.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *FEMS Microbiology Letters*, v. 285, n. 2, p. 146-154, 2008.
- ZILLI, J. É.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. *Acta Amazonica*, v. 39, n. 4, p. 749-757, 2009.
- ZILLI, J.E.; XAVIER, G.R. & RUMJANEK, N.G. BR 3262: Nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a Inoculação de feijão-caupi em Roraima. Boa Vista, Embrapa Roraima, 2008. 07p. (Comunicado Técnico, 10)
- ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.

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

ZILLI, J. F. Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para inoculação de caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) em área do Cerrado. 2001. 112p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ.

8. ANEXO

Anexo 1. *Taxon* identificados em nódulos de duas cultivares (BRS Acauã e BRS Pujante) de feijão-caupi por pirosequenciamento do 16S rRNA.

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Acauã				Pujante				Total				
					R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4					
Acidobacteria	Gp1	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	1				
	Gp3	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	1				
	Gp4	-	-	-	0	0	3	0	0	0	0	4	7				
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Iamiaceae	<i>Iamia</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1			
			NI Acidimicrobiales	<i>unclassified</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	4	5			
		Actinomycetales	Actinomycetales	Cellulomonadaceae	NI Cellulomonadaceae	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2		
					Geodermatophilaceae	NI Geodermatophilaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	
				Intrasporangiaceae	NI Intrasporangiaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
					Microbacteriaceae	<i>Agromyces</i>	2	8	2	14	16	2	2	36	82		
				<i>Leifsonia</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	6			
				<i>Microbacterium</i>		20	11	26	65	78	14	2	540	756			
				Micrococcaceae	NI Microbacteriaceae	0	0	0	0	0	2	0	4	6			
					<i>Arthrobacter</i>	8	18	22	288	106	46	97	24	609			
				Micromonosporaceae	NI Micromonosporaceae	0	0	0	1	0	0	0	1	2			
					NI Micromonosporaceae	0	0	0	0	0	0	0	5	5			
				Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	11	9	12	11	15	17	14	42	131			
				Nocardiaceae	NI Nocardiaceae	0	0	0	0	0	0	0	37	37			
				Nocardioideales	Nocardioideales	Nocardioideales	<i>Aeromicrobium</i>	0	0	1	1	0	0	0	1	3	
							<i>Flindersiella</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
							<i>Kribbella</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	2	
							<i>Marmoricola</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
							<i>Nocardioides</i>	1	0	1	0	1	0	0	4	7	
							NI Nocardioideales	0	0	0	0	1	0	0	1	2	
							Promicromonosporaceae	<i>Cellulosimicrobium</i>	13	13	9	5	2	0	0	65	107
							Propionibacteriaceae	<i>Microlunatus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1
								<i>Propionibacterium</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1
							Pseudonocardiales	Pseudonocardiales	Pseudonocardiales	<i>Actinomycetospora</i>	0	0	0	0	0	0	0
				<i>Actinophytocola</i>	0	0				0	0	0	0	0	1	1	
				<i>Pseudonocardia</i>	0	0				0	0	0	0	0	3	3	
				NI Pseudonocardiales	0	0				0	0	0	0	0	1	1	
				Streptomycetales	<i>Streptomyces</i>	1	13	3	2	19	3	0	4	45			
				NI Actinomycetales	-	0	0	0	1	1	2	0	49	53			

Anexo 1. *Taxon* identificados em nódulos de duas cultivares (BRS Acauã e BRS Pujante) de feijão-caupi por pirosequenciamento do 16S rRNA.

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Acauã				Pujante				Total
					R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	
		Gaiellales	Gaiellaceae	<i>Gaiella</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	NI Actinobacteria	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	5	5
Bacteroidetes	Bacteroidete_ incertae-sedis	Ohtaekwangia	-	NI Ohtaekwangia	10	2	2	1	1	1	0	4	21
	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	<i>Adhaeribacter</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1
				<i>Dyadobacter</i>	255	56	265	196	92	345	49	108	1366
				<i>Pontibacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	2
				<i>Sporocytophaga</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	2
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>	1396	4210	6895	4427	1705	2173	1214	5618	27638
				<i>Flavobacterium</i>	1	74	3	8	609	15	0	0	710
			Cryomorphaceae	<i>Fluviicola</i>	0	0	0	2	2	1	0	21	26
	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	<i>Chitinophaga</i>	4	64	16	131	383	57	28	25	708
				<i>Flavisolibacter</i>	0	0	0	0	0	2	0	7	9
				<i>Niabella</i>	0	10	0	0	0	0	0	0	10
				<i>Niastella</i>	0	1	2	0	0	0	0	0	3
				NI Chitinophagaceae	6	6	5	17	15	4	1	13	67
			Sphingobacteriaceae	<i>Nubsella</i>	0	0	0	0	16	0	0	151	167
				<i>Sphingobacterium</i>	469	2215	0	2	1	3	0	2	2692
				NI Sphingobacteriaceae	0	0	1	0	0	0	0	0	1
			Chitinophagaceae	<i>Terrimonas</i>	0	1	0	8	5	0	0	0	14
	NI Bacteroidetes	-	-	-	0	0	0	0	0	1	0	1	2
Cyanobacteria/ Chloroplast	Chloroplast	Chloroplast	Streptophyta	-	359	41	65	228	948	358	112	98	2209
Deinococcus-Thermus	Deinococci	Deinococcales	Deinococcaceae	<i>Deinococcus</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	6	31	10	67	48	20	28	21	231
				<i>Domibacillus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1
				NI Bacillaceae	0	0	1	0	0	0	0	0	1
			Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	2
				<i>Paenibacillus</i>	3	23	27	171	78	43	12	35	392
				NI Paenibacillaceae	0	1	0	0	1	0	0	5	7
			Planococcaceae	<i>Lysinibacillus</i>	1	0	1	34	17	6	4	22	85
				NI Planococcaceae	0	0	0	0	0	0	1	0	1
			NI Bacillales	-	0	0	0	0	0	0	0	6	6
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	<i>Gemmatimonas</i>	0	1	0	0	0	0	0	2	3
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	<i>Planctomyces</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1
				NI Planctomycetaceae	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>	3814	296	157	1741	2475	658	740	167	10048
			Hyphomicrobiaceae	<i>Hyphomicrobium</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	2
			Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	1	4	1	1	2	1	0	1	11
			NI Rhizobiales	-	1	0	0	4	1	1	0	56	63
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Achromobacter</i>	0	9	1	2	0	0	0	15	27
			Burkholderiaceae	<i>Cupriavidus</i>	0	10	9	32	3	1	2	18	75

Anexo 1. *Taxon* identificados em nódulos de duas cultivares (BRS Acauã e BRS Pujante) de feijão-caupi por pirosequenciamento do 16S rRNA.

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Acauã				Pujante				Total
					R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	
			Comamonadaceae	<i>Variovorax</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	2
				NI Comamonadaceae	0	0	0	0	0	0	0	8	8
			Oxalobacteraceae	<i>Massilia</i>	0	0	0	9	1	0	0	18	28
				<i>Noviherbaspirillum</i>	0	0	0	0	0	0	0	5	5
				NI Oxalobacteraceae	17	7	8	6	7	10	1	8	64
			NI Burkholderiales	-	22	29	4	172	31	9	5	63	335
		Methylophilales	Methylophilaceae	<i>Methylophilus</i>	14	181	8	8	26	38	0	44	319
				NI Methylophilaceae	7	2	1	3	8	2	0	4	27
		NI Betaproteobacteria	-	-	3	0	24	2	18	1	1	1	50
	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	<i>Bdellovibrio</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	2
		NI Deltaproteobacteria	-	-	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	Gammaaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NI Enterobacteriaceae	1225	402	234	280	1094	3847	5795	438	13315
		Legionellales	Legionellaceae	<i>Legionella</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1
		Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	22	0	141	0	0	0	0	0	163
			Pseudomonadaceae	<i>Cellvibrio</i>	6	4	1	0	67	5	0	31	114
				<i>Pseudomonas</i>	200	300	3	182	156	373	4	254	1472
		Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Luteibacter</i>	3	2	1	2	1	1	2	1	13
				<i>Luteimonas</i>	0	0	0	4	0	0	0	0	4
				<i>Lysobacter</i>	12	0	37	1	3	5	1	5	64
				NI Xanthomonadaceae	230	37	150	36	87	123	79	46	788
			Sinobacteraceae	<i>Steroidobacter</i>	0	0	0	0	0	0	3	1	4
		NI Gammaaproteobacteria	-	-	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	NI Proteobacteria	-	-	-	1	69	0	1	17	1	0	0	89
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	<i>Haloferula</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	2
				<i>Roseimicrobium</i>	0	0	0	0	0	0	0	4	4
	Spartobacteria	NI Spartobacteria	-	-	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	Subdivision3	NI Subdivision3	-	-	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	NI Verrucomicrobia	-	-	-	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Não identificado	-	-	-	-	2	3	0	6	3	1	0	11	26
Total					8090	8094	8077	7787	7922	8109	8084	7356	63519