

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE COMUNIDADE BACTERIANA  
SIMBIONTE E ENDOFÍTICA PRESENTES EM NÓDULOS DE FEIJÃO-  
FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)**

**CLAUDIANA SILVA PEREIRA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal do Piauí como  
parte das exigências do Programa  
de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento, área de concentração  
em Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de “Mestre”.

**Teresina**

**2018**

**CLAUDIANA SILVA PEREIRA**  
**Licenciada em Ciências Biológicas**

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE COMUNIDADE BACTERIANA  
SIMBIONTE E ENDOFÍTICA PRESENTES EM NÓDULOS DE FEIJÃO-  
FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)**

Orientador:  
Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal do Piauí como  
parte das exigências do Programa  
de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento, área de concentração  
em Genética e Melhoramento, para  
obtenção do título de “Mestre”.

**Teresina**  
**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí Biblioteca  
Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**P436c** Pereira, Claudiana Silva

Caracterização polifásica de comunidade bacteriana simbiote e endofítica presente em nódulos de feijão-fava ( *Phaseolus lunatus* L. ) / Claudiana Silva Pereira - 2018.  
62f. : il.

Dissertação ( Mestrado ) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Teresina, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

1. Feijão-fava 2. Fixação biológica do nitrogênio 3. Genes *housekeeping* 4. Rizóbios I. Título

**CDD 635.651**

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE COMUNIDADE BACTERIANA SIMBIONTE  
E ENDOFÍTICA PRESENTES EM NÓDULOS DE FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus  
lunatus* L.)**

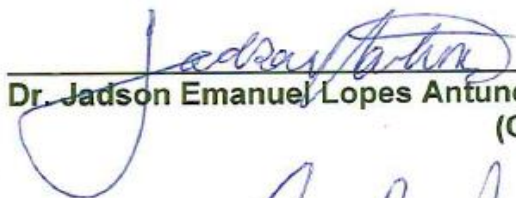
**CLAUDIANA SILVA PEREIRA**

**Aprovada em 24/05/2018**

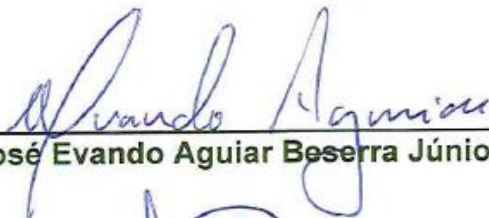
**Comissão Julgadora:**



**Dra. Louise Melo de Souza Oliveira - UFPE**



**Dr. Jadson Emanuel Lopes Antunes - UFRPE  
(Coorientador)**



**Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior - CCA/UFPI**



**Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo - CCA/UFPI  
(Orientador)**

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS .....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	11
2.1. Phaseolus lunatus L. ....	11
2.2. Fixação biológica de nitrogênio .....	12
2.3. Taxonomia, filogenia e evolução dos rizóbios .....	14
2.4. Bactérias endofíticas associadas aos nódulos de plantas leguminosas.....	16
2.5. Técnicas moleculares usadas na identificação de bactérias diazotróficas.....	18
2.6 Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas.....	21
3. REFERÊNCIAS .....	24
4. Capítulo I.....	32
Resumo .....	32
Abstract.....	33
Introdução.....	33
Material e métodos .....	34
Resultados e discussão .....	37
5. Conclusões.....	50
Referências .....	51
APÊNDICE(S) .....	55

## RESUMO

CLAUDIANA SILVA PEREIRA. **Caracterização polifásica de comunidade bacteriana simbiote e endofítica presentes em nódulos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. Total de páginas: 56. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

As bactérias capazes de estabelecer simbiose com leguminosas a partir da formação de nódulos em suas raízes e/ou caules são genericamente chamadas de rizóbios ou simbiontes. Anteriormente, acreditava-se que todas as bactérias que habitavam o interior desses nódulos tinham capacidade de induzir sua formação e de fixar nitrogênio atmosférico. No entanto, estudos mostram que a comunidade bacteriana presente em nódulos de muitas leguminosas é formada não somente por rizóbios, mas também por bactérias endofíticas que não possuam as habilidades citadas a cima. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi descrever a diversidade da comunidade bacteriana associada aos nódulos radiculares de feijão-fava (*P. lunatus* L.) a partir de uma abordagem polifásica, por meio da caracterização morfofisiológica, da análise de fragmentos rep(BOX)-PCR e do sequenciamento parcial dos genes 16S rRNA, *glnII* e *gyrB*. Os 36 isolados foram obtidos em amostras de solos dos distritos de Nova Esperança (07°77'10"S E 93°51'58"W) e Santa Rita (07°71'49"S E 93°60'08"W), pertencentes ao município de Água Branca-PI, classificados como Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico, utilizando feijão-fava como planta isca. A extração do DNA foi realizada utilizando kit comercial, conforme recomendação do fabricante, após cultivo dos isolados em meio YM líquido em agitador orbital. Destes isolados, 34 foram submetidos a uma caracterização bioquímica, 29 a uma análise rep(BOX)-PCR, 32 a uma amplificação do gene 16S rRNA, 14, do gene *glnII* e 15, do gene *gyrB*. Uma matriz binária foi construída a partir das características fenotípicas avaliadas e os isolados foram agrupados baseados no algoritmo UPGMA e coeficiente de Jaccard. As análises dos fragmentos BOX foram realizadas no programa Bionumerics versão 7.5, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard. A análise das sequências dos genes 16S rRNA, *glnII* e *gyrB* foi realizada a partir do programa Phred. O alinhamento foi realizado usando MEGA software versão 6.0 com os parâmetros padrão, o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbour-Joining. Tanto o dendrograma fenotípico quanto a árvore filogenética gerada a partir de perfis rep(BOX)-PCR mostraram grande diversidade entre os isolados, os quais agruparam-se a um baixo nível de similaridade. Foram detectados representantes dos gêneros *Bradyrhizobium*; *Rhizobium* e *Burkholderia*, os quais possuem espécies de rizóbios, assim como representantes de gêneros de bactérias endofíticas tais como *Pseudomas*, *Enterobacter*, *Williamsia*, *Enterobacteriaceae*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Paenobacillus* e *Serratia*, relatados pela primeira vez em *P. lunatus*. A preferência desta leguminosa por associar-se *Bradyrhizobium* foi confirmada. No entanto, uma grande diversidade de bactérias simbiontes e endofíticas também foram contatadas em seus nódulos. Além disso, os isolados UFPI-F16, UFPI-F06, UFPI-F03, UFPI-F15, UFPI-F17 e UFPI-F19 são apontados como prováveis novas espécies.

**Palavras-chave:** Fixação biológica de nitrogênio, Genes *housekeeping*, Rizóbios.

## ABSTRACT

CLAUDIANA SILVA PEREIRA. **Polyphasic characterization of symbiotic and endophytic bacterial communities present in fava bean (*Phaseolus lunatus* L.) nodules.** Total pages: 64. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

Bacteria capable of establishing symbiosis with legumes from the formation of nodules in their roots and / or stems are generically called rhizobia or symbionts. Previously, it was believed that all the bacteria that inhabited the interior of these nodules had the capacity to induce their formation and to fix atmospheric nitrogen. However, studies show that the bacterial community present in nodules of many legumes is formed not only by rhizobia, but also by endophytic bacteria that do not have the above mentioned abilities. The objective of the present work was to describe the diversity of the bacterial community associated with root bean (*P. lunatus* L.) nodules from a polyphasic approach by means of the morphophysiological characterization of rep fragments analysis (BOX) -PCR and the partial sequencing of the 16S rRNA, *glnII* and *gyrB* genes. The 36 isolates were obtained from samples of soils of the Nova Esperança districts (07°77'10 "SE 93°51'58" W) and Santa Rita (07°71'49 "SE 93°60'08" W), belonging to the municipality of Água Branca-PI, classified as Red-Yellow Dystrophic Latosol, using fava beans as bait plants. DNA extraction was performed using commercial kit, as recommended by the manufacturer, after culturing the isolates in liquid YM medium on orbital shaker. From these isolates, 34 were submitted to a biochemical characterization, 29 to a rep (BOX) -PCR analysis, 32 to an amplification of the gene 16S rRNA, 14, of the *glnII* gene and 15, of the *gyrB* gene. A binary matrix was constructed from the phenotypic characteristics evaluated and the isolates were grouped based on the UPGMA algorithm and Jaccard coefficient. The analyzes of the BOX fragments were performed in the Bionumerics program version 7.5, using the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient. Sequence analysis of the 16S rRNA, *glnII* and *gyrB* genes was performed from the Phred program. Alignment was performed using MEGA software version 6.0 with the default parameters, the K2P distance model and the Neighbor-Joining algorithm. Both the phenotypic dendrogram and the phylogenetic tree generated from rep (BOX) -PCR profiles showed great diversity among the isolates, which were grouped at a low level of similarity. Representatives of the genus *Bradyrhizobium* were detected; *Rhizobium* and *Burkholderia*, which have species of rhizobia, as well as representatives of endophytic bacteria genera such as *Pseudomas*, *Enterobacter Williamsia*, *Enterobacteriaceae*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Paenobacillus* and *Serratia*, reported for the first time in *P. lunatus*. The preference of this legume for associating *Bradyrhizobium* was confirmed. However, a great diversity of symbiotic and endophytic bacteria were also contacted in their nodules. In addition, the isolates UFPI-F16, UFPI-F06, UFPI-F03, UFPI-F15, UFPI-F17 and UFPI-F19 are identified as probable new species.

**Key words:** Biological fixation of nitrogen, Genes housekeeping, Rhizobia.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Análise de agrupamentos baseada no método UPGMA e no coeficiente Jaccard dos produtos obtidos por análise rep-PCR (BOX) de 29 isolados bacterianos de feijão-fava de solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI. Os agrupamentos foram obtidos considerando o nível de similaridade de 70%.....39
- Figura 2:** Re-análise de agrupamentos baseada no método UPGMA e no coeficiente Jaccard dos produtos obtidos por análise rep-PCR (BOX) de 29 isolados bacterianos de feijão-fava de solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI, após a amplificação do gene 16S rRNA.....40
- Figura 3:** Árvore filogenética gerada a partir das sequências parciais do gene 16S rRNA de vinte e três isolados bacterianos deste estudo e de sequência de referências. A filogenia foi inferida usando o método neighbour-joining. ....42
- Figura 4:** Árvore filogenética gerada a partir das sequências parciais do gene gln II de 14 isolados bacterianos deste estudo e de sequência de referências. A filogenia foi inferida usando o método neighbour-joining. ....47
- Figura 5:** Árvore filogenética gerada a partir das sequências parciais do gene gyrB treze isolados bacterianos deste estudo e de sequência de referências. A filogenia foi inferida usando o método neighbour-joining. ....48
- Figura 6:** Árvore filogenética gerada a partir da concatenação das sequências parciais dos genes gyrB e gyrB de quinze isolados bacterianos deste estudo e de sequência de referências. A filogenia foi inferida usando o método neighbour-joining. ....49



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Resultados em porcentagem (%) das análises fenotípicas realizados em isolados bacterianos coletados em solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI, usados como fonte de inóculo em feijão-fava. Teresina, PI, 2008. ....	38
<b>Tabela 2:</b> Primers e condições de amplificação usados em nosso estudo .....	55
<b>Tabela 3:</b> Informações sobre as sequências dos genes utilizados neste estudo .....	58

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) pertence a família das leguminosas (Leguminosae ou Fabaceae), sendo a segunda espécie em importância econômica do gênero *Phaseolus*, o qual possui cerca de 76 espécies (SMÝKAL et al., 2015). Seu cultivo estende-se pela América do Sul, América do Norte, Europa, África e Ásia. Sua domesticação ocorreu de forma independente nas regiões Mesoamericanas e nos Andes por sociedades pré-colombianas (GUTIÉRREZ SALGADO; GEPTS; DEBOUCK, 1995). Seus grãos são uma importante fonte alimentar alternativa a utilização de feijão comum (*P. vulgaris*), além de possui uma boa adaptação a regiões de clima quente (FOFANA et al., 1999).

Assim como as demais leguminosas, o feijão-fava possui a habilidade de estabelecer associações mutualísticas com rizóbios, bactérias Gram-negativas presentes no solo, que possuem capacidade de realizar fixação biológica de nitrogênio (FBN). (SHAMSELDIN; ABDELKHALEK; SADOWSKY, 2017). Isso trás vantagens à planta como o aumento do seu crescimento e, conseqüentemente produtividade, uma vez que o nitrogênio é um nutriente vital requerido pelos vegetais (AHEMAD; KIBRET, 2014). Outro aspecto positivo dessa simbiose é a dispensa ou redução na aplicação de fertilizantes nitrogenados, a qual trás vantagens ecológicas e econômicas (AZEVEDO et al., 2015).

Além de realizar FBN, as bactérias podem possuir outras habilidades que estimulem o crescimento vegetal, sendo classificadas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs). Estas podem atuar como fungicidas, bacteridas, rizorremediadoras, solubilizadoras de nutrientes, produtoras de fitohormônios etc. (SHAIENDRA SINGH, 2015).

Os rizóbios, os quais chamaremos de simbiotes, que associam-se às hospedeiras leguminosas, induzem em suas raízes ou em seus caules a formação de nódulos que os abrigam. No entanto, estes também podem abrigar outras bactérias endofíticas, as quais podem, ou não, serem classificadas com RPCP (ZGADZAJ et al., 2015) .

Em feijão-fava há poucos estudos sobre a composição e a descrição da comunidade bacteriana presente em seus nódulos. Até o momento, estes apontam somente para a presença de rizóbios (EILMUS, 2009; SANTOS et al., 2011; DURÁN et al., 2014; ARAUJO et al., 2015; ORMEÑO-ORRILLO. ET AL., 2015). Dessa forma,

o presente trabalho trata-se de uma caracterização genética e bioquímica de isolados bacterianos retirados dos nódulos de feijão-fava obtidos em 2008, armazenados, reativados e analisados em 2017. Assim, objetivou-se identificar estes isolados bacterianos por meio de uma abordagem polifásica e avaliar se possuem características de RPCPs.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Phaseolus lunatus* L.

A família Leguminosae ou Fabaceae possui 770 gêneros e mais de 19.500 espécies, sendo a terceira maior dentre as famílias das angiospermas em número de espécies (BRUNEAU et al., 2013), superada apenas por Asteraceae e Orchidaceae, e a segunda maior em importância econômica, ficando atrás somente de Poaceae. É dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, apesar das recentes críticas a essa classificação. Esta última é a maior das três subfamílias, possuindo 14.000 espécies distribuídas em 503 gêneros (LPWG, 2017), sendo um deles o gênero *Phaseolus*, o qual inclui 76 espécies (SMÝKAL et al., 2015).

Distribuído amplamente no Novo Mundo e tendo o México como centro de diversidade, o gênero *Phaseolus* possui cinco espécies cultiváveis: feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), feijão-da-espanha (*Phaseolus coccineus* L.), feijão tepary (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) e feijão anual (*Phaseolus polyanthus* Greenman) (ORMEÑO-ORRILLO; DÁVILA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2015). Estas espécies possuem genomas pequenos, variando entre 450 a 650 Mb e, apesar de possuírem o mesmo número cromossômico básico ( $x = 11$ ), apresentam dificuldades de cruzamento (SMÝKAL et al., 2015).

Os feijões, em geral, são considerados fontes de proteína importantes há milênios nas Américas, e também na África, por serem de baixo custo e de alta qualidade. O feijão-fava, também conhecido como feijão-lima, é a segunda espécie em importância econômica do gênero, depois do feijão comum (ORMEÑO-ORRILLO; DÁVILA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2015). Seu cultivo se estende por Brasil, Peru, México, Estados Unidos e África tropical (ARAUJO et al., 2016).

No Brasil, foram produzidas 3637 toneladas de grãos secos de feijão-fava numa área plantada de 20209 hectares. O Nordeste se destacou na produção, sendo o responsável por 3609 toneladas dos grãos produzidos. Os principais estados brasileiros produtores são, em ordem decrescente, Paraíba, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Piauí (IBGE, 2016).

Feijão-fava foi domesticado de forma independente a partir de diferentes conjuntos de genes selvagens nas regiões andinas e mesoamericanas por sociedades pré-colombianas (GUTIÉRREZ SALGADO; GEPTS; DEBOUCK, 1995).

Suas variedades dividem-se em dois grandes grupos, de acordo com sua origem geográfica e com as características das sementes. As variedades mesoamericanas foram domesticadas na região mesoamericana e possuem sementes pequenas, com média de 45g/100 sementes. Já as variedades andinas foram domesticadas nos Andes do Equador e norte do Peru e possuem sementes maiores com média de 87g/100 sementes (GUTIÉRREZ SALGADO; GEPTS; DEBOUCK, 1995; MOTTA-ALDANA et al., 2010).

A partir de marcadores moleculares de sequências nucleotídicas de DNA do cloroplasto e de regiões nucleares não-codificantes, SERRANO-SERRANO et al. (2010) apontam que o *pool* gênico do feijão-fava selvagem está estruturado em *pool* gênico Mesoamericano I (MI), localizado no centro-oeste do México, ao norte e ao oeste de Istmo de Tehuantepec; *pool* gênico Mesoamericano II (MII), que se encontra ao sul e a leste de Istmo de Tehuantepec, ao longo das planícies costeiras do Golfo do México, na América central, no norte da América do Sul, sul do Peru, Bolívia e norte da Argentina; e *pool* gênico Andino (AI), localizado no Andes do Equador e no norte do Peru. Recentemente, CHACÓN-SÁNCHEZ; MARTÍNEZ-CASTILLO (2017), além de confirmarem a existência desses três grupos usando marcadores SNPs, sugerem também a existência de outro grupo de genes andinos (AII) no centro da Colômbia, apesar de que ainda mais informações precisam ser levantadas para a confirmação da existência deste grupo.

## 2.2. Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial ao estabelecimento e manutenção da vida, uma vez que é constituinte de biomoléculas importantes. Apesar de estar abundantemente presente na atmosfera como gás dinitrogênio ( $N_2$ ), este encontra-se indisponível para o metabolismo da maioria dos organismos por ser relativamente inerte (BRUIJN, 2015).

O nitrogênio “fixado”, ou seja, que esteja em uma forma bioacessível para estes organismos, pode ser produzido abioticamente por meio de processos geoquímicos como raios, sendo esta sua primeira fonte de origem e que produz cerca de  $10^{12}$  a  $10^{13}$  g/ano de nitrogênio fixo ou de forma industrial, por meio do processo de Haber-Bosch, o qual produz fertilizantes nitrogenados e supre a necessidade de N de cerca de metade da população humana (FALKOWSKI, 1997).

No entanto, é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada por um seletivo grupo de procariontes, os quais produzem cerca de  $2 \times 10^{13}$  g/ano (HOFFMAN et al., 2014) que responde por aproximadamente dois terços do nitrogênio fixo globalmente (RUBIO; LUDDEN, 2008).

A FBN trata-se de um processo realizado por várias espécies de arqueas e bactérias que consiste na conversão do nitrogênio atmosférico em amônia, o que possibilita a absorção e utilização deste elemento por estes organismos e pelos demais seres vivos. Esse processo é realizado a partir da atuação do complexo enzimático nitrogenase, uma metaloenzima elucidada por Dean e Jacobson (1992), formada por duas unidades proteicas: a proteína molibdênio-ferro (também chamada de dinitrogenase ou componente I) e a proteína ferro de transferência de elétrons (dinitrogenase redutase ou componente II). A dinitrogenase redutase é uma proteína de ferro constituída por duas subunidades proteicas, um hemodímero ( $\alpha_2$ ), que doa elétrons com alto poder redutor para a dinitrogenase. Esta possui um metal como cofator e é uma proteína de Fe-Mo constituída por quatro unidades, um tetrâmero ( $\alpha_2\beta_2$ ), que utiliza esses elétrons para reduzir  $N_2$  a  $NH_3$  (HOFFMAN et al., 2014).

Os diazotróficos, como são chamados os procariontes fixadores de nitrogênio, são encontrados em diversas linhagens de arqueas e bactérias. Estas podem estabelecer associações simbióticas com é o caso dos heterocistos das cianobactérias (*Anabaena* e *Nostoc*, por exemplo), os quais estão presentes nos tecidos de plantas hepáticas, samambaias, cicadáceas e dicotiledôneas; os actinomicetos (representados por *Frankia*), bactérias filamentosas que formam nódulos em muitas plantas não leguminosas; e os rizóbios, bactérias que formam nódulos em plantas leguminosas. Além disso, há também os grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio não simbióticas que podem ser de vida livre, associativos ou endófitos (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Azocarus* etc.), apesar de que os mesmos disponibilizam uma quantidade inferior de nitrogênio fixo quando comparados com os simbióticos (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005; BHATTACHARYYA; JHA, 2012; GLICK, 2012)

Especula-se que os procariontes diazotróficos surgiram no Eon arqueano, próximo ao momento do surgimento dos primeiros seres vivos. Devido à intolerância da nitrogenase à presença de oxigênio, acredita-se que ela surgiu na história evolutiva em algum momento anterior ao período em que as cianobactérias fotossintetizantes passaram a liberar  $O_2$  e a alterar a composição da atmosfera

terrestre. A descoberta de estromatólitos com microcrofósseis de cianobactérias associadas a óxidos de ferro, que datam aproximadamente 2 bilhões de anos, aponta que nesta época já havia abundância de oxigênio atmosférico (BERGE, 1967). Isso sugere, portanto, que a nitrogenase surgiu a mais de dois bilhões de anos atrás.

A atmosfera primitiva possuía uma quantidade ínfima de nitrogênio atmosférico, no entanto, o fato de a nitrogenase ter a capacidade de reduzir não só nitrogênio molecular, mas também acetileno, azida e cianeto, os quais estavam presentes nessa atmosfera, nos leva a crer que ela tinha a função de dissipar o poder redutor atmosférico e atuava na desintoxicação de derivados de HCN (RAYMOND et al., 2004).

O surgimento da simbiose entre diazotróficos e plantas seria bem mais recente na história evolutiva, uma vez que as plantas terrestres surgiram há cerca de 400 milhões de anos. Provavelmente, os antigos diazotróficos conviviam na rizosfera como epífitos ou endófitos. Os genes que são envolvidos com a FBN são mais antigos que os responsáveis pela nodulação de plantas, portanto, essa característica é bem mais recente (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005).

A grande biodiversidade dos diazotróficos, os quais estão distribuídos em grupos parafiléticos, é evidenciada pelos seus diferentes estilos de vida e metabolismos, uma vez que são anaeróbicos, aeróbicos, autotróficos, heterotróficos, metanotróficos, de vida livre, simbiontes etc. (RAYMOND et al., 2004). Eles possuem uma ampla distribuição, que pode ser interpretada pelo enfoque clonal, onde a capacidade de fixar nitrogênio é um caráter ancestral que foi perdido em alguns organismos, especialmente pela mudança da atmosfera de anaeróbica para aeróbica, ou pode ser explicada em decorrência da transferência horizontal dos genes relacionados a FBN de algumas linhagens a outra próximas ou distantes, as quais os mantiveram como uma vantagem adaptativa (LLORET; MARTÍNEZ-ROMERO, 2005).

### **2.3. Taxonomia, filogenia e evolução dos rizóbios**

Os rizóbios referem-se a um grupo genérico de bactérias Gram-negativas presentes no solo que possuem a capacidade de realizar FBN e de estabelecer uma relação simbiótica com plantas leguminosas, desencadeando nestas a formação de

nódulos nas raízes e/ou caules. Esse processo de FBN tem grande importância ecológica e econômica, uma vez que permite que o nitrogênio possa estar disponível às plantas e demais organismos, o que pode garantir, por exemplo, a dispensa ou redução de fertilizantes nitrogenados, evitando a poluição gerada por eles e baixando os custos de produção agrônômica (AZEVEDO et al., 2015).

Em vista disso, diversos estudos têm sido feitos no intuito de compreender os mecanismos pelos quais essa relação de simbiose ocorre, assim como identificar as bactérias envolvidas. No início da década de 1980, todos os rizóbios conhecidos eram agrupados em um gênero, *Rhizobium*, com apenas seis espécies descritas (SOMASEGARAN; HOBEN, 1985). O número de gêneros e espécies que incluem rizóbios tem crescido. Em 2001 eram 6 gêneros e 28 espécies; em 2003, 12 gêneros e 44 espécies; em 2006, 7 gêneros e 53 espécies; em 2014, 14 gêneros e 98 espécies (ZAKHIA; DE LAJUDIE, 2001; SAWADA; KUYKENDALL; YOUNG, 2003; WILLEMS, 2006; BERRADA; FIKRI-BENBRAHIM, 2014). Já em 2017, Shamseldin; Abdelkhalek e Sadowsky relataram 238 espécies distribuídas em 18 gêneros, abrangendo as classes alfa, beta e gama-proteobactérias.

A primeira divisão realizada no gênero foi feita por Jordan em 1982, onde, considerando aspectos fisiológicos e bioquímicos, os dividiu em *Rhizobium*, de crescimento rápido e pH ácido, e *Bradyrhizobium*, de crescimento lento e pH básico. Posteriormente, com o surgimento e o aprimoramento das ferramentas genéticas, passou a ser utilizada a chamada taxonomia polifásica, a qual leva em consideração características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares para a classificação das espécies. Esse foi um dos principais motivos para o crescente número de novas espécies de rizóbios descritas (BERRADA; FIKRI-BENBRAHIM, 2014).

Dentre os critérios e ferramentas moleculares, podemos citar a porcentagem do conteúdo G+C no genoma, sequenciamento do gene 16S rRNA, análises RFLP do gene 16S rRNA, perfis de DNA (rep ou RAPD-PCR), porcentagem de hibridização DNA-DNA, *multilocus sequence typing* (MLSL), *multilocus sequence analysis* (MLSA), comparação de genomas (genomotaxia) e identificação média de nucleotídeos (ANI) das comparações do genoma (GRAHAM et al., 1991; BRUIJN, 1992; WILLEMS; COLLINS, 1993; YANAGI; YAMASATO, 1993; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; ISHII; SADOWSKY, 2009; GLAESER; KÄMPFER, 2015; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2015; RASHID et al., 2015).



Dentro da classe alfa-proteobactéria, a mais extensa, os rizóbios se encontram na ordem Rhizobiales, distribuídos em 6 famílias: Rhizobiaceae, a maior delas, englobando os gêneros *Pararhizobium*, 1 espécie, *Rhizobium*, 98, *Ensifer*, 18, *Allorhizobium*, 1, *Shinella*, 1; família Philobacteriaceae com os gêneros *Mesorhizobium*, 40, *Philobacterium*, 8, *Amilobacter*, 1; família Bradyrhizobiaceae gêneros *Bradyrhizobium*, 36, *Blastobacter*, 1, *Photorhizobium*, 1; família Hyphomicrobiaceae, gêneros *Devosia*, 1, e *Azorhizobium*, 3; família Methylobacteriaceae, gêneros *Methylobacterium*, 3, e *Microvirga*, 4; família Brucellaceae, gênero *Ochrobacterium*, 2 (SHAMSELDIN; ABDELKHALEK; SADOWSKY, 2017).

Estudos recentes comprovaram a presença de rizóbios nas classes beta-proteobactéria, na ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae, gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia* (GYANESHWAR et al., 2011); e gama-proteobactérias, ordem Pseudomadales, família Pseudomanaceae, onde *Pseudomonas* sp. foi apontada por Shiraishi; Matsushita; Hougetsu (2010) como nodulante da leguminosa *Robinia pseudoacacia*.

#### **2.4. Bactérias endofíticas associadas aos nódulos de plantas leguminosas**

As bactérias endofíticas, de modo geral, são aquelas capazes de habitar os tecidos internos das plantas sem lhes causar ou provocando o mínimo de danos. Em relação às leguminosas, as bactérias que induzem a formação de nódulos são chamadas bactérias simbióticas denominadas de rizóbios. No entanto, hoje sabe-se que os nódulos também podem abrigar uma alta diversidade de bactérias que, apesar de não induzir sua formação, co-existem dentro deles (MEYER et al., 2015; ZGADZAJ et al., 2015), as quais chamaremos somente de bactérias endofíticas.

Por serem grandes produtoras de carboidratos e suas raízes fixarem-se em um ambiente rico em microrganismos heterotróficos, o solo, as plantas são alvo de diversas tentativas de infecção microbiana e desenvolveram mecanismos para monitorá-las e controlá-las. Portanto, somente uma pequena porção das bactérias conhecidas podem infectá-las (JONES; DANGL, 2006).

O processo de infecção realizado por rizóbios é baseado no reconhecimento mútuo, onde as bactérias produzem sinais moleculares reconhecidos pela planta hospedeira, como fatores Nod, o principal deles, exopolissacarídeos (ESP),

lipopolissacarídeos (LP), beta glucanos cíclicos e uma série de efetores bacterianos específicos (DOWNIE, 2010; OKAZAKI et al., 2013). Estes fatores desencadeiam um processo de diferenciação celular, organogênese, e infecção de nódulos radiculares. A leguminosa hospedeira, por sua vez, possui uma série de genes simbióticos que controlam a invasão bacteriana. Na planta, formam-se estruturas tubulares que guiam as bactérias através da epiderme e células corticais em direção ao nódulo primordial, onde elas são endocitadas em simbiomas, tornam-se bacterioides, os quais passam a fixar nitrogênio (VIA; ZANETTI; BLANCO, 2016; MIWA; OKAZAKI, 2017).

A descoberta da presença de bactérias endofíticas não rizobiais dentro dos nódulos de leguminosas é relativamente recente e pouco se sabia sobre o processo de infecção. ZGADZAJ et al. (2015) se propuseram a estudar o papel da planta hospedeira e do simbiote na infecção endofítica dos nódulos de *Lotus japonicus*, utilizando *Mesorhizobium loti* como simbiote e o endófito *Rhizobium mesosinicum*, o qual, apesar de não possuir genes relacionados com a FBN e nem os responsáveis pela síntese dos fatores Nod, é capaz de colonizar os nódulos nesta planta. Nesse caso, o processo de infecção gerado pelo simbiote guia seletivamente as bactérias endofíticas até o nódulo primordial, e, ao serem compatíveis, se multiplicam e colonizam o tecido. Para que essa invasão seja eficiente, o endófito depende da sinalização completamente efetiva do fator Nod do simbiote.

Outra característica que permite que simbiote ocupe maior espaço dentro do nódulo e que tenha vantagem adaptativa em relação ao endófito, é o maior grau de compatibilidade de seu ESP com a hospedeira, em comparação ao ESP do endófito. Em relação ao papel exercido pela hospedeira na infecção endofítica, os genes simbióticos da planta, requeridos durante o início do processo de infecção, atuam tanto na infecção simbiótica quanto na endofítica. No entanto, há mecanismos específicos dentro do nódulo para controlar a acomodação e persistência de simbioses e endófitos.

Curiosamente, sabe-se que as hospedeiras não selecionam simbioses compatíveis com base em características ligadas a fixação do nitrogênio atmosférico, embora estas sejam muito vantajosas para a planta. Dessa forma, nódulos de leguminosas de diferentes condições ambientais e solos distintos abrigam bactérias simbioses, eficientes ou pobres na capacidade de FBN, e

endófitas que não possuem esta habilidade. LEITE et al. (2017) afirmam ainda que a composição da comunidade bacteriana não-rhizobial dentro dos nódulos de *Vigna unguiculata* L. é mais influenciada pelo tipo de solo do que pelo genótipo da planta.

Em relação aos efeitos da presença das bactérias endofíticas nos nódulos da planta, eles podem ser negativos do ponto de vista econômico, uma vez que elas competem por espaço com bactérias diazotróficas, diminuindo sua contribuição de nitrogênio à planta e, por consequência, seu crescimento (TERPOLILLI; HOOD; POOLE, 2012). No entanto, não se sabe ao certo qual o papel que esses microrganismos exercem, especialmente em plantas pioneiras (ZGADZAJ et al., 2015). Além disso, há relatos de algumas destas bactérias como potenciais promotoras do crescimento vegetal, com características como produção de ácido indol acético ou solubilização de fosfato (LI et al., 2012).

Quanto à taxonomia e diversidade, os endófitos nodulares são encontrados em diversos gêneros, tais como: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bosea*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium* e *Stenotrophomonas* (VELÁZQUEZ et al., 2013; LEITE et al., 2017).

## **2.5. Técnicas moleculares usadas na identificação de bactérias diazotróficas**

As ferramentas de identificação moleculares revolucionaram a taxonomia procariótica permitindo um aumento constante no número de espécies identificadas, descritas e re-classificadas (SHAMSELDIN; ABDELKHALEK; SADOWSKY, 2017). Para serem consideradas eficientes no diagnóstico molecular, as técnicas devem apresentar uma boa reprodutibilidade, especificidade, distinguibilidade e sensibilidade; além de requererem custo, tempo e mão de obra viáveis (FALEIRO et al., 2011).

Considerando que cerca de 5% do genoma microbiano é construído por sequências repetitivas (USSERY et al., 2004), estas têm sido usadas como ferramentas moleculares em estudos de diagnóstico molecular, microbiologia médica, análises epidemiológicas e microbiologia ambiental. Com uma variação de tamanho de quinze a centenas de pares de bases de nucleotídeos, estes elementos repetitivos podem ser de vários tipos, desde os restritos a algumas espécies bacterianas (RLEP, HRS1), até os de ampla distribuição como é o caso das

sequências de DNA palindrômica extragênicas repetitivas (rep-PCR) (BRUIJN; LUPSKI; WEINSTOCK, 1998; TOBES; RAMOS, 2005).

A técnica de rep-PCR baseia-se nas diferentes distâncias entre as sequências repetitivas. A partir da PCR (reação em cadeia de polimerase), que utiliza as sequências dos elementos repetitivos como *primers* e o DNA genômico total como molde, são gerados múltiplos amplicóns, os quais diferem em tamanho numa proporção direta às distâncias genômicas entre os locais de ligação. Após a eletroforese, as bandas são visualizadas em padrões de *fingerprinting* de DNA, gerando perfis únicos para cada estirpe ou isolado bacteriano. Os sítio de iniciação para PCR geralmente utilizados nesse tipo de análise são polinucleotídeos curtos como (GTG)<sub>5</sub>, sequências repetitivas de 35-40 pb, sequências intergênicas consensuais repetitivas de enterobactérias (ERIC) de 124-127 pb ou elementos BOX de 154 pb (RADEMAKER et al., 2004).

Dentre as vantagens do uso da rep-PCR, estão sua rapidez, facilidade de execução, baixo custo e especialmente sua boa capacidade discriminatória, podendo ser utilizado na identificação bacteriana até os níveis de espécie e subespécie. No entanto, a utilização do sequenciamento do gene 16S rRNA e da hibridização DNA-DNA são mais utilizadas para identificação de gêneros e espécies, apesar de mais onerosas. As análises de rep-PCR são mais voltadas para estudos de diversidade e em pré-seleções de isolados que serão analisados por ribotipagem (ISHII; SADOWSKY, 2009).

O sequenciamento do gene 16S rRNA é considerado a espinha dorsal da taxonomia e filogenia procariótica e, a partir dele, um grande número de dados é gerado diariamente (AZEVEDO et al., 2015) e depositado em plataformas como ARB-Silva, RDP, Green Genes e Ez Taxon (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994; DESANTIS et al., 2006; KIM et al., 2012; QUAIST et al., 2013). Este gene é considerado um bom marcador genético por está presente tanto em bactérias como em arqueas e por possuir conservação evolutiva, o que está relacionado com sua função indispensável na síntese proteica. Além disso, também apresenta um amplo espectro de variação de sequências, baseado principalmente nas estruturas secundárias formadas nos ribossomos, permitindo atribuições taxonômicas rápidas até o nível de espécie, tanto em bactérias cultiváveis como não cultiváveis, sendo considerado um marcador bacteriano universal (STACKEBRANDT et al., 2002; PEPLIES et al., 2008; TINDALL et al., 2010).

No entanto, quando se trata de analisar espécies estreitamente relacionadas de gêneros como *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, por exemplo, o gene 16S rRNA apresenta limitações, sendo sua utilização considerada confiável somente até o nível de gênero (RAMÍREZ-BABENA et al., 2008; STACKEBRANDT et al., 2002). Outro problema são os relatos de que a recombinação genética e a transferência horizontal de genes também podem ocorrer neste gene (BERKUM et al., 2003; COENYE et al., 2005). Outros genes ribossomais, como 23S rRNA e ITS, melhoram a definição de espécies (MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009), no entanto, por estarem localizados no mesmo óperon do gene 16S rRNA (KLAPPENBACH, 2001), o problema da possível transferência de genes persiste.

Dessa forma, para avaliar a diversidade entre espécies e dentro de uma espécie, é necessário a utilização de ferramentas adicionais ao gene 16S rRNA como perfil de DNA (rep-PCR, por exemplo) ou a hibridização DNA-DNA (GLAESER; KÄMPFER, 2015). No caso da delimitação de novas espécies, esta última costuma ser requerida (GARRITY; HOLT, 2001). Entretanto, a utilização da hibridização DNA-DNA é bastante criticada por ser onerosa, por demandar um trabalho intenso, pelo grande consumo de tempo, pela procura por mão-de-obra especializada, baixa reprodutibilidade entre os laboratórios, além de não haver bancos de dados que permitam a comparação dos estudos (VANDAMME et al., 1996; COENYE et al., 2005; RAMOS et al., 2011).

Uma sugestão para aumentar a resolução taxonômica e filogenética e facilitar a definição de novas espécies é o uso de genes codificadores de proteínas de expressão constitutiva chamados de genes “housekeeping”. Estes são essenciais ao metabolismo celular e, em comparação ao gene 16S rRNA, possuem uma taxa de evolução mais rápida, mas com um nível suficiente de conservação para fornecer informações evolutivas, além de um poder de resolução maior para identificação tanto ao nível de gênero quanto de espécie. A utilização de fragmentos internos de vários desses genes é uma metodologia recente na taxonomia procariótica chamada “Multilocus Sequence Analysis” (MLSA), a qual é sugerida por muitos pesquisadores como substituta para o uso da hibridização DNA-DNA por ser menos onerosa, mais simples e eficaz (COENYE et al., 2005; GEVERS et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009; RAMOS et al., 2011; GLAESER; KÄMPFER, 2015).

A escolha dos genes “housekeeping” a serem utilizados deve seguir critérios como a presença no genoma em uma única cópia, distância mínima de 100 Kb entre

os genes, além de que o tamanho das sequências nucleotídicas destes genes devem ser suficientes para seu sequenciamento. Nos estudos filogenéticos dos rizóbios são geralmente utilizados os genes *atpD*, *dnaK*, *glnA*, *glnB*, *dnaK*, *thrC*, *gyrB*, *recA*, *dnaJ*, *gap*, *glnII*, *gltA* (TURNER; YOUNG, 2000; GAUNT et al., 2001; ALEXANDRE et al., 2008; MARTENS et al., 2008; MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009; RIBEIRO et al., 2009; RIVAS et al., 2009;. DURÁN et al., 2014). Entretanto, uma das dificuldades encontradas na abordagem MLSA é que, geralmente, diferentes conjuntos de genes e de *primers* são utilizados para cada gênero (NETO; RIBEIRO; HUNGRIA, 2010).

## 2.6 Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas

Os microrganismos habitantes do solo o tornam dinâmico para manutenção de sua diversidade biológica por realizarem atividades como a transferência, transformação, mobilização e solubilização de nutrientes. Dentre eles, destacam-se as rizobactérias, definidas como um grupo de bactérias que se alojam em torno das raízes das plantas (rizosfera) e que têm competência para colonizar o ambiente radicular (ZABLOTOWICZ et al., 1991). Elas também realizam as atividades biológicas do solo de forma mais eficiente que as demais bactérias (HAYAT et al., 2010). Uma vez que tenham características que promovam o crescimento e o desenvolvimento vegetal, são chamadas de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP).

Para serem consideradas efetivamente RPCP, as rizobactérias devem ser capazes de multiplicar-se e competir com os demais microrganismos por um tempo mínimo necessário para estimular o crescimento e proteção da planta (OKON, 1994). As RPCPs caracterizam-se por beneficiar as plantas diretamente atuando como biofertilizantes e fitoestimuladoras, modulando os níveis de fitormônios, agindo como riorremediadoras, realizando a degradação de poluentes orgânicos e a desintoxicação de metais pesados; e de forma indireta, contribuindo no biocontrole de fitopatógenos, atuando como inseticidas, fungicidas, além de estimular tolerância às condições de estresse, como a salinidade (GLICK, 2012)

Rizobactérias simbiotes, como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*, assim como não-simbiotes, como *Azobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* são exemplos de bactérias usadas

como bioinoculantes para promover o crescimento vegetal sob condições de estresse. As RPCPs podem ser extracelulares, como é o caso de *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Serratia* etc., e também intracelulares como *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*. A maioria delas são bastonetes Gram-negativos, mas também há as que são bastonetes Gram-positivos, assim como cocos ou pleomórficos. Além disso, numerosos actinomicetos como *Micromonospora* sp., *Streptomyces* spp., *Streptosporangium* sp., *Thermobifida* sp. são relatados como RPCPs (FRANCO-CORREA et al., 2010; BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Dentre as diversas propriedades, as RPCPs contribuem com o crescimento da planta a partir da FBN, fornecendo à planta o nitrogênio, principal nutriente limitante do crescimento vegetal, em sua forma bioacessível; da solubilização de fosfato, fornecendo fósforo, segundo nutriente mais importante, nas formas que possam ser absorvidas pelas raízes; pela produção de sideróforos, agentes solubilizadores de compostos de ferro mineral ou orgânico, que aumentam a concentração de metais solúveis contribuindo para aliviar o estresse por eles causado às plantas (KIM; REES, 1994; INDIRAGANDHI et al., 2008; KHAN et al., 2009).

Em relação aos fitormônios, a auxina, também chamada de ácido-indol-3-acético (AIA), desempenha funções importantes na planta como promover a estimulação da germinação de sementes e tubérculos, afetar a divisão e diferenciação celular, iniciar a formação de raízes laterais e adventícias, controlar processos de germinação vegetativos, resistência às condições estressantes, formação de pigmentos, biossíntese de vários metabólitos etc. Apesar de ser produzido pela planta, os níveis AIA endógenos são afetados pela aquisição de AIA bacteriano, promovendo o crescimento da planta (GLICK, 2012). Em contrapartida, o fitormônio etileno é um regulador do crescimento produzido por quase todas as plantas, em maior quantidade sob condições estressantes, que causa desfoliação e outros processos que afetam a planta. Certas RPCPs produzem a enzima aminocicloprapano-1-carboxilato (ACC) desaminase que convertem o ACC, precursor do etileno, em 2-oxobutanoato e NH<sub>3</sub>, diminuindo os efeitos negativos para a produtividade vegetal e aumentando a tolerância às condições estressantes (SALEEM et al., 2007).

As RPCPs classificadas como agentes de biocontrole geram na planta a chamada resistência sistêmica induzida a patógenos bacterianos, fúngicos e virais. Os compostos bacterianos que induzem essa resistência são lipopolissarídeos, sideróforos, lipopeptídeos cíclicos, 2-4 diacetilfluroglucinol, lactonas, homoserinas, e voláteis como acetona e 2,3-butanodiol (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

É importante ressaltar que as habilidades das RPCPs são aditivas e que uma pode afetar o desenvolvimento da outra. Como exemplos, podemos citar que bactérias solubilizadoras de fosfato podem estimular a eficiência FBN; para a formação dos nódulos na planta é necessário determinados níveis de auxinas, sendo que muitas espécies do gênero *Rhizobium* produzem este hormônio; sideróforos bacterianos, além de disponibilizar ferro, interferem na capacidade de defesa da planta etc. A produção de inoculantes de RPCP que concentrem o maior número de benefícios às culturas a quem se destinam é uma alternativa para uso de fertilizantes químicos, de transgênicos e uma opção viável para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável (AHEMAD; KIBRET, 2014).



### 3. REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- ALEXANDRE, A. et al. DnaJ is a useful phylogenetic marker for alphaproteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 2839–2849, 2008.
- ARAUJO, A. S. F. et al. Diversity of native rhizobia-nodulating *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Legume Research**, v. 38, n. 5, p. 653–657, 2015.
- ARAUJO, A. S. F. et al. Nodulation ability in different genotypes of *Phaseolus lunatus* by rhizobia from California agricultural soils. **Symbiosis**, v. 73, n. 1, p. 1–8, 2016.
- AZEVEDO, H. et al. A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. **BMC Genomics**, v. 16, n. 5, p. S10, 2015.
- BERGE, G. . Microfossils and Precambrian Iron-Formations. **GSA Bulletin**, v. 78, n. 3, p. 331–342, 1967.
- BERKUM, P. VAN et al. Discordant Phylogenies within the *rrn* Loci of Rhizobia. **Society**, v. 185, n. 10, p. 2988–2998, 2003.
- BERRADA, H.; FIKRI-BENBRAHIM, K. Taxonomy of the Rhizobia: Current Perspectives. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 6, p. 616–639, 2014.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.
- BRUIJN, F. J. DE. Biological nitrogen fixation. In: LUGTENBERG, B. **Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture**. Springer, 2015. p. 215–224.
- BRUIJN, F. J. DE; LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. **Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis**. Chapman e Hall, p. 793, 1998.
- BRUNEAU, A. et al. Legume phylogeny and classification in the 21st century : progress , prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217–248, 2013.

CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I.; MARTÍNEZ-CASTILLO, J. Testing Domestication Scenarios of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Mesoamerica: Insights from Genome-Wide Genetic Markers. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1551, 2017.

COENYE, T. et al. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 147-167, 2005.

BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2180–2187, 1992.

DEAN, D. R.; JACOBSON, M. R. **Biochemical genetics of nitrogenase**. Chapman and Hall, p. 763-834, 1992.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, 2006.

DOWNIE, J. A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 150-170, 2010.

DURÁN, D. et al. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2072–2078, 2014.

EILMUS, S. **Diversität und Funktionen der mit der Ameisengattung *Pseudomyrmex* (Lund, 1831) assoziierten Bakterien**. Essen: Universidade de Duisburg-Essen, p. 86-87, 2009.

FALEIRO, F. G. et al. **Biotecnologia : estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 13-218, 2011.

FALKOWSKI, P. G. Nutrient Cycling. **Nature**, v. 387, p. 272–275, 1997.

FOFANA, B. et al. Molecular evidence for an andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 2, p. 202–212, 1999.

FRANCO-CORREA, M. et al. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. **Applied Soil Ecology**, v. 45, n. 3, p. 209–217, 2010.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The Road Map to the Manual. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer, 2001. p. 119–166.

GAUNT, M. W. et al. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2037–2048, 2001.

GEVERS, D. et al. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 733–739, 2005.

GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237–245, 2015.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

GRAHAM, P. H. et al. Proposed Minimal Standards for the Description of New Genera and Species of Root- and Stem-Nodulating Bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 582–587, 1991.

GUTIÉRREZ SALGADO, A.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Evidence for two gene pools of the Lima bean, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 42, n. 1, p. 15–28, 1995.

GYANESHWAR, P. et al. Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI**, v. 24, n. 11, p. 1276–1288, 2011.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579–598, 2010.

HOFFMAN, B. M. et al. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: The next stage. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4041–4062, 2014.

INDIRAGANDHI, P. et al. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of Diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 327–333, 2008.

ISHII, S.; SADOWSKY, M. J. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 733–740, 2009.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p.

323–329, 2006.

JORDAN, D. C. NOTES: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, n. 1, p. 136–139, 1982.

KHAN, M. S. et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. **Environmental Chemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2009.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. **Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 389–397, 1994.

KIM, O. S. et al. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16s rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 716–721, 2012.

KLAPPENBACH, J. A. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 1, p. 181–184, 2001.

LEITE, J. et al. Cowpea Nodules Harbor Non-rhizobial Bacterial Communities that Are Shaped by Soil Type Rather than Plant Genotype. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 2064, 2017.

LI, L. et al. Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 1, p. 46–68, 2012.

LLORET, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. **Revista Latinoamericana Microbiología**, v. 47, n. 1–2, p. 43–60, 2005.

LPWG. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny – The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44–77, 2017.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 541–556, 2009.

MARTENS, M. et al. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: A case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 200–214, 2008.

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, n. 12, p. 2934–2950, 2009.

MEYER, S. E. et al. 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.

MIWA, H.; OKAZAKI, S. How effectors promote beneficial interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 148-154, 2017.

MOTTA-ALDANA, J. R. et al. Multiple origins of Lima bean landraces in the Americas: Evidence from chloroplast and nuclear DNA polymorphisms. **Crop Science**, v. 50, n. 5, p. 1773–1787, 2010.

NETO, I. V. R.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and glnII genes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1291–1302, 2010.

OKAZAKI, S. et al. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 42, p. 17131–17136, 2013.

OKON, Y. **Azospirillum/plant associations**. Boca Raton: CRC Press, p. 175, 1994.

ORMEÑO-ORRILLO. et al. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. **Systematic and applied microbiology**, v. 38, n. 4, p. 287–291, 2015.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; DÁVILA, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Biodiversity of nitrogen-fixing nodule bacteria associated with lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in its domestication centers. In: LOPES, A. C. DE A.; ARAÚJO, A. S. F. DE; GOMES, R. L. F. **Phaseolus lunatus: diversity, growth and production**. New York: Nova Science, 2015. v. 1, n. 1, p. 91–102.

PEPLIES, J. et al. A standard operating procedure for phylogenetic inference (SOPPI) using (rRNA) marker genes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 251–257, 2008.

PRAKASH, O. et al. Polyphasic approach of bacterial classification - An overview of recent advances. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 98-108, 2007.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 590–596, 2013.

RADEMAKER, J. L.W., et al. Characterization of the diversity of ecological important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Kowalchuk, G.A., et al. **Molecular Microbial Ecology Manual**. Kluwer Academic, 2004. v. 3, p. 1–27.

RAMÍREZ-BABENA, M. H. et al. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 2484–2490, 2008.

RAMOS, P. L. et al. An MLSA-based online scheme for the rapid identification of *Stenotrophomonas* isolates. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 394–399, 2011.

RASHID, M. H. OR et al. Average nucleotide identity of genome sequences supports the description of *Rhizobium lentis* sp. nov., *Rhizobium bangladeshense* sp. nov. and *Rhizobium binae* sp. nov. from lentil (*Lens culinaris*) nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3037–3045, 2015.

RAYMOND, J. et al. The Natural History of Nitrogen Fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 541–554, 2004.

RIBEIRO, R. A. et al. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium microsymbionts* of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 297–306, 2009.

RIVAS, R. et al. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 101–110, 2009.

RUBIO, L. M.; LUDDEN, P. W. Biosynthesis of the Cofactor of Nitrogenase. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 93–111, 2008.

SALEEM, M. et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 635–648, 2007.

SANTOS, J. O. et al. Genetic diversity among native isolates of rhizobia from *Phaseolus lunatus*. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 437–444, 2011.

SAWADA, H.; KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **The Journal of General**

and **Applied Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 155–179, 2003.

SERRANO-SERRANO, M. L. et al. Gene pools in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Americas: Evidences for an Andean origin and past migrations.

**Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 1, p. 76–87, 2010.

SHAILENDRA SINGH, G. G. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, n. 2, p. 96-102, 2015.

SHAMSELDIN, A.; ABDELKHALEK, A.; SADOWSKY, M. J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review.

**Symbiosis**, v. 3, n. 2, p. 91-109, 2017.

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

SMÝKAL, P. et al. Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1–3, p. 43–104, 2015.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in Legume-Rhizobium Technology**. 7. ed. Hawaii: Honolulu , p. 367, 1985.

STACKEBRANDT, E. et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1043–1047, 2002.

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 of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 846–849, 1994.

TERPOLILLI, J. J.; HOOD, G. A.; POOLE, P. S. What determines the efficiency of N(2)-fixing *Rhizobium*-legume symbioses?. **Advances in microbial physiology**, v. 60, p. 326-389, 2012.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research Acids Res**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

TINDALL, B. J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 249–266, 2010.

TOBES, R.; RAMOS, J. L. REP code: Defining bacterial identity in extragenic space. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 225–228, 2005.

TURNER, S. L.; YOUNG, J. P. W. The Glutamine Synthetases of Rhizobia: Phylogenetics and Evolutionary Implications. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 2, p. 309–319, 2000.

USSERY, D. W. et al. Genome update: DNA repeats in bacterial genomes. **Microbiology**, v. 150, n. 11, p. 3519-3521, 2004.

VELÁZQUEZ, E. et al. Nodular endophytes: an untapped diversity. In: RODELAS GONZÁLEZ, M. B.; GONZALEZ-LÓPEZ, J. **Beneficial plant-microbial interactions** : ecology and applications. CRC Press, 2013, p. 214–236.

VIA, V. D.; ZANETTI, M. E.; BLANCO, F. How legumes recognize rhizobia. **Plant Signaling and Behavior**, v. 11, n. 2, p. 1559-2324, 2016.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1–2, p. 3–14, 2006.

WILLEMS, A.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **International journal of systematic bacteriology**, v. 43, n. 2, p. 305–313, 1993.

YANAGI, M.; YAMASATO, K. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. **FEMS Microbiol.Lett.**, v. 107, n. 1, p. 115–120, 1993.

ZABLOTOWICZ, R. M. et al. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D. L.; CREGAN, P. B. **The Rhizosphere and Plant Growth**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991. p. 315–326.

ZAKHIA, F.; DE LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, v. 21, n. 6–7, p. 569–576, 2001.

ZGADZAJ, R. et al. A Legume Genetic Framework Controls Infection of Nodules by Symbiotic and Endophytic Bacteria. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 6, p. 1–21, 2015.



#### 4. Capítulo I

##### **Caracterização polifásica de comunidade bacteriana simbiote e endofítica presentes em nódulos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)**

###### **Resumo**

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é a segunda espécie em importância econômica do gênero. Assim como as demais leguminosas, é capaz de estabelecer associação simbiótica com rizóbios, bactérias fixadoras de nitrogênio. Além destas, muitos estudos mostram a existência em plantas leguminosas de bactérias endofíticas que não possuem a capacidade de fixar nitrogênio. O objetivo do presente trabalho foi descrever a diversidade da comunidade bacteriana associada aos nódulos radiculares de feijão-fava por meio da caracterização morfofisiológica, bioquímica e genética. Foram obtidos 35 isolados retirados de nódulos de duas variedades de feijão-fava cultivadas em amostras de solo obtidas no município de Água Branca-PI. Destes, todos foram submetidos à caracterização bioquímica, 29 à análise rep(BOX)-PCR, 23 à amplificação do gene 16S rRNA, 14, do gene *glnII* e 15 do gene *gyrB*. Foram detectados representantes dos gêneros *Bradyrhizobium*; *Rhizobium* e *Burkholderia*, os quais possuem espécies de rizóbios, assim como representantes de gêneros de bactérias endofíticas tais como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Williamsia*, *Enterobacteriaceae*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Paenobacillus* e *Serratia*. A preferência desta leguminosa por associar-se à *Bradyrhizobium* foi confirmada. No entanto, uma grande diversidade de bactérias simbiotes e endofíticas também foram encontradas em seus nódulos. Os isolados UFPI-18, UFPI-F40B, UFPI-F53 e UFPI-F60 foram identificados como possíveis RPCPs. Além disso, os isolados UFPI-F03, UFPI-F06, UFPI-F15, UFPI-F16, UFPI-F17 e UFPI-F19 são apontados como prováveis novas espécies.

**Palavras-chave:** rizóbios, genes housekeeping, bactérias promotoras do crescimento de plantas, fixação biológica de nitrogênio, *Phaseolus lunatus* L.

**Abstract**

Beanbean (*Phaseolus lunatus* L.) is the second economically important species of the genus. Like other legumes, it is able to establish a symbiotic association with rhizobia, nitrogen fixing bacteria. Besides these, many studies show the existence in leguminous plants of endophytic bacteria that do not have the capacity to fix nitrogen. The objective of the present work was to describe the diversity of the bacterial community associated with the root nodules of fava beans through morphological, biochemical and genetic characterization. There were obtained 35 isolates from nodules of two bean varieties cultivated in soil samples obtained in the municipality of Água Branca-PI. Of these, all were submitted to biochemical characterization, 29 to rep (BOX) -PCR analysis, 23 to 16S rRNA gene amplification, 14 of the *glnII* gene and 15 of the *gyrB* gene. Representatives of the genus *Bradyrhizobium* were detected; *Rhizobium* and *Burkholderia*, which have rhizobium species, as well as representatives of endophytic bacterial genera such as *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Williamsia*, *Enterobacteriaceae*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Paenobacillus* and *Serratia*. The preference of this legume for associating with *Bradyrhizobium* was confirmed. However, a great diversity of symbiotic and endophytic bacteria were also found in their nodules. Isolates UFPI-F40B, UFPI-F53 and UFPI-F60 were identified as possible RPCPs. In addition, the isolates UFPI-F03, UFPI-F06, UFPI-F15, UFPI-F16, UFPI-F17 and UFPI-F19 are identified as probable new species.

**Key words:** rhizobia, housekeeping genes, plant growth promoting bacteria, biological nitrogen fixation, *Phaseolus lunatus* L.

**Introdução**

*Phaseolus lunatus* L., conhecida como feijão-fava, é a segunda espécie dentre as cinco cultiváveis de seu gênero de maior importância econômica. Seu cultivo se estende por vários países como Brasil, Peru, México e Estados Unidos (FOFANA et al., 1999; DE ARAUJO et al., 2016). Assim como muitas outras leguminosas, o feijão-fava é capaz de estabelecer uma associação simbiótica com bactérias diazotróficas Gram-negativas presentes no solo, genericamente chamadas

de rizóbios (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2006; ORMEÑO-ORRILLO; DÁVILA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2015).

Os rizóbios, os quais incluem diversos gêneros bacterianos pertencentes às classes alfa e beta-proteobactérias, possuem a habilidade de infectar leguminosas e induzir em suas raízes ou nos caules, a formação de estruturas especializadas chamadas de nódulos, local onde as bactérias fixam o nitrogênio atmosférico e o disponibilizam à planta hospedeira (SHAMSELDIN; ABDELKHALEK; SADOWSKY, 2017). Esse processo de infecção é bastante especializado e ocorre por meio de reconhecimento mútuo através de sinalizadores moleculares (VIA; ZANETTI; BLANCO, 2016; MIWA; OKAZAKI, 2017).

Acreditava-se que somente rizóbios poderiam habitar o interior dos nódulos das leguminosas. No entanto, percebeu-se que uma grande diversidade de comunidades bacterianas podem coexistir dentro dos nódulos, incluindo tanto as indutoras da nodulação, os rizóbios simbióticos, como as não noduladoras, denominadas de bactérias endofíticas (ZGADZAJ et al., 2015; LEITE et al., 2017). Apesar dessa coexistência, o processo de infecção das plantas só pode ser iniciado pelas bactérias simbióticas (ZGADZAJ et al., 2015).

Até o momento, há poucos relatos sobre as bactérias presentes nos nódulos de feijão-fava. Dentre eles, há representantes dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Mesorhizobium* isolados destes nódulos (EILMUS, 2009; SANTOS et al., 2011; DURÁN et al., 2014; ARAUJO et al., 2015; ORMEÑO-ORRILLO; DÁVILA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2015). Apesar da comprovada preferência desta leguminosa por associar-se ao gênero *Bradyrhizobium*, ela provavelmente possui um nível de promiscuidade maior que o já conhecido (ORMEÑO-ORRILLO; DÁVILA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2015). Dessa forma, este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar, a partir de uma abordagem polifásica, a comunidade bacteriana retirada de nódulos de feijão-fava.

## **Material e métodos**

### **Isolados bacterianos**

Trinta e cinco isolados bacterianos foram obtidos de nódulos presentes em amostras de solos coletadas em 2008, conforme descrito por Santos et al. (2011),

nos distritos de Nova Esperança (07°77'10"S E 93°51'58"W) e Santa Rita (07°71'49"S E 93°60'08"W), município de Água Branca-PI. Os solos são classificados como Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico, com histórico de cultivo de feijão-fava, no entanto, sem histórico de inoculação, e suas propriedades físico-químicas estão descritas na Tabela 1.

Foram utilizadas como planta isca duas variedades crioulas distintas de feijão-fava: Boca de Moça e Fava Miúda. Os isolados foram mantidos na Coleção de Culturas do Laboratório de Análise de Solos (LASO), na Universidade Federal do Piauí, conservados em sílica gel. A purificação dos mesmos foi verificada em meio ágar com extrato de manitol e levedura (YMA) (VICENT, 1970) contendo vermelho congou como indicador de pureza. Os estoques foram preservados em meio de cultura YMA e mantidos a 4°C para armazenagem.

### **Caracterização morfofisiológica e bioquímica das cepas**

Os isolados foram avaliados quanto ao tempo de crescimento em meio YMA, onde foram consideradas as seguintes características: taxa de crescimento rápida (0 a 4 dias), intermediária (5 a 6 dias) ou lenta ( $\geq 7$  dias); e quanto a reação ácida, neutra ou alcalina em meio YMA contendo azul de bromotimol como indicador, onde alcalino é indicado pela coloração azul, neutro, verde, ou ácido, amarelo (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994; COSTA et al., 2018).

Testes bioquímicos qualitativos de protease, urease, amilase (RENEWICK; CAMPBELL; COE, 1991), hidrólise de Tween-80 (SIERRA, 1957) e carboxil-metilcelulose (CMC) (DEES et al., 1995) foram realizados em meios sólidos específicos, verificando-se a presença ou ausência de halo transparente em torno das colônias. O teste de solubilização de fosfato (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001) seguiu o mesmo procedimento, mas foi analisado de forma quantitativa. Também foi realizada a coloração de Gram, teste de catalase e gelatinase (MACFADDIN, 1980; YANO et al., 1991).

### **Extração de DNA e fingerprinting genômico rep-PCR (BOX)**

A extração do DNA foi realizada utilizando o Kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen), conforme recomendação do fabricante, após cultivo dos isolados em meio YM líquido em agitador orbital a 200 rpm e 28°C por 72h, até turvamento do

meio. Após a extração, a pureza e a integridade do DNA forem verificadas por eletroforese horizontal em gel de agarose a 0,8%.

Os DNAs de 29 isolados foram submetidos à amplificação dos elementos rep-PCR (BOX) utilizando o *primer* BOX-A1R (VERSALOVIC et al., 1994), conforme os procedimentos descritos por Kaschuk et al. (2006a) (Tabela 2, apêndices). Dentre os 35 isolados foram selecionados apenas 29 devido à dificuldade de amplificação com os *primers* utilizados.

### **Sequenciamento dos genes 16S rRNA, *glnII* e *gyrB***

Dentre os isolados, 23 foram submetidos à amplificação do gene 16S rRNA, com os primers fD1 e rD1 (WEISBURG et al., 1991), conforme descrito por Menna et al. (2006), resultando em fragmento de cerca de 1400 pb. Desses isolados, 14 foram selecionados para a amplificação do gene *glnII*, utilizando os primers TSglnII<sub>f</sub> e TSglnII<sub>r</sub>, conforme descrito por Stępkowski et al. (2005), com fragmentos de cerca de 560 pb, e 15 isolados foram submetidos à amplificação do gene *gyrB*, com os *primers* *gyrB*-BurkF e *gyrB*-BurkR, conforme descrito por Spilker et al. (2009), com fragmentos de cerca de 700 pb. As informações sobre as sequências nucleotídicas dos *primers* as condições de amplificação estão descritas na Tabela 2.

Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador PTC 200 da MJ Research Inc. Os produtos da PCR foram purificados com kit de purificação de PCR PureLink (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A verificação da concentração das amostras foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando 2 µL de produtos da PCR, com coloração com brometo de etídio. O sequenciamento de ambos os genes foi realizado em um sequenciador 3500XL (Hitachi®, Applied Biosystems®, EUA), conforme descrito por Menna et al. (2006).

### **Análises dos dados**

Uma matriz binária foi construída a partir das características fenotípicas avaliadas e os isolados foram agrupados baseados no algoritmo UPGMA (SNEATH; SOKAL; FREEMAN, 1973) e coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912).

Para as análises rep-PCR (BOX) foi utilizado o programa Bionumerics® versão 7.5 (Applied Mathematics, Sint-Martens-Latem, Bélgica), onde os tamanhos dos fragmentos foram normalizados de acordo com o tamanho do marcador de DNA

e a árvore filogenética foi gerada utilizando o algoritmo UPGMA (SNEATH; SOKAL; FREEMAN, 1973) e o coeficiente Jaccard (JACCARD, 1912).

A análise das sequências dos genes 16S rRNA, *glnII* e *gyrB* foi realizada com o programa Phred (EWING et al., 1998). As sequências obtidas na direção 5' e 3' foram submetidas à base de dados GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). O alinhamento foi realizado usando MEGA *software* versão 6.0 com os parâmetros padrões, o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbour-Joining (SAITOU; NEI, 1987). O suporte *bootstrap* para cada nó foi avaliado com 1000 repetições.

## **Resultados e discussão**

### **Propriedades morfofisiológicas e bioquímicas**

Com base no tempo de crescimento foram formados dois grupos: de crescimento rápido, com mais de 80% (29) dos isolados, e de crescimento lento com apenas 17% (6). Em relação a reação em meio YMA, 65,71% (23) foram identificados como de crescimento em pH ácido e 34,28% (12) em pH neutro. Quanto à constituição da parede celular e aos testes bioquímicos realizados, os resultados em porcentagem podem ser observados na Tabela 1. Na Tabela 3 (Apêndices) podem ser visualizados os resultados para os isolados de forma individual.

Uma estirpe bacteriana que reúna características como capacidade de atuar na solubilização de nutrientes, de degradar e disponibilizar compostos orgânicos necessários à planta, de produzir substâncias antioxidantes pode ser classificada como rizobactéria promotora do crescimento de plantas (RPCP) (AHEMAD; KIBRET, 2014). Neste sentido, os isolados UFPI-F40B, UFPI-F53 e UFPI-F60 apresentaram o melhor desempenho, sendo positivos em quatro dos nove testes bioquímicos realizados. Além destes, UFPI-F18, UFPI-F40A, UFPI-F51 e UFPI-F59 foram positivos em três dos testes, o que os classifica como potenciais RPCPs, as quais podem ser utilizadas em práticas agrícolas na forma de inoculante (Tabela 3, apêndices). Os demais isolados foram positivos em apenas dois, um ou nenhum teste.

**Tabela 1:** Resultados em porcentagem (%) das análises fenotípicas realizados em isolados bacterianos coletados em solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI, usados como fonte de inóculo em feijão-fava. Teresina, PI, 2008.

	G	A	CMC	HT-80	SF	U	P	C	TG
<b>Isolados positivos</b>	54,83	5,71	0	5,71	25,71	14,28	5,88	62,85	91,42
<b>Isolados negativos</b>	45,16	94,28	100	94,28	74,28	85,71	94,11	37,14	9,37

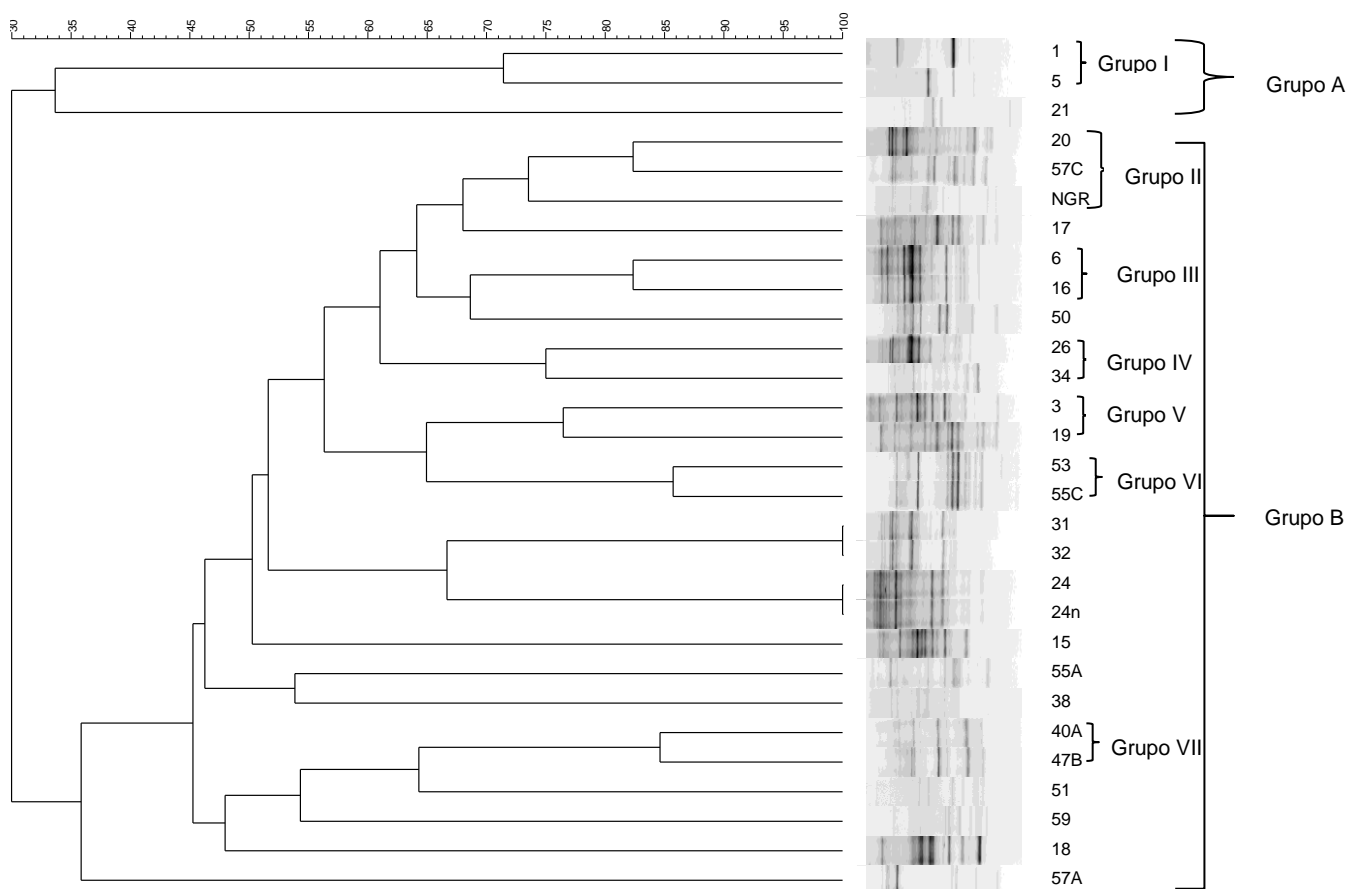
G = teste de gelatinase; A = teste de amilase ; CMC = teste de carboxil-metil-celulose; HT-80 = teste de hidrólise de Tween-80; SF = teste de solubilização de fosfato; U = teste de urease; P = protease; C = teste de catalase; TG = teste de Gram.

### Fingerprinting genômico rep-PCR (BOX)

Após a amplificação com o primer rep-PCR (BOX), foram obtidos 19 perfis de DNA para 29 isolados. A árvore filogenética gerada a partir destes perfis revelou grande diversidade entre os isolados, os quais agruparam-se a um nível muito baixo de similaridade, inferior a 34% (Figura 2).

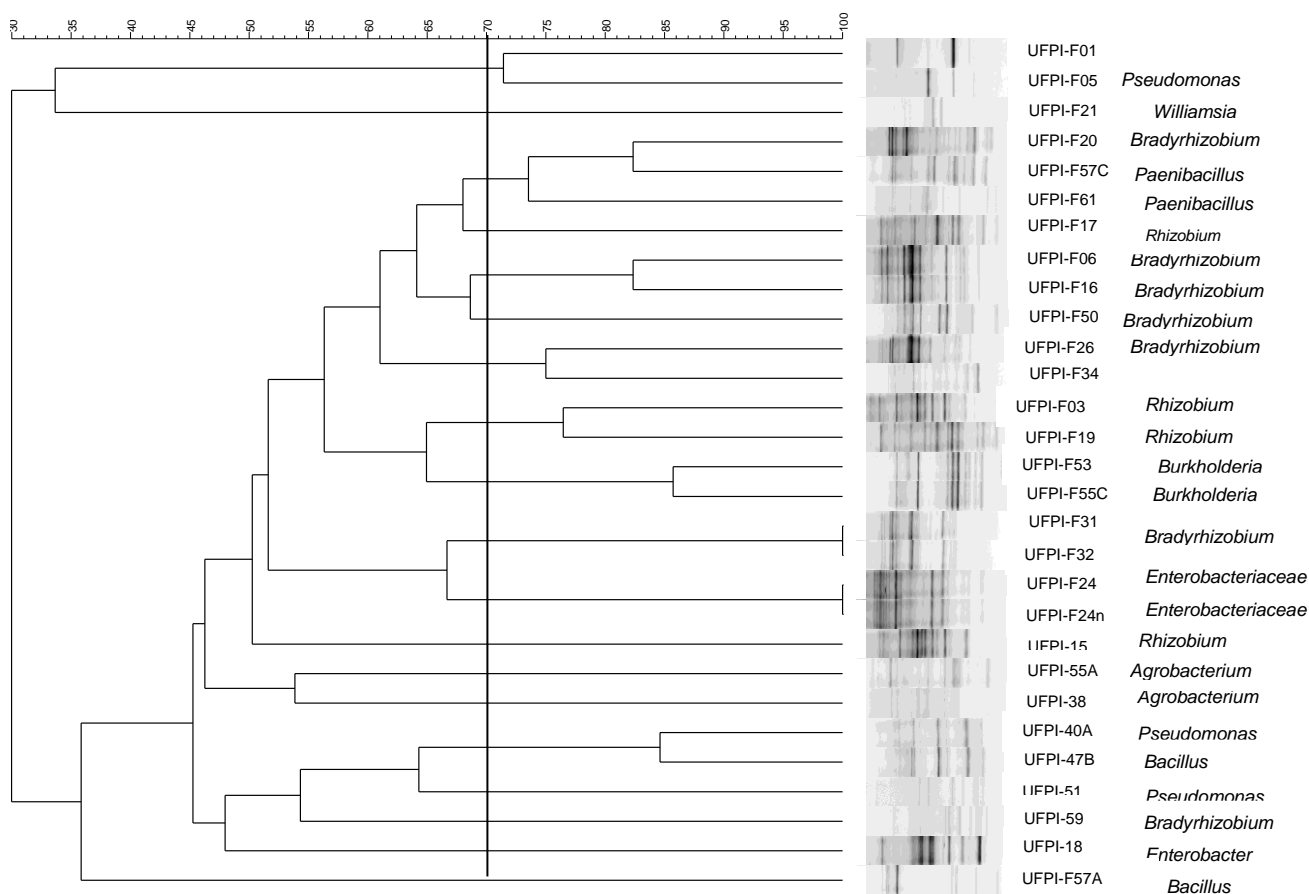
Admitindo-se uma linha de corte de 70% de similaridade, como sugerido em diversos estudos sobre diversidade genética de bactérias usando rep-PCR (COENYE et al., 2002; GRANGE; HUNGRIA, 2004; KASCHUK et al., 2006a, 2006b; MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009; DALL'AGNOL et al., 2016), formaram-se dois grandes grupos: A e B. O primeiro foi o menor, apresentando um subgrupo constituído por dois isolados bacterianos e um ramo isolado. O grupo B, por sua vez, possui seis subgrupos, um deles com três isolados, e todos os demais com dois isolados em cada subgrupo, além de onze ramos (Figura 1).

É interessante observar que isolados com 100% de similaridade em relação aos perfis rep-PCR (BOX) agruparam-se em diferentes grupos no dendrograma fenotípico, como é o caso dos isolados 24 e 24n, que dividiram em diferentes subgrupos de GI e dos isolado 31 e 32 que mostraram uma distância ainda maior, estando o primeiro no grupo B e o segundo no grupo A. Com a definição de gênero para cada isolado obtida após o sequenciamento do gene 16S rRNA, o resultado de BOX-PCR foi re-analisado e uma alta diversidade entre os gêneros e dentro dos gêneros pode foi identificada (Figura 2).



**Figura 1:** Análise de agrupamentos baseada no método UPGMA e no coeficiente Jaccard dos produtos obtidos por análise rep-PCR (BOX) de 29 isolados bacterianos de feijão-fava de solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI. Os agrupamentos foram obtidos considerando o nível de similaridade de 70%.





**Figura 2:** Re-análise de agrupamentos baseada no método UPGMA e no coeficiente Jaccard dos produtos obtidos por análise rep-PCR (BOX) de 29 isolados bacterianos de feijão-fava de solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI, após a amplificação do gene 16S rRNA..

### Diversidade do gene 16S rRNA

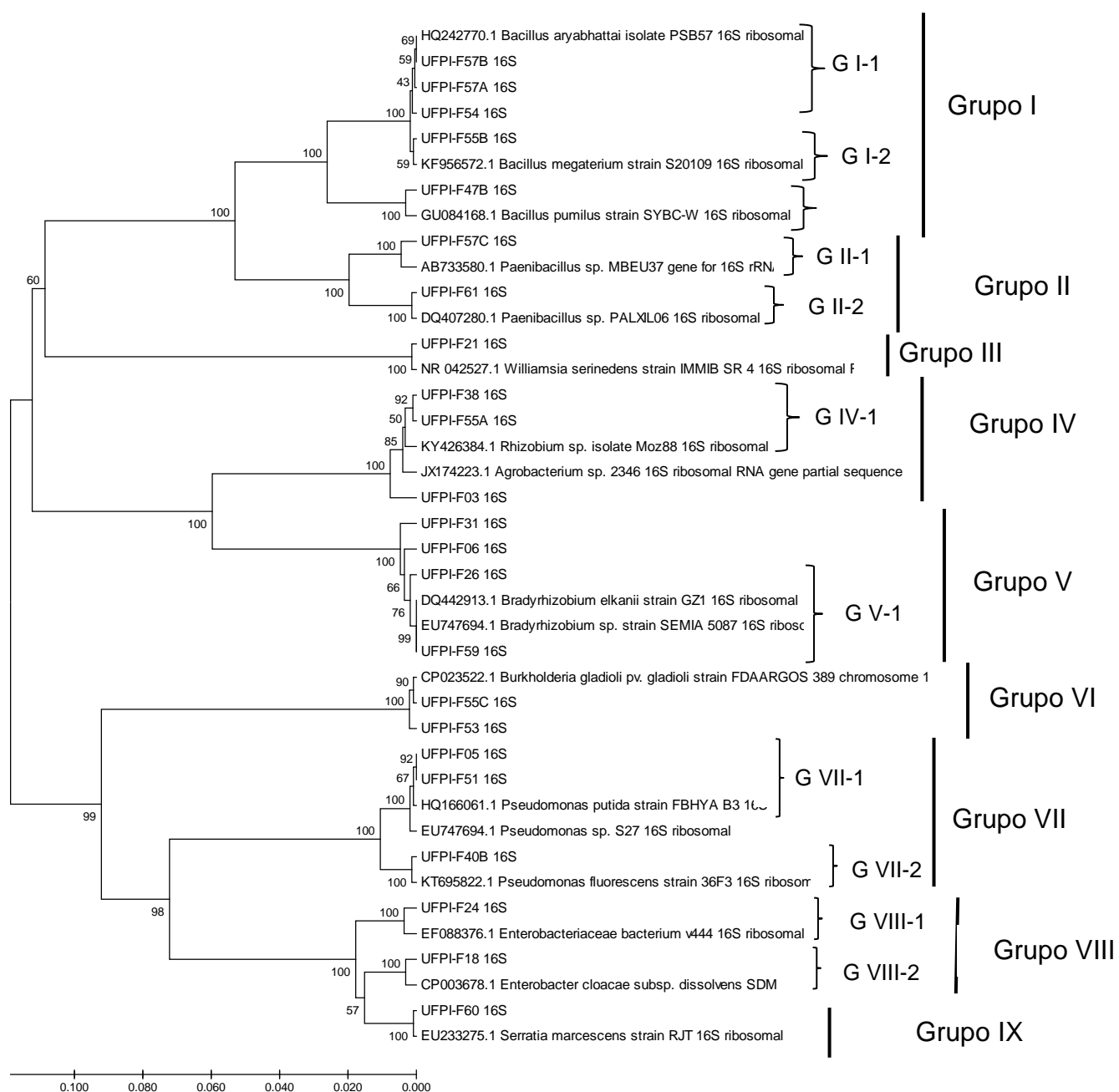
O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de 23 isolados resultou em 650 a 1182 pb por amostra. Os isolados com um número de sequências lidas inferiores a 1000 pb não foram incluídos para a construção da árvore filogenética, no entanto, a posição taxonômica de muitos deles pode posteriormente ser confirmada a partir da análise dos genes housekeeping *glnII* e *gyrB*.

Foram identificados com base no gene 16S rRNA dez gêneros bacterianos, sendo *Bradyrhizobium* o mais abundante, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacteriaceae*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, e *Williamsia*, (Tabela 4, apêndice). A similaridade entre os isolados e as sequências de referências utilizadas para identifica-los variou entre 98 a 100%.

A árvore filogenética construída com as sequências do gene 16S rRNA apresentou uma boa definição filogenética, dividindo-se em nove grupos principais e onze subgrupos (Figura 3). O primeiro grupo (G I) pertence ao gênero *Bacillus* e reúne o maior número de subgrupos num total de três. No primeiro deles (G I-1), os isolados UFPI-F57B, UFPI-F57A e UFPI-F54 estão associados à estirpe *Bacillus aryabhatai*; no segundo (G I-2), UFPI-F55B associou-se a *Bacillus megaterium*; e o terceiro subgrupo (G I-3) inclui UFPI-F47B e a estirpe *Bacillus pumilus*. Tanto G I-1 como G I-3 possuem um alto suporte de *bootstrap* de 100%, enquanto G I-2 apresenta 59%. O grupo II apresentou dois subgrupos bem definidos, ambos com *bootstrap* de 100%, onde UFPI-F57C agrupou-se com *Paenibacillus* sp em G II-1 e UFPI-F61 com outra estirpe do mesmo gênero, ambos com 99% de similaridade. Já o terceiro grupo consistiu numa associação isolada de UFPI-F21 e a estirpe *Williamsia serinedens* com alto *bootstrap* (100%).

O grupo IV possuiu apenas um subgrupo, o qual reuniu UFPI-F38, UFPI-F55A e *Rhizobium* sp. com um *bootstrap* de 50%. UFPI-F03 formou um ramo isolado dentro do grupo. O grande grupo de *Bradyrhizobium* (G V) reuniu o maior número de isolados dividindo-se também em um único subgrupo (G V-1), o qual agrupou UFPI-F26 e UFPI-F59 a *B. elkanii*, com *bootstrap* de 76%. UFPI-F31 e UFPI-F06 permaneceram isolados no grupo.

O sexto grupo consistiu apenas de dois isolados, UFPI-F55C e UFPI-F53, agrupados com *Burkholderia gladioli* com alto *bootstrap* de 100%. O grupo *Pseudomonas* (G VII) dividiu-se em dois subgrupos bem definidos, ambos com *bootstrap* de 100%, sendo que o primeiro associa UFPI-F05 e UFPI-F51 a *P. putida*, e o segundo reúne UFPI-F40B a *P. fluorescens*. O grupo VIII também possui dois subgrupos bem definidos com *bootstrap* máximo, e agrupou em G VIII-1 UFPI-F24 e *Enterobacteriaceae bacterium*, e em G VIII-2, UFPI-F18 e *Enterobacter cloacae*. O último grupo consistiu apenas de UFPI-F60 e a estirpe *Serratia marcescens*, com *bootstrap* de 100%.



**Figura 3:** Árvore filogenética gerada a partir das sequências parciais do gene 16S rRNA de vinte e três quinze isolados bacterianos deste estudo e de sequência de referências. A filogenia foi inferida usando o método neighbour-joining.

Dentre os gêneros encontrados, 3 possuem representante nodulíferos,; *Bradyrhizobium*; *Rhizobium* (*R. pusense* e *R. alamii*), e *Burkholderia* (*B. gladioli*). A maioria dos isolados foi atribuída a espécie *Bradyrhizobium elkanii*, a qual já primeiramente foi relatada como nodulante de *Vigna unguiculata* (SAWADA; KUYKENDALL; YOUNG, 2003), mas também já foi descrita como simbiote de *P. lunatus* (VAN BERKUM; FUHRMANN, 2009). *Rhizobium. pusense* é colonizadora nodulante da rizosfera de *Cicer arietinum* (PANDAY; SCHUMANN; DAS, 2011), e

assim como *R. alarii*, não havia, até o momento, sido descrita como simbiote de feijão-fava, assim como a espécie *Burkholderia gladioli*.

Em relação aos gêneros endofíticos não nodulíferos, foram identificados isolados atribuídos à *Agrobacterium* (*A. tumefaciens*), *Bacillus* (*B. pumilus*, *B. aryabhattai*, *B. megaterium*), *Enterobacter* (*E. cloacea*), *Enterobacteriaceae* (*E. bacterium*), *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*), *Paenobacillus*, *Serratia* (*S. marcescens*) e *Williamsia* (*W. serinedens*). Os isolados UFPI-18, UFPI-F40B, UFPI-F53 e UFPI-F60, identificados neste estudo como RPCP, foram atribuídos respectivamente às espécies *Enterobacter cloacae*, a qual é relatada como promotora do crescimento de feijões (SHAMEER; PRASAD, 2017), *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia gladioli* e *Serratia marcescens*.

O processo de infecção de nódulos de leguminosas por bactérias não fixadora de nitrogênio foi recentemente descrito por Zgadzaj et al.(2015), onde utilizando *Mesorhizobium loti* inoculado em *Lotus japonicus*, afirmaram que o processo de infecção gerado pelo simbiote guia seletivamente as bactérias endofíticas até o nódulo primordial, onde, no caso de serem compatíveis, se multiplicam. Essa infecção pode ser considerada algo negativo do ponto de vista econômico, uma vez que as bactérias endofíticas competem por espaço nos nódulos com as simbiontes, podendo diminuir a eficiência da fixação de nitrogênio e afetar negativamente o crescimento da planta (TERPOLILLI; HOOD; POOLE, 2012).

No entanto, há poucas informações sobre o papel dessas bactérias endofíticas nos nódulos de leguminosas, sendo que podem ser importantes ecológica e evolutivamente, especialmente quando presentes em plantas pioneiras localizadas em solos pobres quanto à presença de bactérias fixadoras de nitrogênio (ZGADZAJ et al., 2015). Além disso, mesmo que estas bactérias não fixem nitrogênio, mas uma vez que possuam outras características que as classifiquem como RPCPs, elas podem trazer diversos benefícios à hospedeira. É o caso, por exemplo, dos gêneros *Enterobacter*, *Bacillus*, *Serratia* (SHAMEER; PRASAD, 2017), *Pseudomonas* e *Agrobacterium* (SHAIENDRA SINGH, 2015).

Os estudos sobre a diversidade de rizóbios capazes de nodular feijão-fava são escassos quando comparados a outras leguminosas, como *P. vulgaris*, por exemplo (ORMEÑO-ORRILLO; DÁVILA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2015). Dessa forma, até o início da década de 90, essa espécie era considerada uma hospedeira relativamente restrita para *Bradyrhizobium* quando comparada com culturas como

feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e siratro (*Macroptilium atropurpureum*) (THIES; BOHLOOL; SINGLETON, 1991). Além de poucos, os relatos sobre a diversidade eram baseados puramente em caracteres morfofisiológicos, onde a atribuição aos *taxa Bradyrhizobium* e outros gêneros era feita baseada a partir da taxa de crescimento. Além disso, essas pesquisas focavam essencialmente no desempenho das estirpes para a produção de inoculantes (ORMEÑO-ORRILLO; DÁVILA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2015).

Ormeño-Orrillo et al. (2006) realizaram o primeiro estudo de rizóbios isolados de nódulos de feijão-fava feito a partir de uma caracterização molecular, onde fizeram o sequenciamento dos genes 16S rRNA e do gene housekeeping *dnaK* em 21 isolados, os quais foram todos atribuídos ao gênero *Bradyrhizobium*, mais especificamente à espécie *B. yuanmingense* e a um novo ramo filogenético dentro do gênero que, mais tarde, foi identificado, a partir da análise de vários genes *housekeeping*, como *B. paxllaeri* e *B. icense* (DURÁN et al., 2014). Isso reforçou a ideia de que há uma preferência da leguminosa pela associação com este gênero. Neste estudo, essa preferência foi confirmada, sendo que a maioria dos isolados retirados dos nódulos de feijão-fava foi identificada como *B. elkanii*, corroborando com outros trabalhos (VAN BERKUM; FUHRMANN, 2009).

Por outro lado, apesar de que a maioria das espécies de *Phaseolus* prefira a associação com *Bradyrhizobium*, outros gêneros de rizóbios, especialmente de crescimento rápido, têm sido identificados em feijão-fava. Dentre eles, estão representantes dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium* (MARTÍNEZ-ROMERO, 2003; EILMUS, 2009; SERVÍN-GARCIDUEÑAS et al., 2014; SANTOS et al., 2011). Este trabalho aponta *P. lunatus* como uma leguminosa promíscua, capaz de estabelecer associação em seus nódulos com uma variedade de gêneros de rizóbios, mas também com outros tipos de bactérias.

### **Filogenia com base na análise de genes *housekeeping***

No intuito de realizar uma avaliação mais precisa da posição taxonômica dos isolados, foi realizado o sequenciamento dos genes *housekeeping glnII* e *gyrB*. Somente 14 isolados tiveram a amplificação do gene *glnII* e 15, o gene *gyrB*, devido a uma provável restrição apresentada pelos *primers* utilizados neste estudo aos gêneros *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

Dos 14 isolados analisados quanto ao gene *glnII*, oito foram identificados como *Bradyrhizobium*, três como *Rhizobium*, e três como *Agrobacterium*. A amplificação do gene *gyrB* permitiu a identificação de nove *Bradyrhizobium*, quatro, *Rhizobium*, e dois, *Agrobacterium*. Os genes foram analisados isoladamente e a partir da concatenação dos seus fragmentos em treze isolados.

Como mostra a Figura 4, a árvore construída a partir das sequências do gene *gln II* formou três grandes grupos com cinco subgrupos. O primeiro reúne as estirpes de referência pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Agrobacterium*. Em GI-1 os isolados UFPI-F38 e UFPI-F55A associaram-se, assim como na árvore 16S rRNA, mas com um *bootstrap* de 100%, no entanto, permaneceram isolados das sequências de referência. Já em GI-2, os isolados UFPI-F17 e UFPI-F19, os quais tiveram a mesma taxa de identificação, associaram-se a *R. alamii* com alto *bootstrap*.

No segundo grande grupo, UFPI-F20, UFPI-F59 e UFPI-F31 permaneceram isolados. Por outro lado, UFPI-F32, UFPI-F26 e UFPI-F50 formam o subgrupo GII-1 junto com *Bradyrhizobium elkanii* com um *bootstrap* de 84%. Em relação ao terceiro grupo, formaram-se dois subgrupos, o primeiro constituído por UFPI-F03 e UFPI-F15, e o segundo por UFPI-F06 e UFPI-F16. Ambos apresentaram um *bootstrap* alto de 100% e não se associaram a nenhuma sequência referência, o que sugere a possibilidade de serem novas espécies.

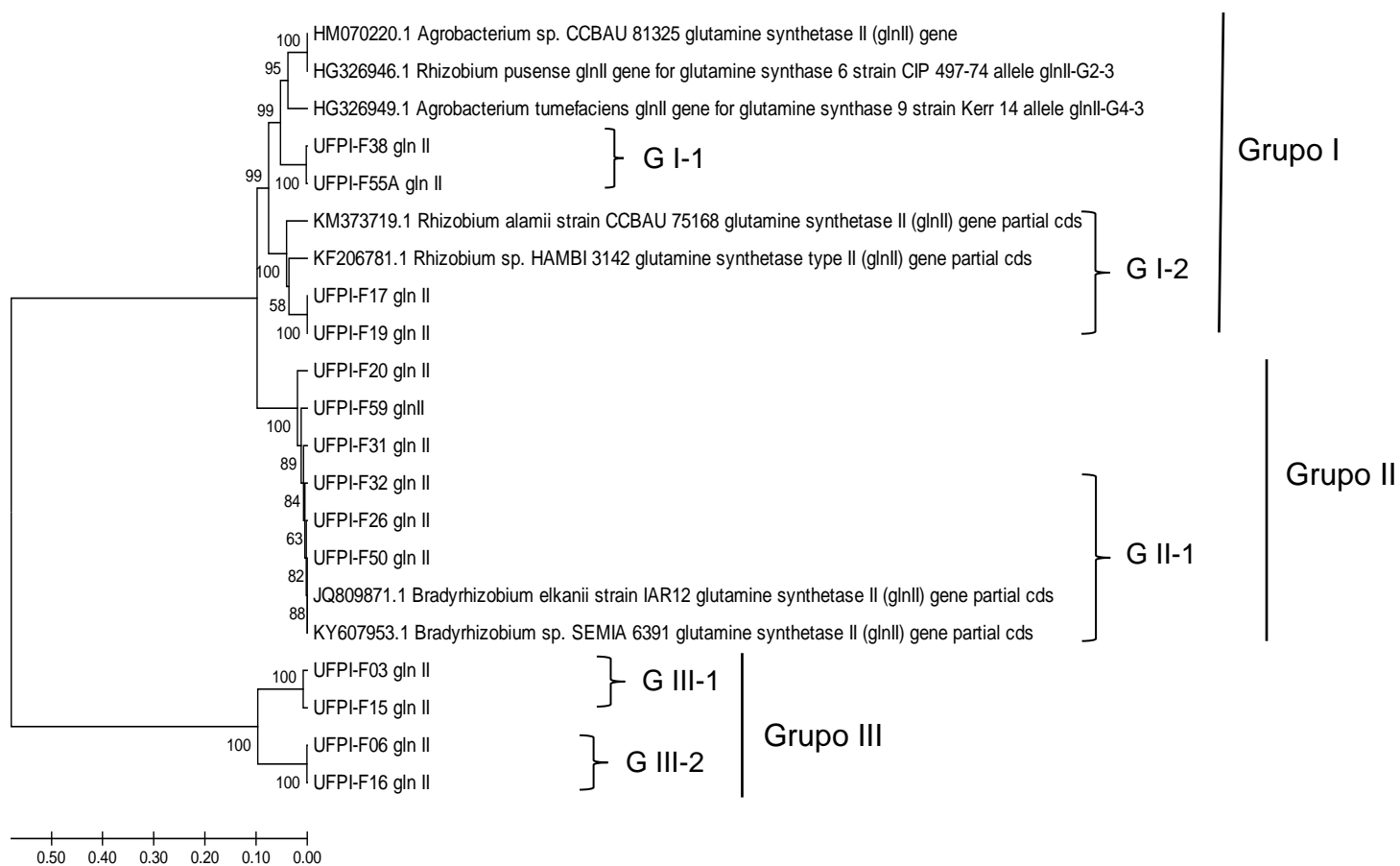
A árvore gerada pelas sequências do gene *gyrB* também formou três grupos principais, mas com cinco subgrupos (Figura 5). O primeiro e maior deles pertence ao gênero *Bradyrhizobium*. Em GI-1 estão presentes os isolados UFPI-F31, UFPI-F32, UFPI-F26, UFPI-F34, UFPI-F16 e UFPI-F50 associados a *B. elkanii*, com um *bootstrap* de 96%; já em GI-2, UFPI-F59 associou-se a *B. viridifuturi*, com *bootstrap* de 82%.

O segundo grupo reuniu representantes dos gêneros *Rhizobium* e *Agrobacterium* e apresentou UFPI-F17 e UFPI-F19 agrupados com alto *bootstrap* de forma isolada das sequências de referência, assim como na árvore *gln II*. No GII-2, agruparam-se UFPI-F40A e UFPI-F55A, com *bootstrap* de 100%. O terceiro grupo não apresenta nenhuma sequência de referência e apresenta UFPI-F06 isolado, assim como UFPI-F03 e UFPI-F15 agrupados com alto *bootstrap*, confirmando suas posições na árvore *gln II*.

Em relação a árvore formada pela concatenação dos fragmentos dos dois genes *housekeeping*, formaram-se três grupos principais, com três subgrupos (Figura 6). O primeiro reuniu sequências referências dos gêneros *Rhizobium* e *Agrobacterium*, onde UFPI-F59 permaneceu isolado das sequências referências, assim como o agrupamento de UFPI-F17 e UFPI-F19, o que indica que provavelmente são novas espécies.

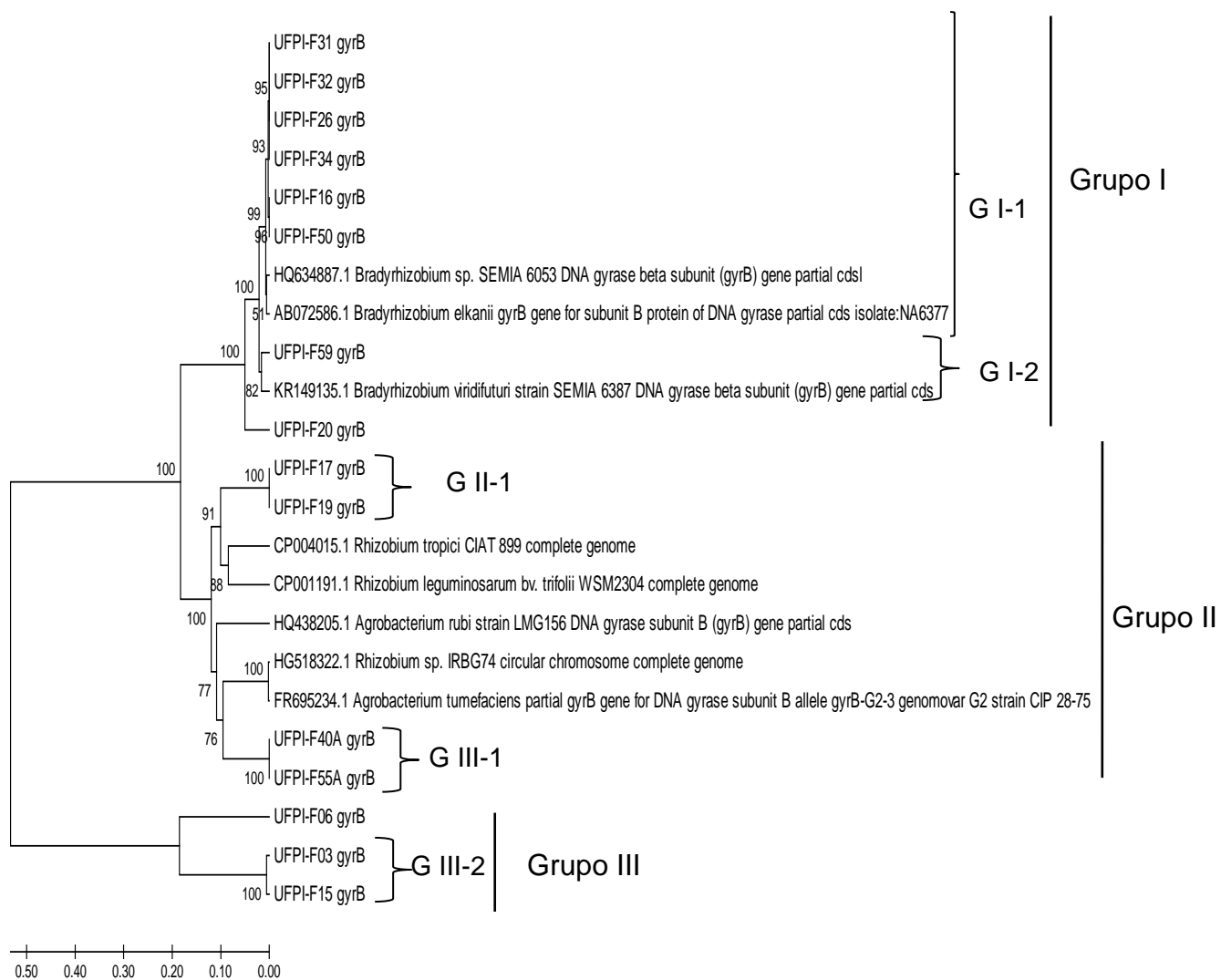
No grupo II, UFPI-F20 e UFPI-F59 permaneceram isolados e *B. elkanii* associou-se a UFPI-F26, UFPI-F50, UFPI-F31 e UFPI-F32 com um *bootstrap* de 97%, confirmado suas atribuições a esse táxon. O terceiro grupo novamente se constituiu somente possíveis novas espécies, apresentando UFPI-F16 e UFPI-F06 de forma isolada e o agrupamento com alto *bootstrap* de UFPI-F03 e UFPI-F15.

A utilização dos genes *housekeeping* é uma alternativa superior a do gene 16S rRNA, uma vez que estes possuem taxas evolutivas mais rápidas do que as dos genes ribossomais, mas com um nível suficiente de conservação para a identificação espécies, especialmente as estreitamente relacionadas, como é o caso de várias espécies de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (AZEVEDO et al., 2015). Além disso, a análise concatenada dos genes *housekeeping* pode fornecer indícios da descoberta de novas espécies (GLAESER; KÄMPFER, 2015). Dessa forma, como mostra a Figura 6, os isolados UFPI-F16, UFPI-F06, UFPI-F03, UFPI-F15, UFPI-F17 e UFPI-F19 são provavelmente novas espécies e necessitam de novos estudos para sua caracterização.

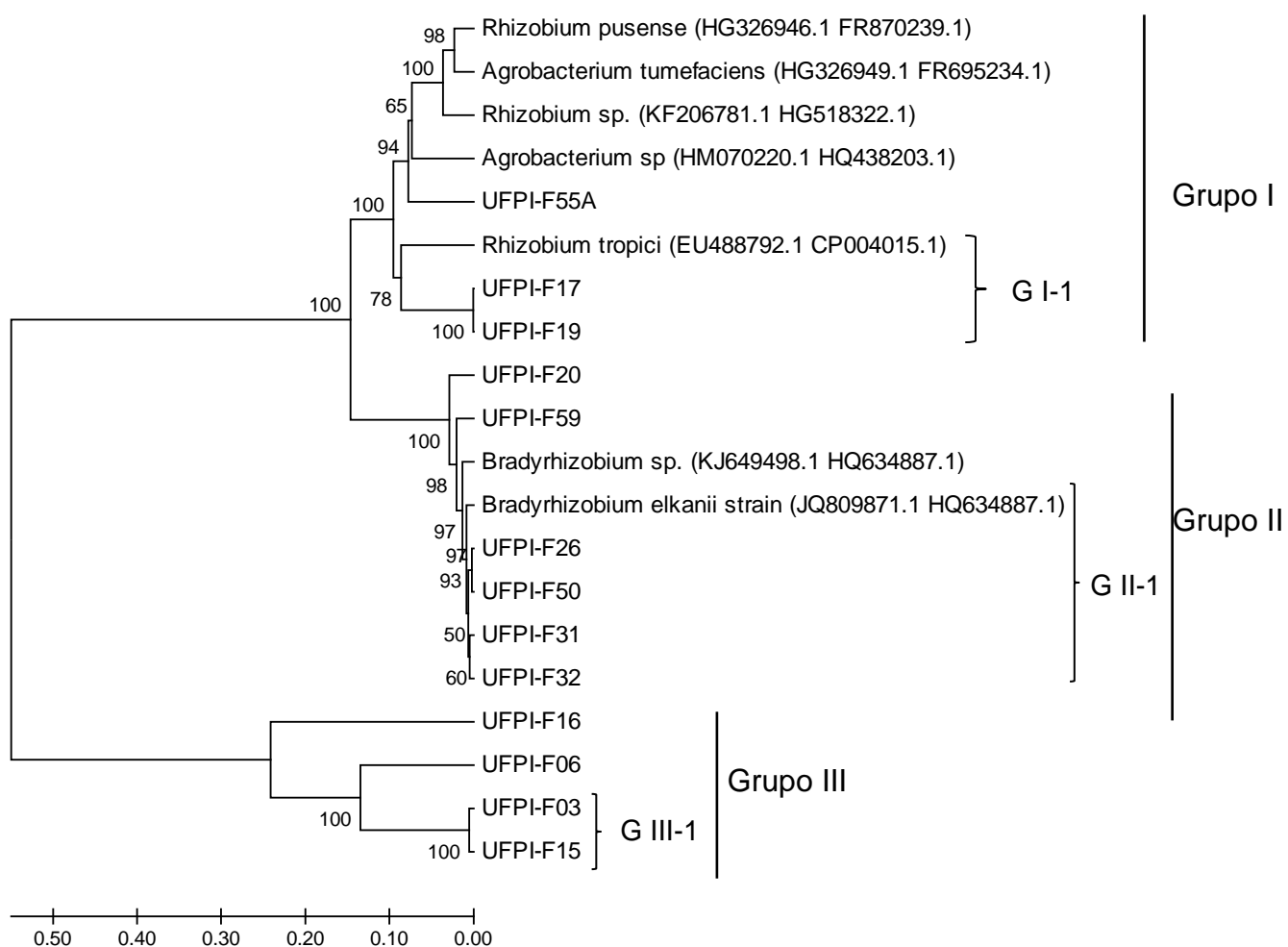


**Figura 4:** Árvore filogenética gerada a partir das sequências parciais do gene *gln II* de 14 isolados bacterianos deste estudo e de sequência de referências. A filogenia foi inferida usando o método neighbour-joining.





**Figura 5:** Árvore filogenética gerada a partir das sequências parciais do gene *gyrB* treze isolados bacterianos deste estudo e de sequência de referências. A filogenia foi inferida usando o método neighbour-joining.



**Figura 6:** Árvore filogenética gerada a partir da concatenação das sequências parciais dos genes *gyrB* e *gyrB* de quinze isolados bacterianos deste estudo e de sequência de referências. A filogenia foi inferida usando o método neighbour-joining.

## 5. Conclusões

O presente trabalho amplia as evidências da existência de uma grande diversidade de bactérias que coexistem nos nódulos de feijão-fava. Apesar de confirmar a preferência dessa leguminosa pela associação com rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*, ele mostra sua promiscuidade e indica uma variedade de outros gêneros que se abrigam nos nódulos desta leguminosa.

Dentre os gêneros encontrados, estão *Bradyrhizobium*; *Rhizobium* e *Burkholderia*, os quais são considerados em geral com indutores de nodulação e fixadores de nitrogênio, assim como representantes de gêneros de bactérias endofíticas tais como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Williamsia*, *Enterobacteriaceae*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Paenobacillus* e *Serratia*, dentre os quais muitos são considerados RPCP.

Os isolados UFPI-18, UFPI-F40B, UFPI-F53 e UFPI-F60 foram identificados como possíveis RPCPs, o que aponta a possibilidade de sua utilização como inoculante de feijão-fava. Além disso, em relação a avaliação das sequências dos genes *housekeeping* concatenadas, os isolados UFPI-F16, UFPI-F06, UFPI-F03, UFPI-F15, UFPI-F17 e UFPI-F19 são provavelmente novas espécies e necessitam de novos estudos para sua descrição.

## Referências

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- AZEVEDO, H. et al. A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. **BMC Genomics**, v. 16, n. 5, p. S10, 2015.
- COENYE, T. et al. Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3300–3307, 2002.
- DALL'AGNOL, R. F. et al. *Paraburkholderia nodosa* is the main N<sub>2</sub>-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian “Cerradão”. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 8, p. 1–14, 2016.
- ARAUJO, A. S. F. et al. Nodulation ability in different genotypes of *Phaseolus lunatus* by rhizobia from California agricultural soils. **Symbiosis**, v. 73, n. 1, p. 1–8, 2016.
- DEES, C. et al. Characterization of the Cellulose- Degrading Bacterium NCIMB 10462t Source of Microorganism. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 51, n. 51, p. 263-274, 1995.
- DURÁN, D. et al. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2072–2078, 2014.
- EILMUS, S. **Diversität und Funktionen der mit der Ameisengattung *Pseudomyrmex* (Lund, 1831) assoziierten Bakterien**. Essen: Universidade de Duisburg-Essen , p. 86-87, 2009.
- EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175–85, 1998.
- FOFANA, B. et al. Molecular evidence for an andean origin and a secondary gene pool for the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) using chloroplast DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 2, p. 202–212, 1999.
- GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 237-245, 2015.

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.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. M. **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: Embrapa, p. 542, 1994.

JACCARD, P. The distribution of the flora in the alpine zone. **New Phytologist**, v. 11, n. 2, p. 37–50, 1912.

KASCHUK, G. et al. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 32, n. 2, p. 210–220, 2006a.

KASCHUK, G. et al. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 87, n. 2, p. 205–217, 2006b.

LEITE, J. et al. Cowpea Nodules Harbor Non-rhizobial Bacterial Communities that Are Shaped by Soil Type Rather than Plant Genotype. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 2064, 2017.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of Rhizobium-Phaseolus vulgaris symbiosis: Overview and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 11–23, 2003.

MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315–332, 2006.

MENNA, P.; 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, n. 12, p. 2934–2950, 2009.

MIWA, H.; OKAZAKI, S. How effectors promote beneficial interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 148–154, 2017.

ORMEÑO-ORRILLO, E. et al. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 253–262, 2006.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; DÁVILA, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Biodiversity of

nitrogen-fixing nodule bacteria associated with lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in its domestication centers. In: LOPES, A. C. DE A.; ARAÚJO, A. S. F. DE; GOMES, R. L. F. ***Phaseolus lunatus*: diversity, growth and production**. New York: Nova Science, 2015. v. 1, n. 1, p. 91–102.

PANDAY, D.; SCHUMANN, P.; DAS, S. K. *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 2632–2639, 2011.

RENWICK., A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, n. 4, p. 524–532, 1991.

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

SANTOS, J. O. et al. Genetic diversity among native isolates of rhizobia from *Phaseolus lunatus*. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 437–444, 2011.

SAWADA, H.; KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 155–179, 2003.

SERVÍN-GARCIDUEÑAS, L. E. et al. Symbiont shift towards *Rhizobium* nodulation in a group of phylogenetically related *Phaseolus* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 79, p. 1–11, 2014.

SHAILENDRA SINGH, G. G. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, n. 2, 2015.

SHAMEER, S.; PRASAD, T. N. V. K. V. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. **Plant Growth Regulation**, v. 84, n. 3, p. 603–615, 2017.

SHAMSELDIN, A.; ABDELKHALEK, A.; SADOWSKY, M. J. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. **Symbiosis**, v. 3, n. 2, p. 91–109, 2017.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15–22, 1957.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R.; FREEMAN, W. H. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. **Systematic Zoology**, v. 24, n. 2,

p. 263, 1973.

SPIPKER, T. et al. Expanded multilocus sequence typing for Burkholderia species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2607–2610, 2009.

STĘPKOWSKI, T. et al. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7041–7052, 2005.

TERPOLILLI, J. J.; HOOD, G. A.; POOLE, P. S. What determines the efficiency of N(2)-fixing *Rhizobium*-legume symbioses?. **Advances in microbial physiology**, v. 60, p. 326-389, 2012.

THIES, J. E.; BOHLOOL, B. B.; SINGLETON, P. W. Subgroups of the Cowpea Miscellany: Symbiotic Specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1540–5, 1991.

VAN BERKUM, P.; FUHRMANN, J. J. Evidence from internally transcribed spacer sequence analysis of soybean strains that extant *Bradyrhizobium* spp. are likely the products of reticulate evolutionary events. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 1, p. 78–82, 2009.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2, p. 127-141, 2001.

VERSALOVIC; J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Cell Biology**, v. 5, n. 4, p. 25–40, 1994.

VIA, V. D.; ZANETTI, M. E.; BLANCO, F. How legumes recognize rhizobia. **Plant Signaling and Behavior**, v. 11, n. 2, p. 1559-2324, 2016.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

ZGADZAJ, R. et al. A Legume Genetic Framework Controls Infection of Nodules by Symbiotic and Endophytic Bacteria. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 6, p. 1–21, 2015.

## APÊNDICE(S)

**Tabela 2:** Primers e condições de amplificação usados em nosso estudo

Gene	Primer	Sequências	Tamanho	Condições de PCR	Referências
OX-PCR	OX-AIR	5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	–	7 min 95 °C, 35 x (1 min 94°C, 1 min 53°C, 8 min 65°C), 16 min 65°C	V ersalovic et al. (1994)
6S rRNA	D1 D1	5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3' 5' - AAGGAGGTGATCCAGCC – 3'	1 244	2 min 95 °C, 30 x (15s 94°C, 45s 93°C, 45s 55°C, 2 min 72°C), 5 min 72°C	W eisburg et al. (1991)
lnII	SglnIIr SglnIIr	5' – AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACG G -3' ” 5' – SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG – 3'	5 62	2 min 95 uC, 356(45 s 95 uC, 30 s 58 uC, 1.5 min 72 uC), 7	St ępkowski et al. (2005)



				min 72 uC	
<i>yrB</i>	yrB- BurkF  yrB- BurkR	g 5' – ACCGGTCTGCAYCACCTCGT – 3' g 5' – YTCGTTGWARCTGTCGTTCCACTGC – 3'	02	7 2 min 95 °C, 35 x (30s 94°C, 30s 58°C, 1mi n 72°C), 5 min 72°C	Sp ilker et al., (2009)

### Referências

SPIPKER, T. et al. Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2607–2610, 2009.

STĘPKOWSKI, T. et al. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7041–7052, 2005.

VERSALOVIC; J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 4, p. 25–40, 1994.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

**Tabela 3:** Resultados dos testes bioquímicos realizados em isolados bacterianos coletados em solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI, usados como fonte de inoculo em feijão-fava. Teresina, PI, 2008.

Isolados	G	A	CMC	HT- 80	SF	TC	U	P	C	TG	pH
UFPI- 1	-	-	-	-	+	1	-	-	+	-	Ne
UFPI- 3n	-	-	-	-	-	1	+	-	+	-	Ac
UFPI- 5n	-	-	-	-	-	1	-	-	+	-	Ac
UFPI- 6	+	-	-	-	-	7	-	-	+	-	Ne
UFPI- 15	-	-	-	-	-	2	+	-	-	-	Ac
UFPI- 16	-	-	-	-	-	2	+	-	-	-	Ac
UFPI- 17	+	-	-	-	-	3	-	-	-	-	Ac
UFPI- 18n	+	-	-	-	+	1	-	-	+	-	Ac
UFPI- 19	+	-	-	-	-	3	-	-	-	-	Ac
UFPI- 20	-	-	-	-	-	7	-	NR	-	-	Ne
UFPI- 21	-	-	-	-	-	4	-	-	+	-	Ne
UFPI- 24	-	-	-	-	-	2	-	-	+	-	Ac
UFPI- 24n	-	-	-	-	+	1	-	-	+	-	Ac
so 26	-	-	-	-	-	7	-	-	+	-	Ne
UFPI- 31	+	-	-	-	-	1	-	-	-	-	Ne
UFPI- 32	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	Ne
UFPI- 34	+	-	-	-	-	4	-	-	+	-	Ac
UFPI- 38	-	-	-	-	-	1	+	-	-	-	Ac
UFPI- 40A	+	-	-	-	-	1	-	+	+	-	Ac
UFPI- 40B	+	-	-	+	-	1	-	+	+	-	Ne

G = teste de gelatinase; A = teste de amilase ; CMC = teste de carboxil-metil-celulose; HT-80 = teste de hidrólise de Tween-80; SF = teste de solubilização de fosfato; TC = tempo de crescimento em dias; U = teste de urease; P = protease; C = teste de catalase; TG = teste de Gram; pH = reação Ph; Ac = ácido; Ne = neutro; NR = não realizado.

**Tabela 3:** Informações sobre as sequências dos genes utilizados neste estudo

sol ado s	Gene 16S rRNA		Gene glnII		Gene gyrB	
	Identi dade com a estirpe mais próxima	Atribui ção	Identid ade com a estirpe mais próxima	Atrib uição	Ide ntidade com a estirpe mais próxima	A tribuição
FPI- 3n	1126/1 142(99%)	<i>Rhizobi um sp</i>	552/56 0(99%)  552/56 1(98%)	Agro bacterium sp.	704 /714(99%)	R hizobium sp
UF PI- 5n	1177/1 182(99%)	<i>Pseudo monas sp</i>				
UF PI- 6	1126/1 133(99%)	<i>Bradyrh izobium sp</i>	587/59 2(99%)	Brad yrhizobium elkanii	674 /682(99%)	B radyrhiz obium sp.
FPI- 15			560/56 5(99%)	Rhiz obium pusense	709 /715(99%)	R hizobium sp.
FPI- 16			630/63 3(99%)	Brad yrhizobium elkanii	672 /683(98%)	B radyrhiz obium

						elkanii
FPI-17			529/570(93%)	Rhizobium alarii	601/715(84%)	R Rhizobium tropici CIAT
UFPI-18n	1149/156(99%)	<i>Enterobacter cloacae</i>				
FPI-19			527/568(93%)	Rhizobium alarii	600/714(84%)	R Rhizobium tropici CIAT
UFPI-20			567/585(97%)	Bradyrhizobium elkanii	625/683(92%)	B Bradyrhizobium elkanii
FPI-21	1129/132(99%)	<i>Williamisia serinedens</i>				
FPI-24	1127/141(99%)	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>				
FPI-24n						
FPI-26	1152/160(99%)	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	529/532(99%)	Bradyrhizobium elkanii	673/683(99%)	B Bradyrhizobium elkanii
UFPI-31	1139/151(99%)	<i>Bradyrhizobium sp</i>	569/578(98%)	Bradyrhizobium elkanii	673/683(99%)	B Bradyrhizobium

						elkanii
FPI-32			591/59 9(99%)	Brad yrhizobium elkanii	675 /682(99%)	B radyrhiz obium sp.
UF PI-34					675 /682(99%)	B radyrhiz obium sp.
FPI-38	1134/1 144(99%)	<i>Agroba cterium</i> sp.	524/57 6(91%)	Agro bacterium tumefaciens		
FPI-40A					574 /697(82%)  568 /686(83%)	R hizobium legumin osarum bv. trifolii  A grobacte rium rubi
FPI-40B	1148/1 151(99%)	<i>Pseudo monas fluorescens</i>				
FPI-47A						
FPI-47B	1137/1 145(99%)	<i>Bacillus pumilus</i>				
FPI-50			549/54 9(100%)	Brad yrhizobium elkanii	672 /680(99%)	B radyrhiz obium

						sp.
FPI-51n	1151/1 153(99%)	<i>Pseudomonas putida</i>				
FPI-52n						
FPI-53n	1129/1 133(99%)	<i>Burkholderia gladioli</i>				
FPI-54n	1144/1 147(99%)	<i>Bacillus aryabhatai</i>				
FPI-55An	1023/1 031(99%)	<i>Rhizobium</i> sp.	528/58 0(91%)  522/57 9(90%)	Agrobacterium tumefaciens  Rhizobium pusense	565 /682(83%)	A grobacterium rubi
FPI-55Bn	1156/1 159(99%)	<i>Bacillus megaterium</i>				
FPI-55Cn	1150/1 152(99%)	<i>Burkholderia</i> sp.				
FPI-56n						
FPI-	1148/1 149(99%)	<i>Bacillus aryabhatai</i>				

57A n						
FPI- 57B n	1149/1 149(100%)	<i>Bacillus aryabhatai</i>				
FPI- 57C n	1118/1 128(99%)	<i>Paeniba cillus sp.</i>				
FPI- 59n	1139/1 141(99%)	<i>Bradyrh izobium sp.</i>	591/60 2(98%)	Brad yrhizobium elkanii	653 /673(97%)	B radyrhiz obium viridifutu ri
FPI- 60	1154/1 156(99%)	<i>Serratia marcescens</i>				
FPI- 61	1144/1 146(99%)	<i>Paeniba cillus sp.</i>				