

FABRÍCIO CÉSAR HELENO SANTOS

**A RELAÇÃO EVOLUTIVA DOS GENES ASSOCIADOS À
FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO**

MOGI DAS CRUZES

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

FABRÍCIO CÉSAR HELENO SANTOS

**A RELAÇÃO EVOLUTIVA DOS GENES ASSOCIADOS À
FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes como requerimento parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

Biotecnologia aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios

MOGI DAS CRUZES

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Santos, Fabrício César Heleno

A relação evolutiva dos genes associados a fixação de nitrogênio / Fabrício César Heleno Santos. -- 2007.

84 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2007

Área de concentração: Biotecnologia aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios

Orientador: Prof. Dr. Welington Luís de Araújo

1. Filogenia molecular 2. *Gene nif*. 3. Transferência gênica horizontal 4. Bactérias diazotróficas I. Título II. Araújo, Welington Luís de

CDD 579.138

“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que nos deu a vida e permite que façamos dela nossas grandes obras. Dedico também a meus pais que juntamente com Deus, me deram a vida e a razão de viver. “A Luana, minha esposa, que mesmo nos piores momentos, sempre esteve do meu lado”

“Nada em biologia faz sentido a não ser a luz da evolução”

Theodosius Dobzhansky

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

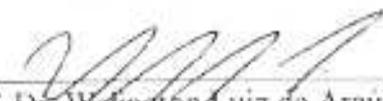
Às treze horas do dia trinta de novembro de dois mil e sete, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "A RELAÇÃO EVOLUTIVA DOS GENES ASSOCIADOS À FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Fabrizio Cesar Heleno Santos**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Wellington Luiz de Araújo e Vitor Fernandes Oliveira de Miranda da Universidade de Mogi das Cruzes e Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner da Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO por UNANIMIDADE
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/majoria)

Mogi das Cruzes, 30 de novembro de 2007

Comissão Examinadora

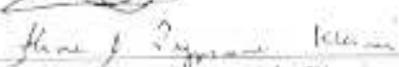
Julgamento


Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo

APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))


Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))


Prof. Dr. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Welington Luis de Araújo pela confiança depositada em mim, pela oportunidade de realizar esse trabalho e principalmente pela orientação e amizade, que vem desde 2006 quando sem orientador, este me acolheu.

Ao Prof. Dr. Vitor Miranda pelas significativas contribuições na realização deste.

Ao Colegiado do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes.

À Secretária de Estado da Educação de São Paulo pelo auxílio financeiro através do Projeto Bolsa Mestrado.

Ao meu pai Geraldo Medeiros Santos, à minha mãe Elizete Terzinha Heleno Santos e à minha irmã Adria Cristina Heleno Santos pelo incentivo, amor e atenção dedicados em todos os momentos. Mesmo não podendo estar com vocês todos os dias, tudo o que fiz foi por vocês.

Especial agradecimento à Luana, minha esposa pelo amor dedicado a mim e por acreditar que eu era capaz.

À Julinha, meu tesouro, por todos os momentos em que não brincar como pai para me dedicar ao curso.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE VIDA LIVRE.....	14
1.2 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS.....	15
1.2.1 ENDÓFITOS FACULTATIVOS.....	15
1.2.2 ENDÓFITOS OBRIGATÓRIOS.....	16
1.3 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SIMBIÓTICAS.....	17
1.4 GENES ENVOLVIDOS NA FBN.....	21
1.5 IMPORTÂNCIA DA FILOGENIA NO ESTUDO DA DIVERSIDADE.....	24
1.6 O RNA RIBOSSÔMICO COMO MARCADOR FILOGENÉTICO.....	25
1.7 TRANSFERÊNCIA GÊNICA HORIZONTAL.....	29
1.8 TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL ENTRE MICRORGANISMOS.....	32
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	35
3.1 SEQUÊNCIAS E ESPÉCIES ANALISADAS.....	35
3.2 ANÁLISE DE DADOS.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5. CONCLUSÕES.....	64
6. REFERÊNCIAS.....	66
7. ANEXOS.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produtos codificados pelos genes nif e suas funções na FBN.....	22
Tabela 2 – Classificação dos táxons contendo o gene nifH.....	38
Tabela 3 - Classificação dos táxons contendo o gene nifD.....	43
Tabela 4 – Classificação dos táxons contendo o gene nifK.....	46

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo da reação de fixação do nitrogênio, mediada pela enzima <i>nitrogenase</i>	23
Figura 2. Modelo da estrutura secundária do 16S e 18S.....	28
Figura 3. Árvore filogenética <i>consenso estrito</i> do gene 16S rRNA de <i>bactérias diazotróficas</i> portadoras do gene <i>nifK</i> (\approx 1500 nucleotídeos).....	58
Figura 4. Árvore filogenética <i>consenso estrito</i> de <i>bactérias diazotróficas</i> portadoras do gene <i>nifK</i> (\approx 1400 nucleotídeos).....	59
Figura 5. Árvore filogenética <i>consenso estrito</i> do gene 16S rRNA de <i>bactérias diazotróficas</i> portadoras do gene <i>nifD</i> (\approx 1500 nucleotídeos).....	60
Figura 6. Árvore filogenética <i>consenso estrito</i> de <i>bactérias diazotróficas</i> portadoras do gene <i>nifD</i> (\approx 1050 nucleotídeos).....	61
Figura 7. Árvore filogenética <i>consenso estrito</i> do gene 16S rRNA de <i>bactérias diazotróficas</i> portadoras do gene <i>nifH</i> (\approx 1500 nucleotídeos).....	62
Figura 8. Árvore filogenética <i>consenso estrito</i> de <i>bactérias diazotróficas</i> portadoras do gene <i>nifH</i> (\approx 380 nucleotídeos).....	63

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio é um processo complexo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados genes *nif*. Os genes *nif* codificam para proteínas envolvidas diretamente no processo de FBN. A descoberta dos 20 genes envolvidos na FBN foi proveniente do estudo da genética desse processo em *Klebsiella pneumoniae*. Nesse microrganismo, os genes *nif* encontram-se organizados em 7-9 *operons*, ocupando uma região de aproximadamente, 24 kb entre genes *shiA* e *hisD*. Os genes *nifHDK* codificam as proteínas estruturais do complexo enzimático denominado *Nitrogenase*, caracterizado pela presença de duas metalo-proteínas, a Fe-proteína (ou componente II) e a MoFe-proteína (ou componente I). A construção de mutantes *nif* de *K. pneumoniae* permitiu identificar o produto e a função de diversos genes *nif*, sendo que dos 20 genes envolvidos, 14 têm sido encontrados na maioria das *bactérias diazotróficas* estudadas. Tem sido observado que bactérias fixadoras de nitrogênio, independente do grupo filogenético (*Actinobacteria*, *Firmicutes* ou *Proteobacteria*) apresentam uma regulação semelhante dos mesmos genes envolvidos com a FBN, sugerindo uma origem comum ou a ocorrência de transferência horizontal. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi por meio de uma análise *in silico*, avaliar a filogenia de diferentes grupos fixadores de nitrogênio com base na seqüência do *16S rRNA* e de genes envolvidos na FBN. As seqüências dos genes *nif* foram obtidas a partir do *GenBank*, por meio do *National Center for Biotechnology Information*, alinhadas com o programa *CLUSTAL X* e editada no *BioEdit*. Posteriormente, árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se do programa *PAUP 4.0* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods), e visualizadas no programa *TreeView*. Para tanto foram utilizados na pesquisa os genes *nifD*, *nifH* e *nifK*. A avaliação *in silico* da similaridade genética dos genes envolvidos na FBN obtidos de diferentes espécies bacterianas e da filogenia de *bactérias diazotróficas* baseadas na seqüência do gene *16S rDNA* e de genes envolvidos com a FBN permitiu observar que para alguns grupos não ocorre similaridade entre a árvore filogenética construída por meio do *16S rRNA* e dos genes *nif*, indicando que para alguns casos, pode ter ocorrido transferência horizontal entre espécies de grupos taxonômicos diferentes. Os dados indicam que pode ter ocorrido transferência horizontal dos genes *nif* no processo evolutivo envolvendo gêneros de *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*, seguida da análise dos genes *nifD*, *nifH* e *nifK*.

Palavra-chave: gene *nif*; transferência horizontal; bactérias diazotróficas.

ABSTRACT

The biological fixing of nitrogen is a complicated process which requires the expression of a number of genes called *nif* genes. The *nif* genes code for proteins involved directly into the *fbn* process. The discovery of 20 genes involved in *FBN* came from genetics study of this process in *Klebsiella pneumoniae*. In this microorganism the *nif* genes are organized in 7-9 operons, taking an area of about 24kb between *shiA* e *hisD*. The *nifHDK* genes code for the structural proteins of the enzymatic complex called *Nitrogenase*, characterized for the presence of the two metallo-proteins – the Fe-protein (or component II) and MoFe-protein (or component I). The elaboration of the *nif* mutants of *K. pneumoniae* allow identify the product and function of a sort of *nif* genes, counting that 14 of the 20 involved genes have been found in the most of a *diazotrophic bacteria* studied. It's been observed that the fixing bacteria of nitrogen, instead of phylogenetic group (*Actinobacteria*, *Firmicutes* or *Proteobacteria*) shows a regulation similar to the same involved genes with *fbn*, suggesting a common origin or the horizontal transfer. This, the aim of this work, throughout *in silico* analysis to value the figure of the different groups of nitrogen fixers basing on *16S rRNA* sequence and *FBN* involved genes. The *nif* sequences were get from *GenBank* through *National Center for Biotechnology Information*, in line with *CLUSTAL X* program published in *BioEdit*. After that phylogenetic trees were build throughout *PAUP 4.0* program (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony* and other methods), and it was possible to see it through *Treeview* program. For that, the *nifD*, *nifH* and *nifK* were used. The evaluation *in silico* of the genetic similitude of the involved genes in *FBN* get from different species of *Bacteria* and of phylogenie of *bacteria diazotrophic*s based on *16S rDNA* genes sequence and *FBN* genes allow to observe that, for some groups, the similitude does not occurs between the phylogenetic tree build through *16S rDNA* and the *nif* genes showing in some cases, that a horizontal transfer might be occurred between different taxonomic groups. The data indicate that a horizontal transfer might be happened from *nif* genes in the evolution process taking sorts of *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*, followed by the *nifD*, *nifH*, *nifK* analysis of genes.

Key-words: gene *nif*; horizontal transfer; bacteria diazotrophic.

1. INTRODUÇÃO

Com a exceção da água, o nitrogênio (N) é considerado o nutriente mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente natural (FRANCO & DÖBEREINER, 1994). Além do carbono (C) e hidrogênio (H), o N é o nutriente mais abundante na matéria viva, participando na composição de moléculas de ácidos nucléicos, proteínas e polissacarídeos entre outras. Entretanto, apesar de ser requerido em quantidades significativas pelos seres vivos, na natureza este elemento é encontrado em abundância em uma forma quimicamente muito estável devido à presença da tripla ligação entre os dois átomos que formam a molécula e, portanto sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos é limitada, requerendo sua transformação para uma forma combinada que facilite sua assimilação (SPRENT & SPRENT, 1990; EVANS & BURRIS, 1992).

Apenas uma porção dos organismos do grupo dos procariotos consegue converter ou reduzir enzimaticamente o N_2 da atmosfera em amônia, o qual pode ser incorporado para o crescimento e manutenção das células. Tais microrganismos absorvem o N_2 que passa a fazer parte de substâncias orgânicas de suas células. Quando morrem, estas bactérias liberam nitrogênio no ambiente sob a forma de amônia (NH_3), a qual pode ser utilizada pelas plantas, ou processada por as bactérias nitrificantes as quais liberam no solo nitratos (NO_3^-) como produto de sua atividade metabólica. Os nitratos compõem a forma de nitrogênio que melhor é assimilado pelas plantas.

Estes organismos são denominados diazotróficos e o mecanismo responsável pela incorporação de N à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Portanto, a FBN é o processo pelo qual a maior parte do nitrogênio atmosférico é incorporado à matéria viva. Este processo constitui a principal via de incorporação de N ao ecossistema, que constantemente é reciclado para a atmosfera principalmente pela ação de organismos decompositores de matéria orgânica do solo. Dessa forma, a ação de microrganismos fixadores de nitrogênio e denitrificadores garantem um reservatório inesgotável de nitrogênio na atmosfera. Além de garantir um ecossistema em equilíbrio, a redução na aplicação de doses excessivas de compostos nitrogenados, como, por exemplo, o nitrato, que contamina

as águas e os vegetais consumidos pelo homem, possibilita o desenvolvimento de uma agricultura menos agressiva ao ambiente. A estimativa é de que a contribuição de nitrogênio fixado biologicamente varia de 139 a 170.10⁶ toneladas de nitrogênio por ano, pelo menos o dobro da fixação química (PEOPLES & CRASWELL, 1992).

Dentre os organismos que fixam nitrogênio (ou diazotróficos) muitos são heterótrofos, necessitando de um suplemento de carbono reduzido, o que depende indiretamente da energia da luz e em geral requer uma simbiose com um hospedeiro eucarioto; ou são de vida livre, competindo com outros microrganismos pela matéria orgânica disponível no ambiente. Outros são autótrofos, os quais podem reduzir o CO₂ em presença da luz (SPRENT & SPRENT, 1990; BAKER & MULLIN, 1992).

Em geral, já foram descritas espécies representantes de vários grupos de procariotos que fixam nitrogênio, tais como: bactérias fotossintéticas (ex.: *Rhodospirillum rubrum*), bactérias anaeróbicas (ex.: *Clostridium* spp.), microaeróbicas (ex.: *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Acetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus* spp., *Burkholderia* spp., etc), bactérias aeróbicas (ex.: *Azotobacter* spp. e *Derxia* spp.) e também alguns representantes das cianobactérias (algas verdes-azuladas) e actinomicetos (SPRENT & SPRENT, 1990).

Segundo EVANS & BURRIS (1992), existem pelo menos três grupos de bactérias fixadoras de N₂: a) bactérias diazotróficas de vida livre, que fixam o N₂ para seu próprio uso; b) bactérias diazotróficas associativas, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose e c) as diazotróficas simbióticas, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

BURNES & HARDY propuserem (1975), que apesar de os microrganismos diazotróficos apresentarem um amplo espectro de habitats, sendo encontrados livremente no ambiente e em associação (simbiótica ou não) com plantas, todos utilizam uma maquinaria bioquímica básica para a fixação de N₂, baseada na enzima nitrogenase (N-ase).

1.1 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE VIDA LIVRE

Com a exceção das bactérias fotossintéticas e cianobactérias que fixam N_2 , a maioria das bactérias diazotróficas de vida livre são heterotróficas requerendo ecossistemas capazes de prover uma fonte de carbono utilizável, necessário para a fixação de N_2 .

As bactérias diazotróficas de vida livre colonizam preferencialmente o rizoplane e a rizosfera de plantas, em que os exudados, principalmente açúcares, estão envolvidos nesta associação, pois as bactérias são encontradas principalmente em áreas onde estes compostos são liberados (DÖBEREINER & ALVAHYDO, 1959). O gênero *Beijerinckia*, representante desse grupo, são aeróbicos, quimioheterotróficos, podendo crescer em solos ácidos (pH 3,0 e 4,0) demonstraram o seu potencial na associação com gramíneas (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958; DÖBEREINER, 1959).

Segundo BALDANI *et al.* (1997) a atual função das bactérias de vida livre na associação com as gramíneas é uma questão que ainda requer esclarecimento. Entretanto, somente em um caso, há uma forte evidência de que um diazotrofo de vida livre, *Azotobacter paspali*, contribua para a acumulação de nitrogênio na planta. Os resultados de BODDEY *et al.* (1983) revelaram, por meio da técnica de diluição isotópica de ^{15}N , que em *Paspalum notatum* cv. batatais cerca de 20 kg de N acumulado $ha^{-1} \cdot ano^{-1}$ foi derivado da FBN, devido a associação muito específica desta gramínea com o diazotrofo rizosférico *A. paspali* (DÖBEREINER, 1966).

1.2 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS

Dentro deste grupo pode-se dividir as bactérias diazotróficas em dois grupos de acordo com a proposição de BALDANI *et al.* (1997a): endofíticos facultativos (podem colonizar tanto a rizosfera como o interior das raízes) e os endofíticos obrigatórios (colonizam o interior das raízes).

1.2.1 ENDÓFITOS FACULTATIVOS

A redescoberta do gênero *Azospirillum* (grupo predominante nos endófitos facultativos) por DÖBEREINER & DAY (1975), levou cientistas a intensificarem seus interesses na associação dos diazotróficos com as gramíneas (DÖBEREINER & BALDANI, 1982). Este diazotrófico de ampla distribuição pode ser considerada uma bactéria universal encontrada colonizando plantas crescidas em diferentes habitats (DÖBEREINER *et al.*, 1976; DÖBEREINER & PEDROSA, 1987). Estirpes têm sido encontradas em associação com plantas monocotiledôneas, incluindo milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo, gramíneas forrageiras como *Digitaria* e erva “kallar” (DÖBEREINER *et al.*, 1976; HAAHTELA *et al.*, 1981; REINHOLD *et al.*, 1986; RENNIE, 1980; WONG & STEMBERG, 1979) e com as dicotiledôneas (RAO & VANKATESWARTU, 1982). O gênero foi definido por TARRAND *et al.* (1978) e hoje compreende seis espécies, caracterizadas com base fenotípica, análise do DNA:DNA e sequência do 16S *rDNA*: *A. brasilense* e *A. lipoferum* (TARRAND *et al.*, 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989) e *A. largomobile* (DEKHIL *et al.*, 1997).

Segundo BALDANI *et al.* (1997a), embora várias características ecológicas e fisiológicas estejam sendo desvendadas, ainda falta conhecimento sobre o mecanismo envolvido na interação bactéria-planta e como ele contribui para o nitrogênio acumulado nas plantas. Apesar das diferentes formas de interação, estes diazotróficos, quando estão em associação com gramíneas, garantem aumentos de 5 a 30% na produção (BALDANI *et al.*, 1983; OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

1.2.2 ENDÓFITOS OBRIGATÓRIOS

Entre os diazotróficos endofíticos obrigatórios estão: *Burkholderia* spp. (YABUUCHI *et al.*, 1992; BALDANI *et al.*, 1997b), *Acetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988), *Azoarcus* spp. (REINHOLD-HUREK *et al.*, 1993), *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986) e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI, 1996; GILLIS *et al.*, 1991; BALDANI *et al.*, 1996), até

então considerado um leve patógeno em algumas variedades de cana-de-açúcar, mas que não afeta as variedades comerciais brasileiras (PIMENTEL *et al.*, 1991).

Esses diazotróficos, descobertos na década de 1980, parecem ser a chave para explicar a contribuição mais eficiente das associações endofíticas de fixação de N₂, especialmente nos trópicos, quando comparada às associações rizosféricas (DÖBEREINER, 1995; DÖBEREINER *et al.*, 1995). Além destas, outros diazotrófico de caráter anaeróbico são capazes de colonizar a endorizosfera e vasos do xilema, como *Alcaligenes faecalis* em arroz (YOU & ZHOU, 1989) e *Pantoea agglomerans* em aveia (RUPPEL *et al.*, 1992), além de *Bacillus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Erwinia* sp., *Enterobacter* sp. e vários outros diazotróficos (DI FIORE & DEL GALLO, 1995; MCINROY & KLOPPER, 1995; PALUS *et al.*, 1996; STOLTZFUS *et al.*, 1997), mas de acordo com DÖBEREINER & PEDROSA (1987), os diazotróficos anaeróbios apresentam baixa capacidade de conversão da energia a partir de fontes de carbono. Assim, os benefícios dessa associação parecem ser limitados pela disponibilidade de substratos orgânicos.

A descoberta de diazotróficos endofíticos, que colonizam em números elevados as raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar e outras gramíneas, mudou completamente o conceito de associações rizosféricas. Esta descoberta permitiu explicar o grande potencial da contribuição dos diazotrofos para o suprimento de nitrogênio às culturas de cana-de-açúcar, pois em certas variedades dessa planta, a fixação de nitrogênio por estas bactérias pode ser suficiente para suprir três vezes a média atual da produtividade brasileira, desde que os demais nutrientes e água não sejam fatores limitantes (FRANCO & DÖBEREINER, 1994).

Herbaspirillum seropedicae, tem sido isolada de muitas gramíneas, tais como milho, sorgo, arroz, cana-de-açúcar e de várias plantas forrageiras crescidas no Brasil (BALDANI *et al.*, 1986), sendo isolada de outras plantas não-leguminosas, como o dendê, encontrada no interior de raízes e caules dessas plantas (DÖBEREINER *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 1995).

O gênero *Azoarcus* inclui as espécies *A. indigenis*, *A. communis*, *A. tolulyticus*, *A. evansii* e alguns poucos isolados que, por divergirem destas espécies, são chamados *Azoarcus* sp., tendo sido todos isolados de raízes de erva "k allar" (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) crescidas em solos salinos do Paquistão (REINHOLD-HUREK *et al.*, 1990; REINHOLD-HUREK *et al.*, 1993; ANDERS *et al.*, 1995; ZHOU *et al.*, 1995). Enzimas como celulasas, exoglucanase e uma

endoglucanase, sempre detectadas em *Azoarcus*, podem contribuir para o processo de infecção deste endófito obrigatório dentro da planta (HUREK & REINHOLD-HUREK, 1994; REINHOLD-HUREK *et al.*, 1994).

1.3 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS SIMBIÓTICAS

A capacidade de fixar N_2 simbioticamente é encontrada em vários grupos de microrganismos e, em alguns casos, observa-se a formação de estruturas diferenciadas em relação ao rizóbio, durante a sua associação com leguminosas, sendo observadas estruturas chamadas nódulos. Esses microrganismos são tipicamente hábeis para invadir as raízes de plantas leguminosas de zonas temperadas e tropicais, fazendo com que ocorra a formação do nódulo, nos quais o rizóbio está normalmente envolvido na fixação do N_2 atmosférico dentro de uma forma combinada (amônia), que pode ser utilizado pela planta hospedeira. Atualmente, são conhecidos cinco gêneros de diazotróficos da família *Rhizobiaceae*: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium* (DREYFUS *et al.*, 1988; DE LAJUDIE *et al.*, 1994; MARTINEZ-ROMERO & CABALLERO-MELLADO, 1996; JARVIS *et al.*, 1997; LAJUDIE *et al.*, 1998).

Segundo FRANCO & DÖBEREINER (1994), as leguminosas se prestam aos mais diversos usos, sendo que a maioria das espécies de importância econômica é capaz de nodular e fixar N_2 atmosférico em condições mínimas de nitrogênio. A taxa de fixação varia com a espécie, mas é geralmente limitada pelas condições abióticas do solo, como: a acidez do solo (WOLFF *et al.*, 1991; ANYANGO *et al.*, 1995), o tipo de solo, textura e composição (HEIJNEN *et al.*, 1993), temperatura e umidade (WOLFF *et al.*, 1991; HUNGRIA *et al.*, 1993) e metais pesados (HIRSCH *et al.*, 1993). Entretanto, em condições favoráveis, inoculando com o rizóbio específico, corrigindo deficiências dos demais nutrientes e promovendo adequação abiótica da espécie, altas taxas de fixação podem ser obtidas.

Os rizóbios podem ser isolados dos nódulos, mas não são facilmente identificados quando isolados do solo (ELKAN & BUNN, 1992). Tradicionalmente, se tem dividido os rizóbios em grupos, de acordo com a velocidade de crescimento,

como primeiro sugerido por LONIS & HANSEN (1921), os de crescimento rápido (*Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*), crescimento intermediário (*Mesorhizobium*) e crescimento lento (*Bradyrhizobium*).

As bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* são aeróbicas, gram-negativas, móveis, temperatura ótima de crescimento entre 25-30°C e pH 6-7. Algumas estirpes, porém, podem crescer em extremos de temperatura (4-42,5°C) e pH (4,5-9,5). São quimiorganotróficas, utilizando uma série de carboidratos e sais de ácidos orgânicos como fontes de carbono, sem a formação de gás. Celulose e amido não são utilizados. As espécies pertencentes a este gênero são *R. leguminosarum* (JORDAN, 1984), *R. galegae* (LINDSTROM, 1989), *R. tropici* (MARTINEZ-ROMERO *et al.*, 1991), *R. etli* (SEGOVIA *et al.*, 1993), *R. gallicum* e *R. giardinii* (AMARGER *et al.*, 1997) e *R. hainanense* (CHEN *et al.*, 1997).

O gênero *Bradyrhizobium* possui características semelhantes ao gênero *Rhizobium* diferindo nos seguintes aspectos: a reação que ocorre em meio contendo sais minerais e manitol é alcalina e, algumas estirpes podem crescer quimiolitotroficamente na presença de H₂, CO₂ e baixos níveis de O₂ (JORDAN, 1984). Arabinose tem sido a fonte de carbono preferida para muitas estirpes (ELKAN & KUYKENDALL, 1981). Este gênero possui três espécies: *B. japonicum* (JORDAN, 1982), *B. elkanii* (KUYKENDALL *et al.*, 1992) e *B. lianinense* (XU *et al.*, 1995), todos nodulando *Glycine*. Há ocorrência de nodulação em uma planta não-leguminosa denominada *Parasponia*, membro da família *Ulmaceae*, com o gênero *Bradyrhizobium* (TRINICK, 1979; TRINICK, 1989).

O gênero *Azorhizobium* compreende apenas uma espécie *Azorhizobium caulinodans*, capaz de nodular a raiz e caule de *Sesbania rostrata* (DREYFUS & DOMMARGUES, 1981). Ao contrário de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, este gênero não assimila açúcares (exceto glicose). Pode fixar nitrogênio no estado de vida livre. As células são gram-negativas, móveis e fixam nitrogênio atmosférico sob condições microaeróbicas, requerendo ácido nicotínico para esta fixação.

O gênero *Mesorhizobium* possui estirpes gram-negativas, aeróbicas e móveis (apresentam flagelo). Todas as espécies assimilam glicose, raminose e sacarose metabolizando-os em produtos ácidos. O pH ideal para crescimento está entre 4,0 e 10,0 e temperatura entre 37° a 40° C. Até o present e momento foram descritas as espécies *M. loti* (nodulando *Lotus*), *M. huakuii* (nodulando *Astragalus sinicus*), *M. ciceri* e *M. mediterraneum* (nodulando *Cicer arietinum*), *M. tianshanense* (JARVIS *et*

al., 1997; LINDSTRÖM, *et al.*, 1995; YOUNG & HAUKKA, 1996), *M. amorphi* (nodulando *Amorpha* sp.) (LINDSTROM *et al.*, 1998) e *M. plurifarum* (nodulando *Cicer*) (LINDSTROM *et al.*, 1998).

No gênero *Sinorhizobium* as células usualmente contém grânulos de poli-b-hidroxitirato, são gram-negativas, aeróbicas e móveis. A temperatura ótima de crescimento varia entre 25° e 30°C, mas muitas estirpes crescem a 35°C e outras a 10°C, o pH ótimo está entre 6 e 8, porém algumas estirpes crescem em pH 5 e outras em pH 10,5. As bactérias são quimiorganotróficas, utilizando uma série de carboidratos (mas não celulose e amido) e sais de ácidos orgânicos como fonte de carbono. Cloreto de amônio e nitrato ao invés de aminoácidos são preferidos como fonte de nitrogênio, mas algumas estirpes utilizam certos aminoácidos. O gênero possui as seguintes espécies: *S. meliloti* (nodulando *Medicago*), *S. fredii* (*Glycine*), *S. saheli*, *Teranga* (*Acacia*) (CHEN *et al.*, 1988; DE LAJUDIE *et al.*, 1994) e *S. medicae* (nodulando *Medicago polymorpha*) (BRUNELL *et al.*, 1998).

O novo gênero *Allorhizobium* está representado pela espécie *Allorhizobium undicola*, bactéria fixadora de nitrogênio capaz de formar nódulos no caule de *Neptunia natans*, uma leguminosa tropical de ocorrência no Senegal (LAJUDIE *et al.*, 1998). Foi demonstrado que este grupo é fenotipicamente e filogeneticamente separado das espécies descritas anteriormente, sendo o táxon mais próximo, *Agrobacterium vitis*, com 96,2% de homologia, deduzido pelo sequenciamento do gene 16S *rRNA*. As células são gram-negativas, aeróbicas e móveis, quimiorganotróficas e utiliza uma série de ácidos orgânicos e aminoácidos como fonte de carbono para crescimento.

Além dos rizóbios, bactérias pertencentes ao gênero *Frankia* sp., também fazem simbiose com diversas plantas. Essas bactérias são aeróbicas ou microaerofílicas, gram-positivas, embora as células mais velhas podem ser gram variável, pertencendo à ordem *Actinomycetales*, uma ordem de bactérias filamentosas, sendo a simbiose chamada de actinorriza. As principais plantas que participam da simbiose com *Frankia* são do gênero *Alnus*, *Casuarina* e *Elaeagnus*. Há uma grande diversidade de plantas noduladas por *Frankia* incluindo mais de 200 espécies distribuídas em 24 gêneros de oito famílias (STACEY *et al.*, 1992; KUSS-DANELL, 1997). O processo de infecção por *Frankia* inicia como uma relação simbiótica com a planta hospedeira podendo ser de dois tipos, infecção de raízes e infecção via penetração intercelular, sendo estes modos análogos aos observados

nos legumes simbióticos (MILLER & BAKER, 1986; SPRENT, 1989). Ao contrário dos nódulos dos legumes que são limitados por oxigênio, nódulos actinorrizais mostram máxima velocidade de fixação de nitrogênio em níveis atmosféricos de oxigênio (GAUTHIER *et al.*, 1981).

Outra simbiose de grande importância é a que ocorre entre as cianobactéria e várias plantas. Elas são procariotos gram-negativos, que fazem fotossíntese com aspectos muito similares às plantas superiores. Possuem células especializadas em fixar nitrogênio, os heterocistos, pois a cianobactéria faz na mesma célula a fotossíntese (processo oxigênico) e a fixação de nitrogênio (processo sensível ao oxigênio). No caso de simbiose entre cianobactérias e plantas podemos citar como plantas hospedeiras às angiospermas (gênero *Gunnera*), gimnospermas (*Cycadaceae*), pteridófitas (*Azolla*), briófitas (gênero *Anthoceros*, *Blasia*, *Cavicularia* e *Sphagnum*), sendo que a maior parte das associações é de espécies dos gêneros *Nostoc* e *Anabaena*. Além disso, fungos e algas formadoras dos líquens constituem alguns exemplos de simbiose (gênero *Collema*, *Peltigera*, *Leptogium*, etc), (SCHENK, 1992; SPRENT & SPRENT, 1990; STACEY *et al.*, 1992).

1.4 GENES ENVOLVIDOS NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação biológica de nitrogênio é um processo complexo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados genes *nif* (*nitrogen fixation*), os quais codificam para proteínas envolvidas diretamente no processo de FBN. A descoberta dos 20 genes envolvidos na FBN foi proveniente do estudo da genética desse processo em *Klebsiella pneumoniae*. Nessa bactéria, os genes *nif* encontram-se organizados em 7-9 operons, ocupando uma região de aproximadamente, 24 kb entre genes *shiA* e *hisD* (STREICHER *et al.*, 1972). Os genes *nif* codificam as proteínas estruturais do complexo enzimático denominado Nitrogenase, caracterizado pela presença de duas metalo-proteínas, a Fe-proteína (ou componente II) e a MoFe-proteína (ou componente I). (ARNOLD *et al.*, 1988).

A construção de mutantes *nif* de *Klebsiella pneumoniae* permitiu identificar o produto e a função de diversos genes *nif*, sendo que dos 20 genes envolvidos, 14

têm sido encontrados na maioria das bactérias diazotróficas estudadas. Tem sido observado que independente do grupo filogenético, bactérias gram positivas ou negativas, todos os organismos do domínio bactéria apresentam os mesmos genes envolvidos com a FBN, sugerindo uma origem comum ou a ocorrência de transferência gênica horizontal (LUDDEN, 1993).

A reação de fixação do nitrogênio caracteriza-se pela redução do N_2 à NH_3 . Portanto, para que a reação ocorra, é necessário que haja um transporte de elétrons, mediado por moléculas aptas a realizá-lo (Tabela 1). A enzima nitrogenase é formada por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), ambas capazes de transportar elétrons. Durante a reação de redução do N_2 , a nitrogenase é auxiliada por uma terceira molécula transportadora de elétrons, a ferridoxina (Figura 1).

Tabela 1 – Produtos codificados pelos genes *nif* envolvidos com a nitrogenase e suas funções na Fixação Biológica de Nitrôgeno

Gene	Produto	Função
nifH	Codifica para a Fe-proteína ou componente II da nitrogenase	Transferência de elétrons para a MoFe-proteína, participa da biossíntese e inserção do FeMo-Co.
nifDK	Codifica para a subunidade $\alpha^2\beta^2$ da MoFe-proteína ou componente I da nitrogenase.	Redução do N_2 a NH_4^+ , quando associada com Fe-proteína.

Fonte: Adaptado de LUDDEN (1993)

O modelo proposto para a evolução da reação pode ser entendido do seguinte modo:

- a ferridoxina, na sua forma reduzida, transfere um elétron para a unidade Fe-proteína da nitrogenase;
- a Fe-proteína, então reduzida, doa o elétron recebido para a MoFe-proteína;
- a MoFe-proteína acumula os elétrons. Após 8 transferências, essa unidade terá acumulado 8 elétrons e, então, fará a redução do N_2 à NH_3 ;
- para cada elétron transferido da Fe-proteína para a MoFe-proteína são consumidos 2 ATPs;
- para reduzir uma molécula de N_2 são necessários 8 elétrons e, portanto, 16 ATPs.

Como conseqüência da reação de fixação, para cada molécula de N_2 fixada é produzida uma molécula de H_2 . A produção do H_2 durante o processo é inevitável e acaba por consumir parte dos elétrons que poderia ser utilizada na fixação de N_2 .

O H_2 , devido a sua natureza gasosa, é perdido para a atmosfera. No entanto, determinados organismos fixadores possuem uma enzima, a hidrogenase, que oxida o H_2 antes que ele seja perdido, formando H_2O e ATP. O ATP gerado pode ser utilizado para a fixação de nitrogênio. Logo, as bactérias portadoras da hidrogenase são menos prejudicadas e, até mesmo, mais eficientes na fixação do nitrogênio porque possuem uma fonte adicional de ATP (MORGANTE, 1997).

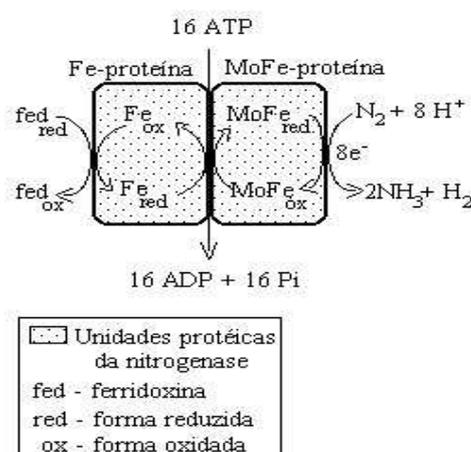


Figura 1: Modelo da reação de fixação do nitrogênio, mediada pela enzima nitrogenase (MORGANTE, 1997).

1.5 A IMPORTÂNCIA DA FILOGENIA NO ESTUDO DA DIVERSIDADE

Os estudos taxonômicos e filogenéticos são necessários para estruturar a biodiversidade de bactérias, facilitando a comunicação entre os cientistas, buscando um maior entendimento da biologia e evolução, com importantes aplicações práticas, estabelecendo uma história evolucionária de organismos e genes, cujo entendimento é um pré-requisito para estudos ecológicos e de genética de populações.

A identificação correta de um microrganismo de acordo com suas correlações filogenéticas ajuda a prever propriedades genotípicas e fenotípicas esperadas para cada espécie. Em termos de microbiologia, durante muito tempo foi dada pouca

importância aos estudos taxonômicos, em vista das grandes dificuldades de classificação impostas pelos métodos tradicionais baseados essencialmente em características fenotípicas, tanto morfológicas como fisiológicas. A aplicabilidade destes estudos na avaliação da biodiversidade de diferentes grupos de microrganismos (BULL *et al.*, 1992), além de permitir um levantamento preliminar da diversidade presente no ambiente em estudo, fornecem dados sobre características fisiológicas que podem ser correlacionados com determinados fatores ambientais. O advento dos métodos moleculares baseados no estudo do genoma bacteriano constituiu-se, em uma fonte abundante de dados, reproduzíveis facilmente e passíveis de serem gerados sem a interferência de problemas técnicos importantes como condições de cultivo, estado fisiológico e outros fatores que, muitas vezes, mascaram os dados fenotípicos.

Vale a pena ressaltar a sugestão colocada por VANDAMME & LUDWIG (1994, citados por VANDAMME *et al.*, 1996), de se escolher grupos de isolados semelhantes e não apenas uma estirpe referência, nos estudos filogenéticos, de modo a obter árvores filogenéticas mais confiáveis. Os autores destacam que é importante não restringir a análise aos táxons mais proximamente relacionados, mas incluir grupos de organismos aparentemente não relacionados. Estes procedimentos diminuem o efeito de pequenas diferenças características de estirpe e não da espécie.

O presente trabalho destaca as bactérias fixadoras de nitrogênio no solo, cujas populações são altamente influenciadas pela rizosfera das plantas, sendo o rizóbio considerado o grupo mais importante na agricultura tropical pela sua associação com as leguminosas. Esta simbiose é responsável por uma substancial parte, talvez a maior, do fluxo global de nitrogênio atmosférico fixado nas formas de amônia, nitrato e compostos orgânicos (KAHINDI *et al.*, 1997).

Há uma grande diversidade de bactérias capazes de formar simbioses com as diferentes leguminosas sendo que, até o momento, encontram-se distribuídas organizadas em ramos filogenéticos principais: os gêneros *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, e os chamados rizóbios de crescimento rápido. Estes atualmente encontram-se divididos em três gêneros: *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* (YOUNG & HAUKKA, 1996; LINDSTRÖM *et al.*, 1998). Os padrões filogenéticos envolvendo a similaridade e as homologias destes grupos serão descritas ao longo do texto.

1.6 USO DA SEQÜÊNCIA 16S *rRNA* COMO MARCADOR MOLECULAR PARA INFERIR FILOGENIA

A complexidade morfológica e a existência de dados fósseis de animais e plantas permitiram o estabelecimento de um sistema de classificação destes organismos. Entretanto, a morfologia e fisiologia bacteriana e muitas outras propriedades não são informativas o suficiente para serem utilizadas como marcadores filogenéticos e geralmente acabam agrupando organismos que são essencialmente diferentes (PACE, 1997).

As seqüências de *rRNAs* ocupam uma posição central no estudo da evolução e ecologia dos microrganismos. O método original consiste na extração de *rRNA* de culturas puras seguido por análises comparativas realizadas com o uso dos catálogos de oligonucleotídeos de 16S *rRNA* (FOX, PECKMAN & WOESE, 1977). Atualmente, análises comparativas da estrutura primária dos genes de *rRNA* transformaram a taxonomia microbiana de um simples sistema de identificação para um sistema estruturado de sistemática baseado na história evolutiva dos organismos (OLSEN, WOESE & OVERBEEK, 1994). PACE *et al.* (1986) foram os primeiros autores a sugerirem o uso do gene 16S *rDNA* como um marcador molecular para o estudo de populações microbianas em amostras do ambiente, independente do seu cultivo.

Análises de macromoléculas envolvidas no processamento da informação contida nos ácidos nucléicos (replicação do DNA, transcrição, e tradução) geralmente produzem uma árvore filogenética apresentando a topologia dividida nos três domínios (*Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*). Por outro lado, análises filogenéticas baseadas em genes metabólicos ou regulatórios não atingem o mesmo resultado (DOOLITTLE, 1999). Além disso, os RNA ribossômicos e outros genes centrais envolvidos na transferência de informações, aparentemente não sofreram uma extensa transferência lateral, produzindo a mais coerente linha para entender e inter-relacionar os principais ramos evolutivos da árvore da vida (OCHMAN *et al.* 2000)

As seqüências de 16S *rDNA* se tornaram padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (HEAD *et al.* 1998). A escolha do 16S *rDNA* decorreu do fato dele apresentar as características típicas a um

marcador molecular ideal: possui uma distribuição universal, estrutura e função conservadas entre os taxa e um tamanho grande o suficiente que permita o estabelecimento de divergências na seqüência. Além disso, sua estrutura primária possui uma alternância entre regiões mais e menos conservadas permitindo a investigação de um amplo espectro de filogenias, desde o nível de domínio até o nível de espécie (LUDWIG & SCHLEIFER, 1994). Por fim, o grande número de seqüências de *16S rDNA* disponíveis atualmente (≈190 mil seqüências segundo o *Ribosomal Database Project-II* rdp.cme.msu.edu), favorece ainda mais o uso desse gene como marcador molecular filogenético por permitir uma vasta gama de comparações.

O aperfeiçoamento dos métodos de extração de DNA de amostras ambientais, PCR, clonagem e seqüenciamento permitiu a exploração dos mais variados tipos de ambientes e o desenvolvimento de diversos trabalhos e análises baseados no *16S rDNA*. Por exemplo, ambientes antes considerados pobres em vida, desde os abismos hipersalinos do Mar Mediterrâneo (VAN DER WIELEN *et al.*, 2005) até as fontes hidrotermais do parque de Yellowstone nos EUA (HUGENHOLTZ *et al.*, 1998a), demonstraram possuir uma ampla variedade de organismos procarióticos.

O *16S rRNA* é uma das moléculas que compõe, juntamente com outras 21 proteínas, a subunidade menor do ribossomo nos domínios *Archaea* e *Bacteria*. Sua estrutura secundária (Figura 2) possui pareamentos diferentes do proposto por Watson-Crick (A-U e C-G) e várias alças oriundas do pareamento intracadeia que são numeradas a partir da extremidade 5' da molécula (WOESE *et al.*, 1983). O número total de alças e a sua localização são características usadas para separar grupos filogenéticos (DAMS *et al.*, 1988). O *16S rRNA* possui também 9 regiões variáveis, alternadas com regiões conservadas, denominadas de V1 a V9. Estas regiões podem, juntamente com as regiões das hélices, serem utilizadas para determinação de filogenia (WOESE *et al.*, 1983 e DAMS *et al.*, 1988). Áreas variáveis podem ser usadas para estudar as relações evolutivas entre dois organismos muito próximos. Já as áreas conservadas podem ser usadas para revelar relações antigas entre duas moléculas.

Baseado no modelo da estrutura secundária do *16S rRNA* de *E. coli*, VAN DER PEER *et al.* (1996) determinaram um mapa de substituição para cada base nitrogenada da molécula. A variabilidade de cada sítio nucleotídico é definida como

sua taxa evolutiva relativa à média da taxa evolutiva de todos os sítios nucleotídicos da molécula. Assim os autores demonstraram que os sítios mais variáveis possuem uma taxa de substituição até sete mil vezes maior do que aqueles com a menor taxa de substituição e também que existem bases em certas posições que são absolutamente conservadas entre diferentes grupos bacterianos.

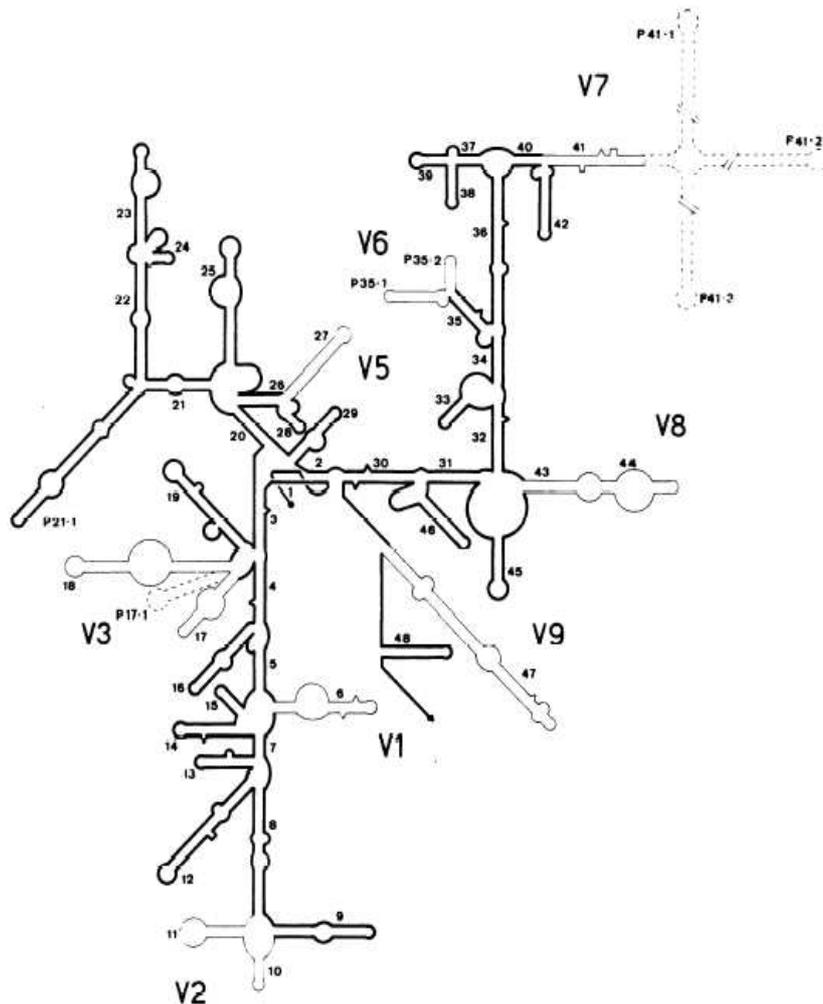


Figura 2 - Modelo da estrutura secundária do 16s e 18s rRNA. As alças são numeradas de acordo com a ocorrência a partir da extremidade 5'. Alças caracterizadas apenas por números são características de procariotos e eucariotos. Alças cujo número é precedido por 'P' são exclusivas de procariotos. Alças que apresentam números hifenados representam bifurcações de uma alça principal. As linhas mais escuras representam regiões mais conservadas e as linhas mais finas representam regiões variáveis (V1 a V9). Procariotos não possuem V4. Hélices em linha pontilhada são raras. A seqüência do 16S rRNA domínio *Archaea* segue o mesmo padrões geral de *Bacteria* com exceção da alça 35 que não é ramificada, sendo esta uma característica do domínio *Eukaria* (Modelo reproduzido a partir de DAMS *et al.*, 1988)

1.7 TRANSFERÊNCIA GÊNICA HORIZONTAL

A transferência gênica é definida como a transferência de material genético de um organismo para outro, podendo ocorrer de duas maneiras: vertical e horizontal. A transferência vertical é a transferência de DNA por descendência, isto é, dos parentais para seus descendentes por herança, sendo um processo que envolve reprodução sexuada. A transferência gênica horizontal (TGH), também chamada de lateral, é a troca de material genético entre células ou genomas de espécies não relacionadas, sendo que esse DNA deve ser incorporado de maneira estável na célula receptora (BROWN, 2003).

A TGH em procariotos pode ocorrer mediante 3 mecanismos: a transdução, a conjugação e a transformação. A transdução refere-se à transferência de DNA de uma célula para outra mediada por um vírus. Neste aspecto, sabe-se que durante o ciclo de infecção de um bacteriófago, este pode adquirir um segmento de DNA da célula infectada e quando esse fago infectar uma segunda célula, este DNA heterólogo poderá ser introduzido no genoma da célula receptora (BROWN, 2003).

Já a conjugação é a transferência direta entre células, e ocorre principalmente entre bactérias, visto que estes procariontes apresentam o aparato necessário para a conjugação, na qual uma célula doadora, com genes F, passa parte ou todo o seu plasmídeo, ou ainda parte do DNA cromossômico para a célula receptora (BROWN, 2003).

O terceiro meio pelo qual a TGH pode ocorrer é a transformação, a qual envolve a aquisição de um DNA livre no ambiente por uma célula e a expressão desse gene na célula receptora. O DNA livre ou elemento genético móvel deve ser adquirido pela célula e integrado ao genoma de maneira estável para que a célula tenha sido efetivamente transformada (BROWN, 2003).

A transformação genética é o processo pelo qual a transferência de genes entre espécies de reinos diferentes torna-se possível. Esse fato se ocorrer, deve ser nos pontos de maior interação entre essas espécies, onde a aquisição de novos genes proporcione à espécie receptora uma maior taxa metabólica e, portanto, mais propensos a apresentarem o estado de competência, isto é, aptas a adquirirem DNA exógeno. Dessa forma, tais locais devem ser os principais sítios para a ocorrência de transferência horizontal (BROWN, 2003).

Entretanto em microrganismos, para que ocorra a transferência horizontal via transformação natural, certas condições devem ser preenchidas, visto que para isso **a)** deve ocorrer liberação do DNA da célula doadora no ambiente e este deve se manter disponível para a transformação natural. Essa liberação de DNA pode ocorrer no momento de lise celular por ataque de um patógeno, ou por degradação de material vegetal no solo. Neste caso a molécula de DNA pode ser degradada por nucleases ou ser adsorvida às partículas de argila, onde estará protegida do ataque de nucleases (DEMANÈCHE *et al.*, 2001); **b)** deve existir procariotos no local em estado de competência para receber DNA do meio externo. Esta é uma característica de cada espécie, mas pode ser atingida, em fase de falta de nutrientes ou na presença de excesso de nutrientes, conforme a espécie. Esta competência procariótica no ambiente tem sido observada em uma frequência reduzida quando em solos não esterilizados, sendo nestes casos muito difícil a detecção de espécies transformadas (SMALLA *et al.*, 2000); **c)** deve ocorrer entrada do DNA no interior da célula receptora. A entrada de quantidades altas de DNA, fita simples de DNA ou se a espécie apresentar um sistema ineficiente de restrição pode levar a uma maior frequência de transformação; **d)** deve ocorrer integração do gene heterólogo no genoma da célula receptora. Neste caso, quanto maior a similaridade entre os dois DNAs, maior a possibilidade de ocorrer esta integração.

A expressão de novos genes incorporados poderá resultar em efeitos para a célula receptora, e por conseqüência à população e à comunidade. Entretanto, o efeito do gene inserido pode ser benéfico ou maléfico a espécie e nesse sentido a espécie transformada somente será mantida no ambiente se a presença do gene lhe conferir uma vantagem adaptativa. Para que haja a efetivação da integração do DNA exógeno na célula receptora, dois mecanismos que propiciam essa integração são conhecidos: a recombinação sítio-específica e a recombinação homóloga. A recombinação sítio-específica não precisa de seqüências homólogas para ocorrer, pois pode haver um local específico que é reconhecido por enzimas que clivam o local e insere o DNA no genoma da célula receptora. Porém, o mecanismo mais comum é a recombinação homóloga, a qual necessita de seqüências homólogas flanqueando o DNA adquirido e o DNA do cromossomo da célula receptora. Há ainda a possibilidade de estabilização sem integração do gene heterólogo, para isso, o DNA deverá ser recircularizado e possuir uma seqüência de origem de replicação (ORI) para que possa se duplicar no interior da célula receptora (BUSHMAN, 2003).

Diversos genomas de procariotos já foram completamente seqüenciados, mostrando que partes dos genes presentes nestes microrganismos foram adquiridas via TGH. A grande adaptabilidade de procariotos aos diferentes nichos tem sido associada a sua capacidade de trocar genes por esses mecanismos específicos. Neste aspecto, a transferência de genes entre espécies filogeneticamente distantes é limitada por uma combinação de barreiras físicas, químicas e biológicas resultantes de uma incompatibilidade genética, observando-se que em alguns casos, genes presentes no genoma de bactérias do solo vieram provavelmente de plantas (DOOLITTLE, 1998), mostrando que esta transferência pode estar relacionada a processos evolutivos, sendo uma fonte geradora de variabilidade genética em espécies microbianas.

Assim sendo, embora em *Rickettsia prowazekii*, a estimativa para genes provindos de eventos de transferência horizontal seja de 0%, em *Synechocystis* PCC6803 esta estimativa é de 16,6 %, sugerindo que parte do genoma deste microrganismo seja constituído por genes heterólogos. Em *E. coli*, esse valor também é expressivo, visto que aproximadamente 12,8% do genoma desta bactéria seja proveniente de espécies não associadas filogeneticamente. Há de se considerar que esse método pode subestimar a taxa de eventos de TGH, pois seqüências adquiridas de organismos muito próximos, com composição de bases e códons semelhantes, além de eventos muito antigos de transferências gênicas podem não ter sido detectados (OCHMAN *et. al.*, 2000). Estes resultados mostram que eventos de transferência horizontal não são raros entre genomas bacterianos fazendo parte do processo evolutivo de várias espécies, mas que a sua detecção pode ser difícil, sendo, portanto a sua ocorrência subestimada em estudos.

Existem evidências de que eventos de TGH podem ocorrer entre domínios diferentes. Por exemplo, em *Caenorhabditis elegans*, dos 19.000 prováveis genes, 185 são putativos para aquisição via eventos de transferência horizontal com genomas bacterianos. No ser humano, dos 37.000 genes, 223 teriam vindo de procariotos por transferência horizontal (SALZBERG *et al.*, 2001). Assim, a TGH é um processo que ocorre *in natura*, sendo dessa forma um importante mecanismo gerador de variabilidade genética, a qual pode resultar, por meio da ação da seleção natural, em mudanças evolutivas.

1.8 TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL ENTRE MICRORGANISMOS

Embora as barreiras sejam grandes, há recentes estudos que mostram que a transferência de DNA entre microrganismos é potencialmente possível. Estudos mais recentes estão utilizando os perfis moleculares da comunidade para avaliar os efeitos sobre as diferentes populações microbianas. Há trabalhos que testam a transferência para bactérias do solo, como a bactéria do solo *Acinetobacter* spp. a qual faz parte de um grupo de bactérias conhecidas por desenvolver naturalmente o estado de competência, apresentando altas taxas de transformação *in vitro*, por isso mesmo, a ocorrência de TGH tem sido estudada em bactérias deste gênero, especialmente *A. calcoaceticus*.

As possíveis causas para uma baixa frequência de transformação poderia ser a ausência de padrões homólogos entre o gene e o genoma da espécie receptora, dificultando a possibilidade de recombinação homóloga, bem como a ausência de seqüências de origem de duplicação, a qual permitiria a estabilidade de um DNA recircularizado para posterior duplicação autônoma (NIELSEN *et. al.*, 1997).

Em outro experimento, células lisadas de *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Acinetobacter* foram utilizadas para transformar células de *Acinetobacter*. Houve transformação nessas condições, mostrando que as células lisadas não interferiram no processo de transformação, podendo até mesmo auxiliar na conservação do DNA. Além disso, foi confirmado que *Acinetobacter* possui aparato para receber DNA de outras bactérias do solo, evidenciando como um gene introduzido em uma espécie pode se espalhar para outras espécies bacterianas (NIELSEN *et. al.*, 2000).

Contudo, mais estudos sobre os fatores que influenciam o estado de competência no ambiente, a diversidade de espécies transformáveis e outros fatores necessitam ser explorados para um melhor entendimento deste mecanismo em condições ambientais.

2. OBJETIVOS

- Avaliar *in silico* as relações de ancestralidade das diferentes linhagens de diazotróficos portadores de genes *nifKDH* envolvidos na Fixação Biológica de Nitrogênio;
- Avaliar *in silico* a filogenia de bactérias diazotróficas baseada na seqüência do gene *16S rRNA* e dos genes *nifKDH* envolvidos com a Fixação Biológica de Nitrogênio;
- Avaliar a ocorrência de transferência horizontal de genes *nifKDH* envolvidos com a Fixação Biológica de Nitrogênio entre espécies do domínio *Bacteria*.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 SEQUÊNCIAS E ESPÉCIES ANALISADAS

Por meio de busca e coleta de seqüências e informações no banco de dados do *GenBank* e posterior identificação dos táxons utilizando-se o manual *Bergey's* (WILLIAMS E WILKINS, 1984) e *AlgaeBase* (<http://www.algaebase.org/>) para a taxonomia de cianobactérias (Tabelas 2, 3 e 4) foram obtidas seqüências de diazotróficos principalmente bactérias da classe *Alphaproteobacteria*, incluindo os gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium*, *Shinorhizobium* e *Rhizobium*, além de organismos fototróficos e metanotróficos, tornando esse grupo de organismos bastante variável. Já em bactérias das classes *Betaproteobacteria* e *Gamaproteobacteria*, estão classificadas numa minoria de bactérias diazotróficas até então descritas. A classe *Deltaproteobacteria* possuiu, em sua maioria, bactérias anaeróbicas obrigatórias redutoras de enxofre, incluindo espécies de *Desulfovibrio* e *Desulfobacter*.

3.2 ANÁLISE DE DADOS

As seqüências dos genes *nif* e *16S rRNA* foram obtidas a partir do *GenBank*, por meio do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), alinhadas com o programa *CLUSTAL X* (THOMPSON *et al.*,1997), disponível na internet para todos os sistemas operacionais.

Foram definidos os parâmetros para o alinhamento múltiplo, de acordo com os valores sugeridos por HALL (2001). Como ponto de partida os valores são os seguintes: "Delay divergent sequences"= 30%, "Gap Opening"= 15.00 e "Gap Extension"= 0.30. A utilização de tais parâmetros deve-se ao fato de que seqüências muito divergentes são difíceis de serem analisadas. Portanto, o programa adia o alinhamento destas até que as seqüências mais semelhantes tenham sido alinhadas. O valor de 30% para "Delay divergent sequences" significa que

seqüências com diferenças dessa ordem de grandeza serão adicionada posteriormente ao alinhamento.

Após a execução do alinhamento múltiplo as seqüências foram editadas no *BioEdit* (HALL, 1999), para inspeção visual do alinhamento em busca de possíveis erros, que devem ser corrigidos manualmente, assim como para codificação de inserções e deleções. Posteriormente, árvores filogenéticas foram construídas pela metodologia da sistemática filogenética por meio do *Princípio da Parcimônia* utilizando-se do programa *PAUP 4.0* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods), versão beta 10 (SWOFFORD, 2001). A análise aleatória das seqüências foi a escolhida utilizando o algoritmo "hsearch" ("random additive sequence") com um número de 1000 réplicas.

O *Princípio da Parcimônia* é um método baseado na comparação, procurando determinar o grau de ancestralidade entre duas ou mais seqüências, ou a homologia entre fragmentos destas seqüências. No caso de mais de duas seqüências o processo é denominado alinhamento múltiplo. Neste processo, espaços (*gaps*) são introduzidos entre os monômeros de uma ou mais seqüências a fim de obter o melhor alinhamento possível. A qualidade de um alinhamento é determinada pela soma dos pontos obtidos por cada unidade pareada (*match*) menos as penalidades pela introdução de *gaps* e posições não pareadas (*mismatch*).

Para a realização das inferências a respeito das relações de parentesco entre organismos fixadores de nitrogênio, tomando como base seqüências de nucleotídeos dos genes *nif* em questão, o primeiro passo foi identificar seqüências de interesse que apresentassem ancestralidade comum, ou seja, que fossem homólogas. Para isto, estas seqüências foram escolhidas nos grandes bancos de dados disponíveis na rede. Neste momento, é importante ressaltar que, nesta reconstrução filogenética, a escolha de seqüências homólogas foi fundamental, colaborando na geração das árvores, pois só assim pode-se ter a certeza de que estávamos comparando um mesmo marcador que apresentasse ancestralidade entre os vários organismos a partir de uma origem comum. Ao contrário, caso tal critério não fosse utilizado, ou seja, a não comparação de caracteres homólogos, iria possivelmente incidir no erro de considerar similaridades sem origem comum e, portanto, com histórias evolutivas diferentes. Para a avaliação destas escolhas, foram incluídas nas análises, seqüências de grupos externos, que funcionam como controles no processo de reconstrução de parentescos.

Tabela 2 – Classificação dos táxons contendo o gene *nifH* (parte I)

Espécie	Nº Acesso	Filo	Classe	Ordem	Família
<i>Frankia</i> sp.	AJ545037	Actinobacteria	Actinobacteridae	Actinomycetales	Frankiaceae
<i>D. nigrificans</i>	AY221823				
<i>D. orientis</i>	AF227925				
<i>C. pasteurianum</i>	X07473				Clostridiaceae
<i>H. daurensis</i>	AB191046				
<i>H. baculata</i>	AB191045				
<i>H. gestii</i>	AB126254				Heliobacteriaceae
<i>H. modesticaldum</i>	AB191043				
<i>H. mobilis</i>	AB191044				
<i>P. forsythia</i>	DQ349124				
<i>P. zanthoxylum</i>	DQ364794				
<i>P. sabina</i>	DQ349129				
<i>P. wynnii</i>	AJ867243				Paenibacillaceae
<i>P. polymyxa</i>	AJ223997				
<i>P. macerans</i>	AJ223993				
<i>P. durus</i>	AY221826				
<i>B. cereus</i>	AY373369				
<i>B. megaterium</i>	AY373365				Bacillaceae
<i>Pantoea agglomerans</i>	AB270758				
<i>Enterobacter cloacae</i>	AB270754				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AB270756	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
<i>Klebsiella variicola</i>	AY367394				
<i>Raoultella terrigena</i>	AY367396				
<i>Halomonas maura</i>	AY827547			Oceanospirillales	Halomonadaceae

Tabela 2 – Classificação dos táxons contendo o gene *nifH* (parte II)

<i>M. capsulatus</i>	AM110701			
<i>M. tundripaludum</i>	AY937260		Methylococcales	Methylococcaceae
<i>Methylobacter luteus</i>	AJ563957			
<i>M. pushchinense</i>	DQ002938			
<i>Methylobacter bovis</i>	AF484678		Gammaproteobacteria	Methylococcales
<i>H. halophila</i>	DQ660368			Ectothiorhodospiraceae
<i>M. purpuratum</i>	AF059649			Chromatiales
<i>A. chroococcum</i>	X03916			Chromatiaceae
<i>A. macrocytogenes</i>	AY644349			
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AF117978		Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
<i>Azomonas agilis</i>	AF216883			
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	AY221828		Vibrionales	Vibrionaceae
<i>Mesorhizobium loti</i>	AF484647			Phyllobacteriaceae
<i>M. amorphae</i>	EF153401			
<i>M. plurifarum</i>	AY688618	Proteobacteria		
<i>M. tianshanense</i>	DQ407288			
<i>M. mediterraneum</i>	AJ457917			Phyllobacteriaceae
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	AY601521			
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	EF153402		Alphaproteobacteria	
<i>Phyllobacterium sp.</i>	AJ968689			
<i>Rhizobium tropici</i>	DQ413021		Rhizobiales	
<i>Rhizobium mongolense</i>	AY929539			
<i>Rhizobium huautlense</i>	AY688616			
<i>Rhizobium hainanense</i>	AY934876			Rhizobiaceae
<i>Rhizobium gallicum</i>	DQ413017			
<i>Rhizobium etli</i>	DQ413020			
<i>R. daejeonense</i>	AY428644			
<i>R. leguminosarum</i>	EF165529			

Tabela 2 – Classificação dos táxons contendo o gene *nifH* (parte III)

<i>Rhizobium lusitanum</i>	AY943644				
<i>Ensifer mexicanum</i>	DQ411942				
<i>Sinorhizobium fredii</i>	DQ485715				
<i>S. xinjiangense</i>	DQ411933				
<i>Sinorhizobium terangae</i>	DQ411935				
<i>Sinorhizobium saheli</i>	Z95221				Rhizobiaceae
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	EF070145				
<i>Sinorhizobium medicae</i>	DQ411932				
<i>S. kostiense</i>	DQ411934				
<i>S. kummerowiae</i>	DQ411931				
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	EF153399				
<i>B. japonicum</i>	EF153398				
<i>B. yuanmingense</i>	EF153397				
<i>B. canariense</i>	AY386782				Bradyrhizobiaceae
<i>B. liaoningense</i>	AF484637	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	
<i>B. genosp.</i>	AY386781				
<i>M. nodulans</i>	AY312969				Methylobacteriaceae
<i>Methylosinus sporium</i>	AJ563956				Methylocystaceae
<i>Methylocella palustris</i>	AM110716				
<i>Methylocella silvestris</i>	AM110717				
<i>Methylocella tundrae</i>	AJ563945				
<i>M. acidiphila</i>	AM110721				Beijerinckiaceae
<i>Beijerinckia deroxii</i>	AJ563941				
<i>Beijerinckia mobilis</i>	AJ563937				
<i>Beijerinckia indica</i>	AJ563939				
<i>Starkeya sp.</i>	AJ968690				Xanthobacteraceae
<i>A. caulinodans</i>	AM110711				
<i>P. oryzae</i>	AB182914				unclassified

Tabela 2 – Classificação dos táxons contendo o gene *nifH* (parte IV)

<i>M. echinoides</i>	AM110703			
<i>Methylocystis rosea</i>	DQ010107		Rhizobiales	Methylocystaceae
<i>M. trichosporium</i>	AJ563954			
<i>R. capsulatus</i>	X63352			
<i>R. sulfidophilum</i>	AB079630		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae
<i>Rhodovulum strictum</i>	AB079629			
<i>Azospirillum lipoferum</i>	DQ787332			
<i>Azospirillum oryzae</i>	U97115		Alphaproteobacteria	
<i>Azospirillum brasilense</i>	X51500			
<i>M. gryphiswaldense</i>	DQ482050		Rhodospirillales	Rhodospirillaceae
<i>T. siberiense</i>	DQ482049			
<i>Phaeospirillum fulvum</i>	DQ482051			
<i>A. nitrogenifigens</i>	AY952470			Acetobacteraceae
<i>N. nitrogenifigens</i>	DQ660368			
<i>S. azotifigens</i>	AB217474	Proteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae
<i>Azospira oryzae</i>	AB185395			
<i>Azovibrio restrictus</i>	U97119			
<i>Azoarcus tolulyticus</i>	U97122			
<i>Azoarcus indigens</i>	U97118		Rhodocyclales	Rhodocyclaceae
<i>Azoarcus communis</i>	U97116			
<i>Zoogloea oryzae</i>	AB201046			
<i>Azonexus fungiphilus</i>	DQ029204		Bataproteobacteria	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	X96609			Alcaligenaceae
<i>Azohydromonas lata</i>	AB201627			
<i>Derxia gummosa</i>	AB188123			
<i>A. australica</i>	AB188121		Burkholderiales	Burkholderiaceae
<i>Burkholderia fungorum</i>	AM110722			
<i>Burkholderia cepacia</i>	AM110713			

Tabela 2 – Classificação dos táxons contendo o gene *nifH* (parte V)

<i>B. vietnamiensis</i>	AM110718				
<i>B. phymatum</i>	DQ890024				Burkholderiales
<i>Ralstonia taiwanensis</i>	AY300795				
<i>H. seropedicae</i>	Z54207	Proteobacteria	Bataproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae
<i>P. saccharophila</i>	AB188120				Comamonadaceae
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	AY544164				
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	AB188119				unclassified

Tabela 3 - Classificação dos táxons contendo o gene *nifD* (parte I)

Espécie	Nº Acesso	Filo	Classe	Ordem	Família
<i>Frankia alni</i>	L41344	Actinobacteria	Actinobacteridae	Actinomycetales	Frankiaceae
<i>P. massiliensis</i>	AY912109		Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae
<i>C. cellulolyticum</i>	X60727				Clostridiaceae
<i>Clostridium beijerinckii</i>	AY649324				
<i>Heliobacterium gestii</i>	AB191042				
<i>Heliobacterium chlorum</i>	AB196525	Firmicutes			
<i>H. modesticaldum</i>	AB191043				
<i>Heliorestis daurensis</i>	AB191046				Heliobacteriaceae
<i>Heliorestis baculata</i>	AB191045				
<i>Heliobacillus mobilis</i>	AB191044				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Y00316			Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
<i>H. halophila</i>	AB189641			Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae
<i>P. azotifigens</i>	AB189453				
<i>Azotobacter vinelandii</i>	X06886		Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
<i>Methylobacter luteus</i>	AJ608698				
<i>M. capsulatus</i>	AJ608696			Methylococcales	Methylococcaceae
<i>A. ferrooxidans</i>	M15238				
<i>Burkholderia tuberum</i>	AJ302315	Proteobacteria		Acidithiobacillales	Acidithiobacillaceae
<i>Burkholderia tropica</i>	AY561844				Burkholderiaceae
<i>H. seropedicae</i>	Z54207		Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae
<i>Alcaligenes faecalis</i>	X95565				Alcaligenaceae
<i>G. diazotrophicus</i>	AF030414				
<i>G. johanna</i>	AY624582				Acetobacteraceae
<i>G. azotocaptans</i>	AY624581		Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	
<i>Azospirillum brasilense</i>	M64344				
<i>A. doebereineriae</i>	AJ238568				Rhodospirillaceae

Tabela 3 - Classificação dos táxons contendo o gene *nifD* (parte II)

<i>Rhodobacter capsulatus</i>	M15270		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	AY626911			Phyllobacteriaceae
<i>Methylosinus sporium</i>	AJ608700			
<i>M. trichosporium</i>	AJ608701			Methylocystaceae
<i>Methylocystis echinoides</i>	AJ608699			
<i>Roseomonas gilardii</i>	AY423872			
<i>R. genomospecies</i>	AY423871			Methylobacteriaceae
<i>Roseomonas fauriae</i>	AY423870			
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	AF484265			
<i>B. japonicum</i>	AF484260			
<i>B. canariense</i>	DQ644553			Bradyrhizobiaceae
<i>B. liaoningense</i>	AF484263			
<i>R. leguminosarum</i>	EF165535	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	
<i>Rhizobium etli</i>	L13617		Rhizobiales	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AE007235			Rhizobiaceae
<i>Sinorhizobium medicae</i>	AJ584676			
<i>Beijerinckia indica</i>	AJ608689			Beijerinckiaceae
<i>Beijerinckia derxii</i>	AJ608688			
<i>Beijerinckia mobilis</i>	AJ608687			
<i>Methylocella palustris</i>	AJ608693			
<i>Methylocella tundrae</i>	AJ608695			Beijerinckiaceae
<i>Methylocella silvestris</i>	AJ608692			
<i>Methylocapsa acidiphila</i>	AJ608691			
<i>Geobacter psychrophilus</i>	AY795909			Desulfuromonadales
<i>Geobacter bemidjiensis</i>	AY186944			
<i>G. metallireducens</i>	AY549997		Deltaproteobacteria	Geobacteraceae
<i>Geobacter pelophilus</i>	AY549995			

Tabela 3 - Classificação dos táxons contendo o gene *nifD* (parte III)

<i>G. sulfurreducens</i>	AY549996				
<i>Geobacter bremensis</i>	AY549994				Geobacteraceae
<i>Geothermobacter ehrlichii</i>	AY549992				
<i>Malonomonas rubra</i>	AY549993				
<i>Pelobacter acidigallici</i>	AY549991				
<i>Pelobacter masseliensis</i>	AY549990				
<i>Pelobacter carbinolicus</i>	AY549989				Pelobacteraceae
<i>Pelobacter venetianus</i>	AY186965				
<i>Pelobacter propionicus</i>	AY186964				
<i>Pelobacter acetylenicus</i>	AY186960				
<i>D. palmitatis</i>	AY549988				
<i>D. michiganensis</i>	AY186943	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	
<i>Desulfuromonas thiophila</i>	AY186950				
<i>D. acetoxidans</i>	AY186945				
<i>D. acetexigens</i>	AY186951				Desulfuromonadaceae
<i>D. chloroethenica</i>	AY186947				
<i>D. michiganensis</i>	AY186943				
<i>Desulfuromusa kysingii</i>	AY549999				
<i>D. succinoxidans</i>	AY186949				
<i>Desulfuromusa bakii</i>	AY186946				
<i>G. electrodiphilus</i>	AY186942				
<i>Trichlorobacter thiogenes</i>	AY186969				
<i>Geobacter grbiciae</i>	AY186968				Geobacteraceae
<i>Geobacter humireducens</i>	AY186954				
<i>Geobacter chappelleii</i>	AY186953				

Tabela 4 – Classificação dos táxons contendo o gene *nifK* (parte I)

Espécie	Nº Acesso	Filo	Classe	Ordem	Família
<i>Frankia sp.</i>	U01238	Actinobacteria	Actinobacteridae	Actinomycetales	Frankiaceae
<i>L. ferrooxidans</i>	AY204398	Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae
<i>C. acetobutylicum</i>	NC003030	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae
<i>Clostridium beijerincki</i>	AY649324				
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	X60727				
<i>Clostridium pasteurianum</i>	AY603957				
<i>Heliobacterium chlorum</i>	AB196525				Heliobacteriaceae
<i>P. massiliensis</i>	AY912109		Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	AJ313205			Pseudomonadales	Pseudomonadaceae
<i>Azotobacter vinelandii</i>	M20568		Gammaproteobacteria		
<i>Halorhodospira halophila</i>	AB189641			Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X07749			Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
<i>R. leguminosarum</i>	EF165535	Proteobacteria			Rhizobiaceae
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AE007236			Rhizobiales	
<i>B. japonicum</i>	M64591		Alphaproteobacteria		Bradyrhizobiaceae
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	AY873924				Phyllobacteriaceae
<i>Azospirillum brasilense</i>	M64344			Rhodospirillales	Rhodospirillaceae

Tabela 4 – Classificação dos táxons contendo o gene *nifK* (parte II)

<i>G. diazotrophicus</i>	AF030414		Rhodospirillales	Acetobacteraceae
<i>G. johannae</i>		Alphaproteobacteria		
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	X63354		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae
<i>Azoarcus sp.</i>	X87103			
<i>Dechloromonas sp.</i>	AJ563287	Proteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae
<i>B. vietnamiensis</i>	AF175210	Betaproteobacteria		Burkholderiaceae
<i>H. seropedicae</i>	Z54207		Burkholderiales	Oxalobacteraceae
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	AY544164			Comamonadaceae
<i>D. vulgaris</i>	AE017286	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação *in silico* da ancestralidade nas seqüências de DNA avaliadas e posterior comparação entre as árvores resultantes, foram utilizadas seqüências do 16S *rDNA* de bactérias diazotróficas, juntamente com as seqüências dos genes a serem avaliados. Inicialmente foi construída uma árvore baseada na seqüência do 16S *rDNA* de todas as espécies a serem utilizadas (Anexo 1), com a finalidade de avaliar se as relações filogenéticas propostas no manual Bergey's (WILLIAMS E WILKINS, 1984) seriam observadas com estas seqüências. Esta análise permite avaliar a confiabilidade dos dados, visto que esta análise de seqüências ribossomais deve mostrar a relação evolutiva entre as diferentes espécies avaliadas.

Nos últimos anos, conforme já destacado, a taxonomia das bactérias fixadoras de nitrogênio em geral tem sofrido uma revisão substancial, devido ao advento dos métodos moleculares de análise filogenética (YOUNG, 1994), revelando novas relações entre os grupos de taxonomia confusa, com importantes aplicações práticas. Vale a pena destacar o potencial dessa valiosa ferramenta, consistindo em ampla base de dados atualmente disponível na rede mundial de computadores para o estudo de sistemática bacteriana, inclusive com a disponibilização de programas de domínio público para a análise dos dados. Estes métodos moleculares têm se revelado imprescindíveis, principalmente nos estudos de biodiversidade das populações de rizóbio presentes no solo.

A avaliação *in silico* da filogenia de bactérias diazotróficas no presente estudo baseado nas seqüências do gene 16S *rRNA*, demonstrou que os táxons analisados encontram-se organizados em ramos monofiléticos. A análise das figuras 3, 5 e 7 baseada na filogenia do gene 16S *rRNA* de diazotróficos, demonstra que os táxons do filo *Firmicutes* além da proximidade com o grupo externo (*Frankia* sp. – *Actinobacteria*), não apresentam proximidade filogenética com outros táxons diazotróficos, principalmente as do filo *Proteobacteria* estando todos os táxons incluídos num único ramo. Tal fato pode ser explicado, pois como é de conhecimento da taxonomia microbiana *Actinobacteria* e *Firmicutes* constituem o grupo de bactérias gram-positivas, sendo todas as outras *Proteobacteria* gram-negativas.

Métodos que consideram a variação genotípica e o relacionamento entre espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* tem sido estabelecidos (Martínez-

ROMERO, 1994; LAGUERRE *et al.*, 1996) baseadas nas seqüências do 16S *rRNA* revelaram que os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, apesar de pertencerem à subdivisão alfa de *Proteobacteria*, possuem uma relação bem distanciada entre si, mas bem próxima a outros grupos de bactérias que não incluem simbioses de plantas (SAWADA *et al.*, 1993; WILLEMS & COLLINS, 1993; YANAGI & YAMASATO, 1993; YOUNG *et al.*, 1991). As figuras 3, 5 e 7 demonstram haver maior padrão de relacionamento entre *Rhizobium* e *Sinorhizobium*. Verifica-se uma repetição dos fatos entre os táxons do gênero *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*, apresentando da mesma forma maior padrão de relacionamento genotípico.

O gênero *Rhizobium* sofreu modificações, algumas já relatadas como a definição dos gêneros *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* que acabaram englobando espécies que anteriormente pertenciam a este gênero. Atualmente, aceitas pelo Subcomitê Internacional de Taxonomia de *Rhizobium*, pertencem a este gênero as espécies *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), *R. etli* (SEGOVIA *et al.*, 1993), *R. leguminosarum* (JORDAN, 1984) e *R. hainanense* (CHEN *et al.*, 1997).

Como destacado acima, alguns rizóbios apresentam uma relação bem próxima a outros grupos de bactérias não-simbioses de plantas. Estão incluídos nesta relação os gêneros das ordens *Rhodospirillales*, seguido das classes *Rhodobacterales* e *Sphingomonadales*, estes compartilhando com os rizóbios relações plesiomórficas e apomórficas (Figuras 3, 5 e 7).

A classe *Gamaproteobacteria* está representada neste estudo pelas ordens *Chromatiales*, *Enterobacterales*, *Methylococcales* e *Pseudomonadales*. Entre as classes mencionadas, verifica-se maior grau de proximidade filogenética entre *Methylococcales* e *Pseudomonadales* (Figuras 3, 5 e 7). A análise do cladograma demonstra que provavelmente no passado pressões apomórficas levaram um táxon ancestral a se diversificar e como resultado desta, *Enterobacterales* evoluíram de forma independente em relação às outras classes deste mesmo grupo.

Finalizando a análise dos cladogramas 16S *rRNA* (Figuras 3, 5 e 7) que demonstram a organização filogenética dos diazotróficos, destaque especial aos gêneros da ordem *Desulfuromonadales* pertencentes a classe *Deltaproteobacteria* do filo *Proteobacteria*. Estes se encontram extremamente organizadas constituindo um grande ramo. A figura 5 que demonstra a filogenia dos diazotróficos portadores do gene *nifD* baseado no 16S *rRNA*, permite estabelecer que de todas as protobactérias a classe *Deltaproteobacteria* é sem dúvida alguma a classe que

apresenta maior distanciamento filogenético em relação as outras classes desse mesmo filo.

Para a análise dos resultados dos cladogramas dos genes *nif* estudados, utilizou-se como grupo externo a actinobactéria *Frankia* sp., a fim de que tal fato pudesse fornecer soluções para a polarização de caracteres de difícil análise.

É importante ressaltar que os cladogramas utilizados em análises filogenéticas indicam apenas que há uma história comum e não uma espécie ancestral, propriamente dita reunindo espécies ou táxons supra-específicos em grupos monofiléticos. Porém no presente estudo, como os táxons terminais dos cladogramas são exclusivamente recentes, as relações entre esses táxons terminais serão sempre relações de ancestralidade comum.

Isto posto, resulta que os cladogramas que incluem como táxons terminais apenas grupos e espécies recente são topologicamente idênticos às suas árvores filogenéticas correspondentes. A única diferença é que, nas árvores filogenéticas existem espécies ancestrais que não estão representadas ou denominadas no cladograma.

Assim, cladogramas são inferências (ou hipóteses) permanentemente sujeitas à transformação, à medida que o conhecimento sobre a diversidade biológica de táxons aumenta. Portanto, os cladogramas contêm uma grande quantidade de informações implícitas, sendo dessa forma uma ótima ferramenta para a extração de uma lista extensa de afirmações (AMORIM, 1997). Outra questão importante é que o objetivo primário de uma análise filogenética não é, estritamente, produzir cladogramas “bem comportados”, resolvidos em todos os níveis, mas organizar a informação biológica disponível.

Posteriormente, foram construídas árvores com seqüências de *16S rDNA* e com os genes *nif*, com as mesmas espécies, permitindo comparar cada árvore *16S rDNA* (considerada a que representa a relação filogenética correta) com a árvore resultante dos diferentes genes *nif*, ou seja, as comparações foram feitas utilizando seqüências das mesmas espécies para ambos os genes (*nif* e *16S rRNA*) e visualizadas no programa *TreeView*. As árvores filogenéticas construídas a partir do alinhamento de seqüências gênicas obtidas em relação aos genes *nif* (Figuras 4, 6 e 8) fixadores de nitrogênio e do *16S rRNA* (Figuras 3, 5 e 7) em diferentes espécies de diazotróficos demonstraram haver a possibilidade de ocorrência de transferência horizontal.

A comparação entre as figuras 3 e 4 mostrou que para *Burkholderia vietnamensis* e *Herbaspirillum seropedicae* (*Betaproteobacteria*) pode ter ocorrido transferência horizontal, e neste caso, os gene *nifK* destas bactérias por ter uma origem de bactérias da classe *Alphaproteobacteria*, possivelmente *Azospirillum brasilense* ou *Bradyrhizobium japonicum* (*Alphaproteobacteria*), visto que na árvore baseada na sequência do gene *nifK*, estas duas espécies estão agrupadas com *Alphaproteobacteria*. Dessa forma, tendo em vista que bactérias da ordem *Burkholderiales* representadas em *nifK* por *Herbaspirillum seropedicae*, *Burkholderia vietnamiensis* e *Delftia tsuruhatensis* no gene *16S rRNA* encontra-se extremamente organizadas para este gene em questão (Figura 3), próximas as outras ordens de *Betaproteobacteria*. Porém, em *nifK* (Figura 4) esses dois táxons se encontram mais próximos filogeneticamente com espécies de *Alphaproteobacteria*, possibilitando estabelecer neste caso, transferência gênica horizontal deste gene entre espécies da ordem *Burkholderiales* (*Betaproteobacteria*) e espécies da classe *Alphaproteobacteria*. A árvore filogenética para o gene *nifK* (Figura 4) indica que essa transferência ocorreu de *Alphaproteobacteria* para *Betaproteobacteria*.

A análise filogenética baseada no gene *16S rRNA* (Figuras 3, 5 e 7) e da distribuição dos genes *nifKDH* (Figuras 4, 6 e 8) em diferentes espécies de procariotos demonstra ser estes cladogramas compostos por grandes grupos monofiléticos apresentando *a priori* grupos monofiléticos menores, ou seja, conjuntos de espécies e/ou grupos que apresentam espécies ancestrais e todas as suas espécies descendentes. Pretende-se dessa forma descreve-los de maneira clara a fim de que os objetivos do presente estudo possam ser alcançados.

Os padrões filogenéticos baseados no gene *16S rRNA* demonstraram que para todos os genes *nif* objetos de estudo o táxon *Frankia* sp. (*Actinobacteria*), proposto no presente estudo como grupo externo, apresenta proximidade filogenética com os diazotróficos do filo *Firmicutes*. Tal fato torna-se extremamente compreensível, já que estes constituem o grupo de bactérias gram-positivas ao contrário de todos os outros filios representados nos diferentes cladogramas serem classificados como gram-negativas.

A intensa proximidade filogenética entre *Actinobacteria* e *Firmicutes* já havia sido estabelecida por Carl Woese (1990) quando em estudos de biodiversidade taxonômica, utilizou as comparações de seqüências de *16S* e *18S rRNA* para propor uma nova classificação universal para a grande diversidade de vida na Terra,

estabelecendo uma proposta completa de classificação baseada em dados moleculares e não morfológicos (WOESE *et al.*, 1990) propuseram a criação de um novo nível taxonômico, denominado *Domínio*, sendo a vida no planeta dividida em três Domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*, já que o sistema de 5 Reinos era insuficiente e não refletia a filogenia natural dos seres vivos.

Em relação aos rizóbios, verifica-se no padrão *16S rRNA* (Figura 3) que os gêneros *Shinorhizobium* e *Rhizobium* constituem gêneros de maior proximidade, evidenciado no cladograma pela ocorrência de uma sinapomorfia entre *Shinorhizobium meliloti* e *Rhizobium leguminosarum*. Ligado diretamente a estes se encontra *Mezorhizobium ciceri*. O gênero *Rhizobium* parece ser o elo entre todos os rizóbios, pois para o gene *nif* em questão esta espécie de *Rhizobium* apresentou sinapomorfia com *Shinorhizobium meliloti*. Tanto para o gene *16S rRNA* como para o gene *nifK* o gênero *Bradyrhizobium*, entre todos os rizóbios é sem dúvida alguma o grupo mais distante.

Entretanto, para as espécies avaliadas com o gene *nifD* (Figura 6), a árvore construída com base na sequência do gene *16S rRNA* (Figura 5) mostra estar bem organizada, sendo os táxons, representativos de diferentes filos: *Actinobacteria*, *Firmicutes* e muitas classes de protobactérias distribuídas em *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*, sendo esta última, a classe com maior número de táxons em relação as outras classes de protobactérias em *nifD*.

Neste cladograma (Figura 10), verifica-se que os membros da ordem *Rhodospirillales* apresentam-se como um grupo-irmão em relação à ordem *Rhizobiales*, ou seja, como um grupo supra-específico mais próximo deste grupo monofilético, confirmando o padrão *16S rRNA*. Tal fato pode ser verificado entre os táxons dos gêneros *Roseomonas* (*R. genomospecies*, *R. gilardii* e *R. fauriae*), apresentando proximidade filogenética com os gêneros *Azospirillum* (*A. brasilense*) e *Glucocetobarter* (*G. diazotrophicus* e *G. johannae*) ambos pertencentes à classe *Rhodospirillales*.

A análise do gene *nifD* (Figura 6) demonstra que os representantes da ordem *Burkholderiales* (*Betaproteobacteria*), as espécies *Burkholderia tuberum*, *Burkholderia tropica* e *Herbaspirillum seropedicae* apresentam sinapomorfias com espécies de *Alphaproteobacteria*, incluindo integrantes das classes *Rhodospirillales*: *Glucacetobacter azotocaptans* e *Azospirillum doebereineriae*, além de intensas

relações de parentesco entre várias espécies de *Rhizobiales*. Isso indica uma possível transferência gênica horizontal entre estes táxons, sendo mais provável que essa transferência tenha sido de *alfa* para *beta*, já que de acordo com o padrão 16S para estes táxons (Figura 5), verifica-se que todas as classes de *Alphaproteobacteria* encontram-se organizadas num mesmo clado, sem haver nesse caso a ocorrência de outros grupos da taxonomia diversa.

O gene *nifD* (Figura 6) está presente no filo *Firmicutes* e tal como o ocorrido com o gene *nifK* (Figura 4) este filo apresenta-se como o mais próximo ao grupo externo, a bactéria *Frankia alni* pertencente ao filo *Actinobacteria* seguindo o mesmo ocorrido em *nifK* verifica-se da mesma forma provável transferência gênica horizontal entre as *Firmicutes* do gênero *Clostridium* (*C. cellulolyticum* e *C. beijerinckii*) e deltaprotobactéria *Pelobacter masseliensis* (*Desulfuromonadales*), já que esta espécie encontra-se extremamente organizada filogeneticamente as outras bactérias de sua mesma ordem. Diante disso, é plausível estabelecer que esta bactéria tenha recebido via TGH este gene de linhagens ancestrais de *Firmicutes* (Figura 6).

A ordem *Desulfuromonadales* é a de maior representatividade em relação às outras classes que apresentam o gene *nifD* (Figura 6) objeto de estudo. Esta ordem pertence à classe *Deltaproteobacteria* e tal como qualquer outra protobactéria apresenta proximidade com outras ordens deste mesmo filo. Entre os gêneros desta ordem podemos destacar o gênero *Geobacter* (*G. psychrophilus*, *G. electrodiphilus*, *G. bemidjiensis*, *G. metallireducens*, *G. pelophilus*, *G. sulfurreducens*, *G. humireducens*, *G. chapelleii*, *G. grbiciae* e *G. bremensis*), o gênero *Pelobacter* (*P. acidigallici*, *P. masseliensis*, *P. carbinolicus*, *P. venetianus*, *P. propionicus* e *P. acetylenicus*), o gênero *Desulfuromonas* (*D. thiophila*, *D. palmitatis*, *D. michiganensis*, *D. acetoxidans*, *D. acetexigens*, *D. chloroethenica*), o gênero *Desulfuromusa* (*D. kysingii*, *D. succinoxidans*, *D. bakii*, *D. michiganensis*), os gêneros *Geothermobacter* (*G. ehrlichii*), *Malonomonas* (*M. rubra*) e *Trichlorobacter* (*T. thiogenes*) com seus únicos táxons representantes.

O gene *nifH* é sem dúvida alguma o gene fixador de nitrogênio mais estudado entre todos os outros genes *nif*, fato comprovado pelo grande número de seqüências disponíveis no *GenBank* para este gene. Como já foi estabelecido por MARTINEZ-ROMERO (1994) e LAGUERRE *et al.* (1996) acerca de métodos que consideram a variação genotípica e o relacionamento entre espécies de *Rhizobium* e

Bradyrhizobium baseadas nas seqüências do 16S *rRNA* (Figura 7), o presente estudo revela na análise da distribuição do gene *nifH* (Figura 8), que estes gêneros, possuem da mesma forma uma relação bem distanciada entre si, demonstrando também maior padrão de relacionamento entre *Rhizobium* e *Shinorhizobium* e entre os táxons do gênero *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*, apresentando da mesma forma maior padrão de relacionamento genotípico, confirmando o padrão 16S *rRNA*.

Verifica-se neste cladograma (Figura 8) a importância dos rizóbios na distribuição dos genes fixadores de nitrogênio, em especial do gene *nifH*. Este grupo mantém relações de proximidade filogenética com outros grupos que não são caracteristicamente simbioses de plantas, deixando claro, a importância do grupo na potencialização de transferência gênica horizontal dos genes fixadores de nitrogênio a outros diazotróficos. Assim, verifica-se proximidade entre os táxons da ordem *Rhizobiales* (*Alphaproteobacteria*) com táxons das ordens *Methylococcales* (*Gammaproteobacteria*), *Burkholderiales* (*Betaproteobacteria*) e esta proximidade merece considerações, pois na análise filogenética baseada no gene 16S *rRNA* (Figura 7) estes táxons encontram-se extremamente distantes, evidenciando o fato de que possivelmente ao longo do processo evolutivo a capacidade de fixar nitrogênio tenha sido adquirida devido a mecanismos adaptativos ou transferência gênica horizontal entre estas ordens.

A ordem *Rhizobiales* é de longe a de maior representatividade nos bancos de dados entre os táxons portadores do gene (*nifH*) em questão (Figura 8). Pode-se explicar simplesmente este fato devido a esta ordem ser a de maior interesse econômico, o que leva os microbiologistas a dedicarem-se com maior ênfase a ela. Alguns gêneros destacam-se nesta ordem, representados pelas seguintes espécies: gênero *Rhizobium* (*R. tropici*, *R. mongolense*, *R. huautlense*, *R. hainanense*, *R. gallicum*, *R. etli*, *R. daejeonense*, *R. leguminosarum*, *R. lusitanum*), gênero *Mesorhizobium* (*M. loti*, *M. amorphae*, *M. plurifarum*, *M. tianshanense*, *M. mediterraneum*, *M. ciceri*, *M. huakuii*), o gênero *Sinorhizobium* (*S. terangaie*, *S. xinjiangense*, *S. saheli*, *S. meliloti*, *S. fredii*, *S. medicae*, *S. Kostense*, *S. kummerowiae*), gênero *Bradyrhizobium* (*B. elkanii*, *B. japonicum*, *B. yuanmingense*, *B. canariense*, *B. liaoningense*, *B. genosp.*), gênero *Beijerinckia* (*B. derxii*, *B. mobilis*, *B. indica*), gênero *Methylocella* (*M. palustris*, *M. silvestris*, *M. tundrae*, *M. acidiphila*), gênero *Methylocystis* (*M. echinoides*, *M. trichosporium*, *M. rosea*), além das espécies *Phyllobacterium* sp., *Ensifer mexicanum*, *M. nodulans*, *Methylosinus sporium*,

Starkeya sp., *A. caulinodans*, *X. autotrophicus* e *P. oryzae*, as únicas representantes de seus respectivos gêneros.

Dentre os *Rhizobiales* descritos acima, alguns gêneros apresentam maior proximidade genotípica (Figura 7). É o caso dos gêneros *Beirejerinckia*, *Methylocella* e *Methylocystis* que formam juntos um único ramo, sendo este ramo ligado a outro onde estarão organizados espécies do gênero *Bradyrhizobium*. A análise do cladograma em questão (Figura 8) também demonstra que o gênero *Mesorhizobium* encontra-se alocado num mesmo ramo a *Rhizobium* e que ainda este em um ramo seguinte mantém-se próximo a *Sinorhizobium*.

A comparação entre os cladogramas do gene 16S *rRNA* (Figura 7) e do gene *nifH* (Figura 8), demonstra que a bactéria *Alcaligenes faecalis*, uma betaprotobactéria da ordem *Burkholderiales*, para o padrão 16S (Figura 7) apresenta-se organizada junto as outras espécies dessa mesma ordem, porém a análise filogenética do gene *nifH* para esses mesmos táxons possibilitou estabelecer que esta espécie apresenta sinapomorfia com *Pseudomonas stutzeri*, uma *Gammaproteobactéria*. Assim diante dos fatos, podemos estabelecer que estas duas espécies possivelmente trocaram material genético, via TGH, onde provavelmente a primeira deva ter recebido da segunda o referido gene.

Apesar de o gene *nifH* ser o de maior representatividade entre os três gene *nif* estudados, este gene não apresenta representantes do ordem *Desulfuromonadales*, não sendo possível dessa forma o estabelecimento de TGH neste gene envolvendo o táxon *Pelobacter massiliensis* e outros táxons de *Firmicutes*.

Para o gene *nifH*, *Gammaproteobactéria* e *Betaproteobactéria* apresentam-se como os grupos mais próximos a *Firmicutes* (Figura 8). Pode ser que para esse gene estes filós tenham por um processo de transformação adquirido este gene via TGH, já que o padrão 16S demonstra que *Gammaproteobactéria* e *Betaproteobactéria* constituem um grupo extremamente organizado, sustentado por um ramo único no cladograma (Figura 7).

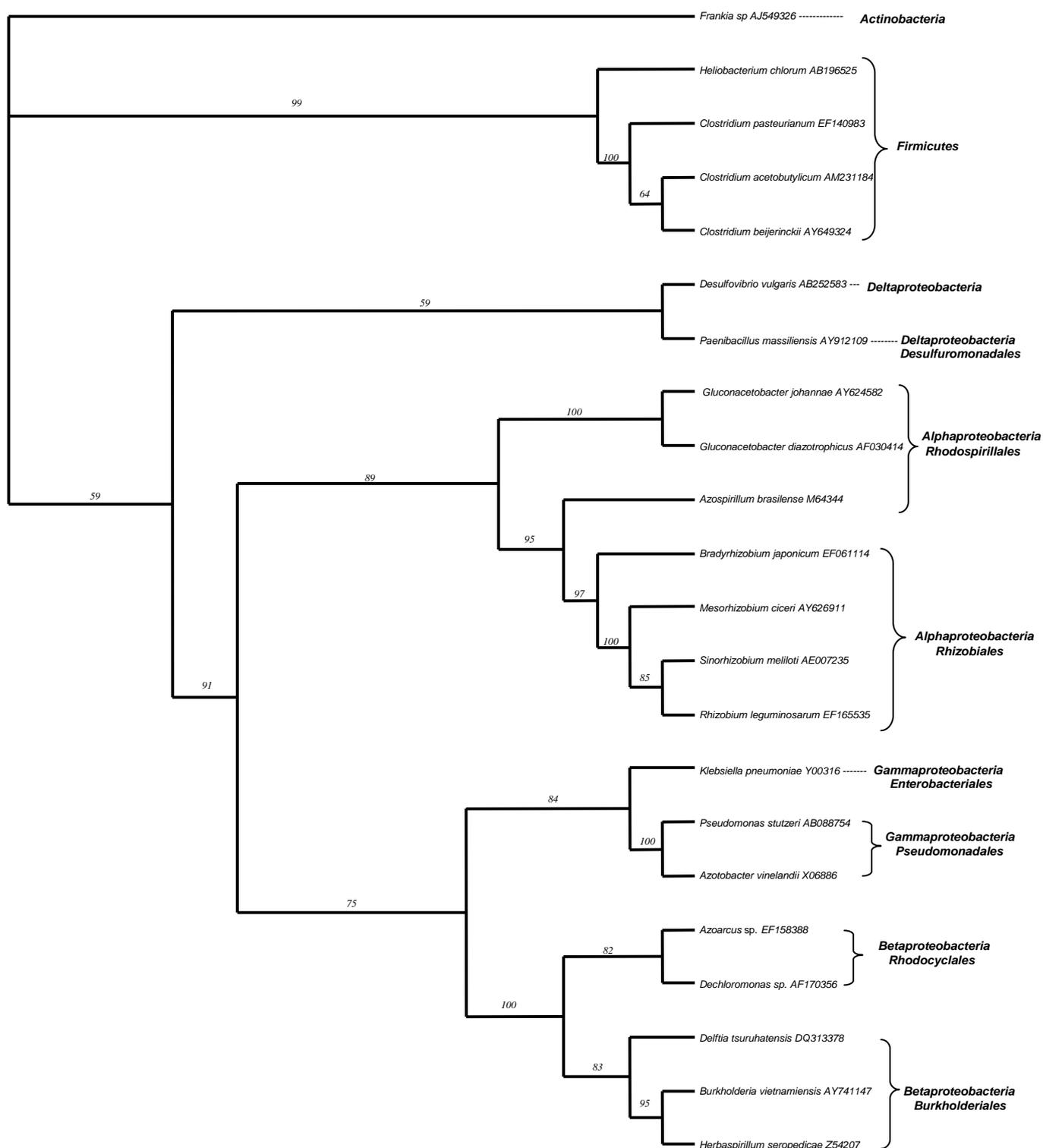


Figura 3 – Árvore filogenética *consenso estrito* do gene 16S rRNA de bactérias diazotróficas portadoras do gene nifK (\approx 1500 nucleotídeos)

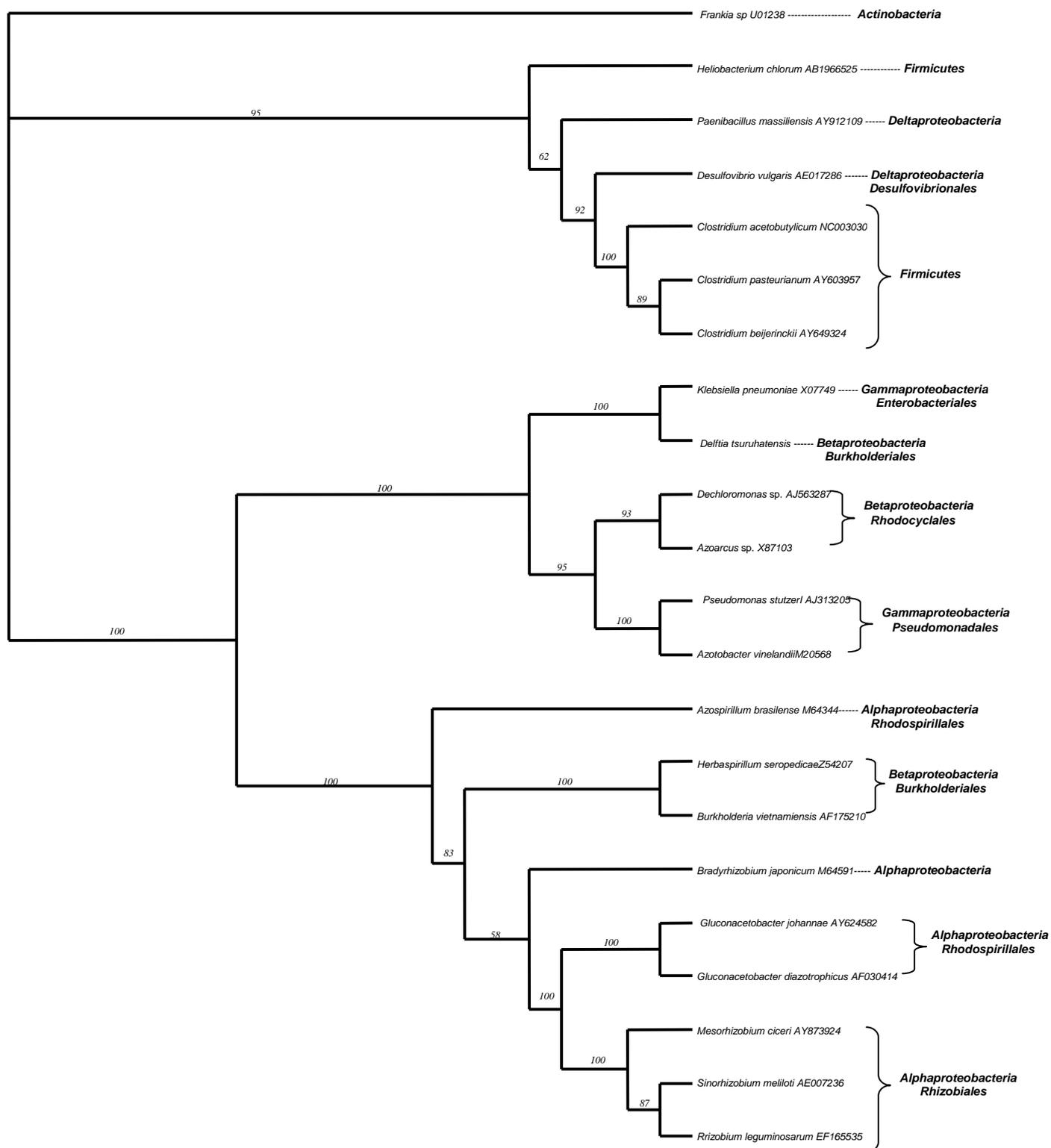


Figura 4 – Árvore filogenética consenso estrito de bactérias diazotróficas portadoras do gene *nifK* (\approx 1400 nucleotídeos)

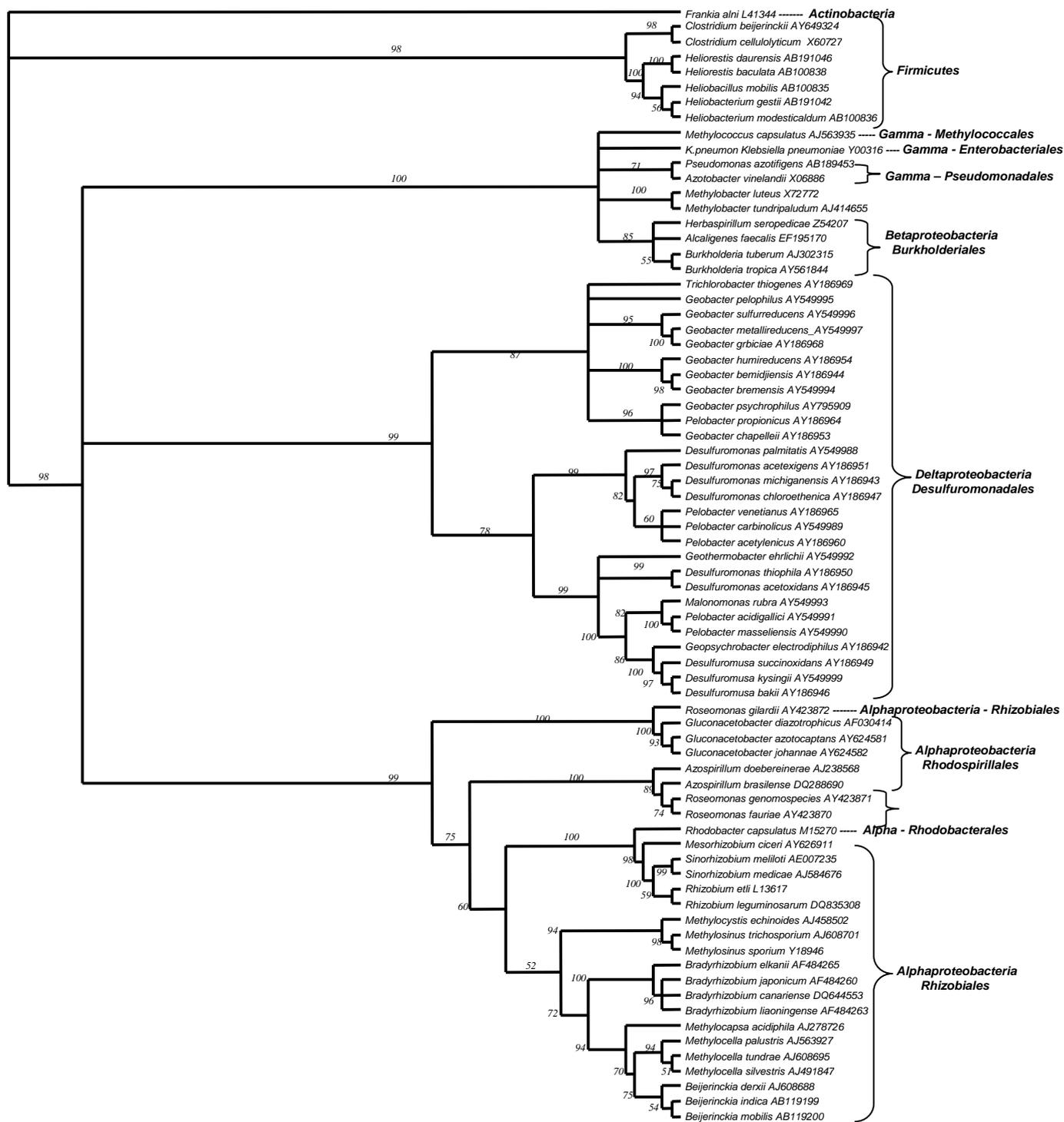


Figura 5 – Árvore filogenética consenso estrito do gene 16S rRNA de bactérias diazotróficas portadoras do gene *nifD* (≈ 1500 nucleotídeos)

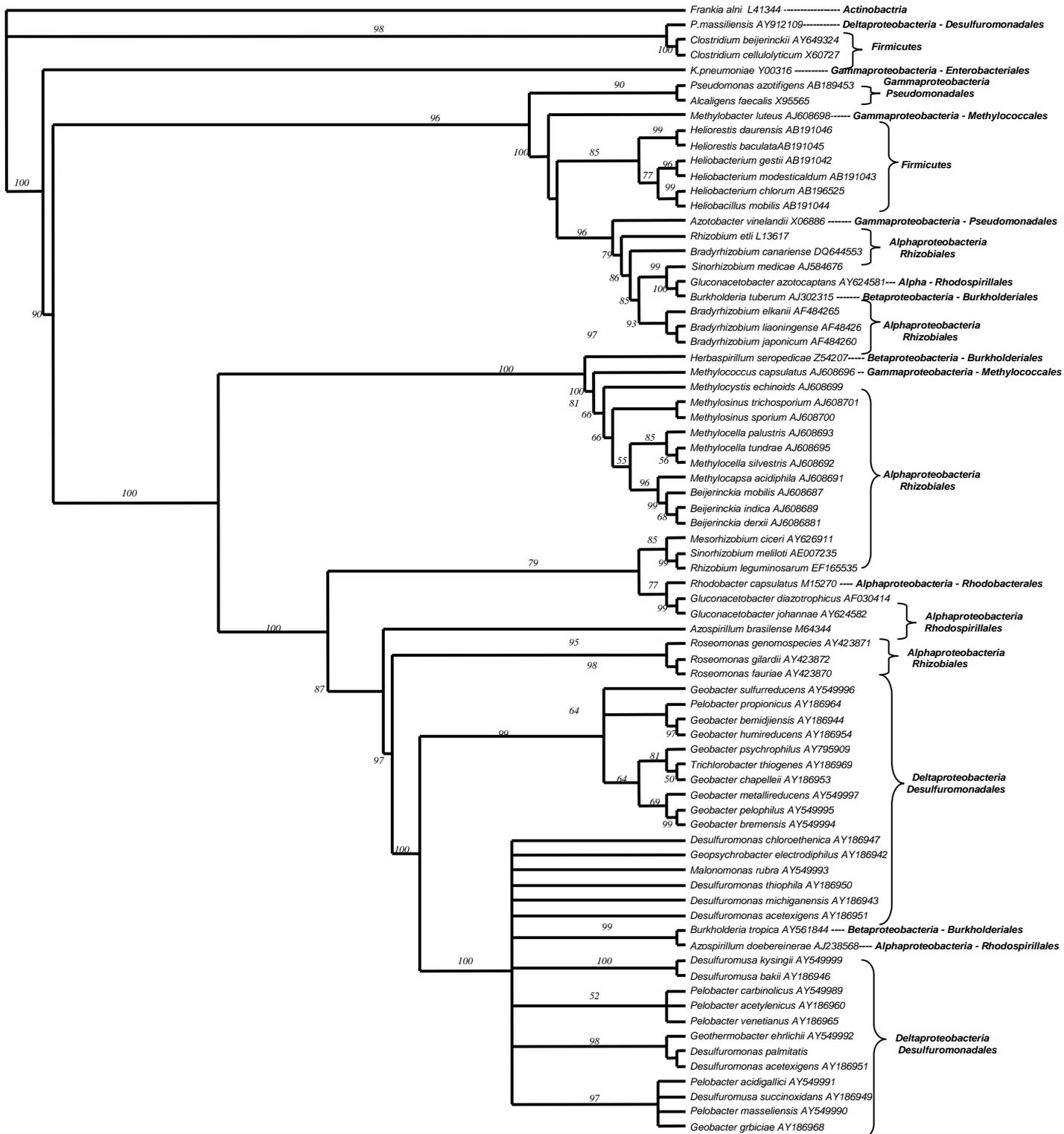


Figura 6 – Árvore filogenética consenso estrito de bactérias diazotróficas portadoras do gene *nifD* (≈ 1050 nucleotídeos)

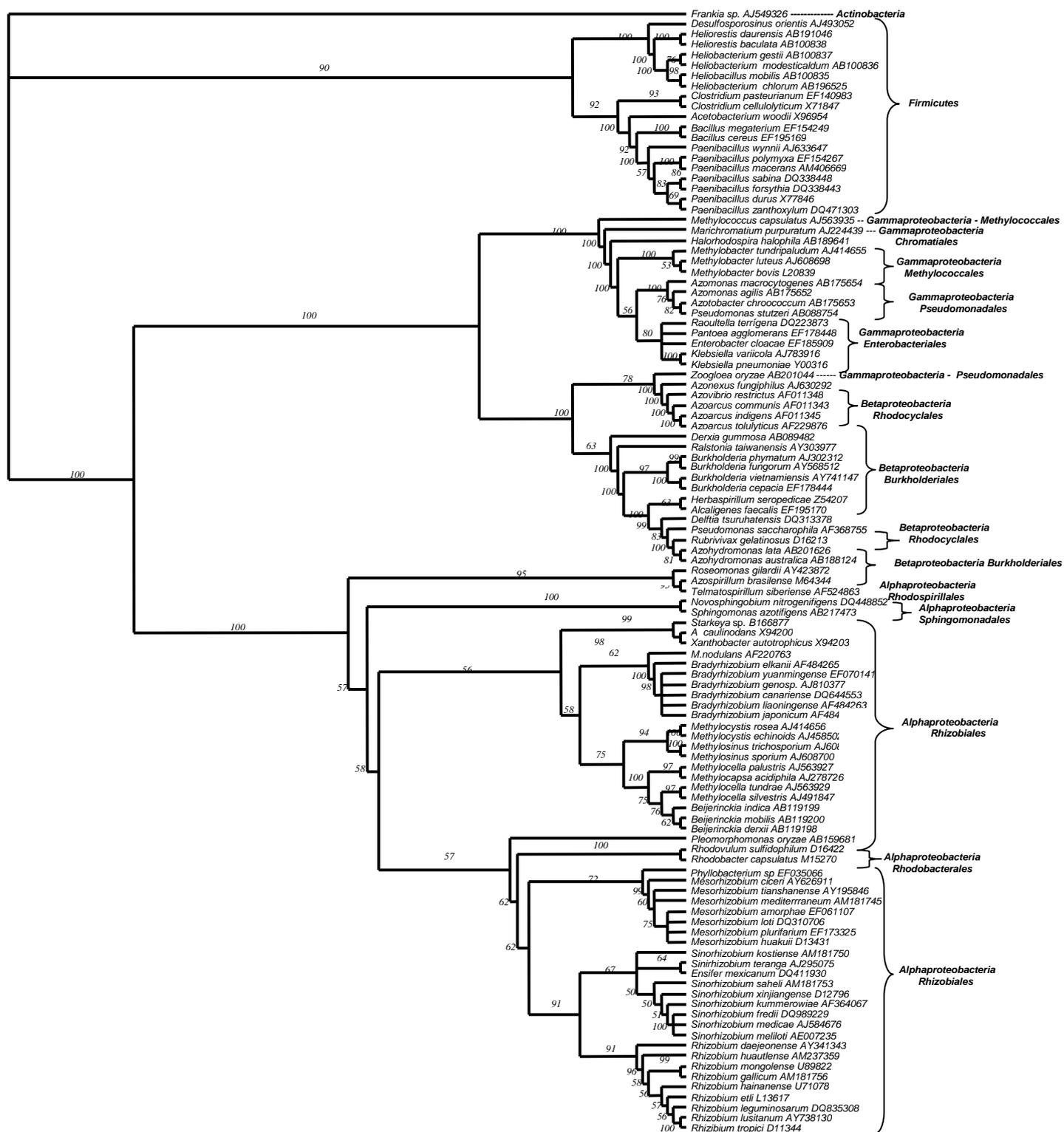


Figura 7 – Árvore filogenética consenso estrito do gene 16S rRNA de bactérias diazotróficas portadoras do gene nifH (\approx 1500 nucleotídeos)

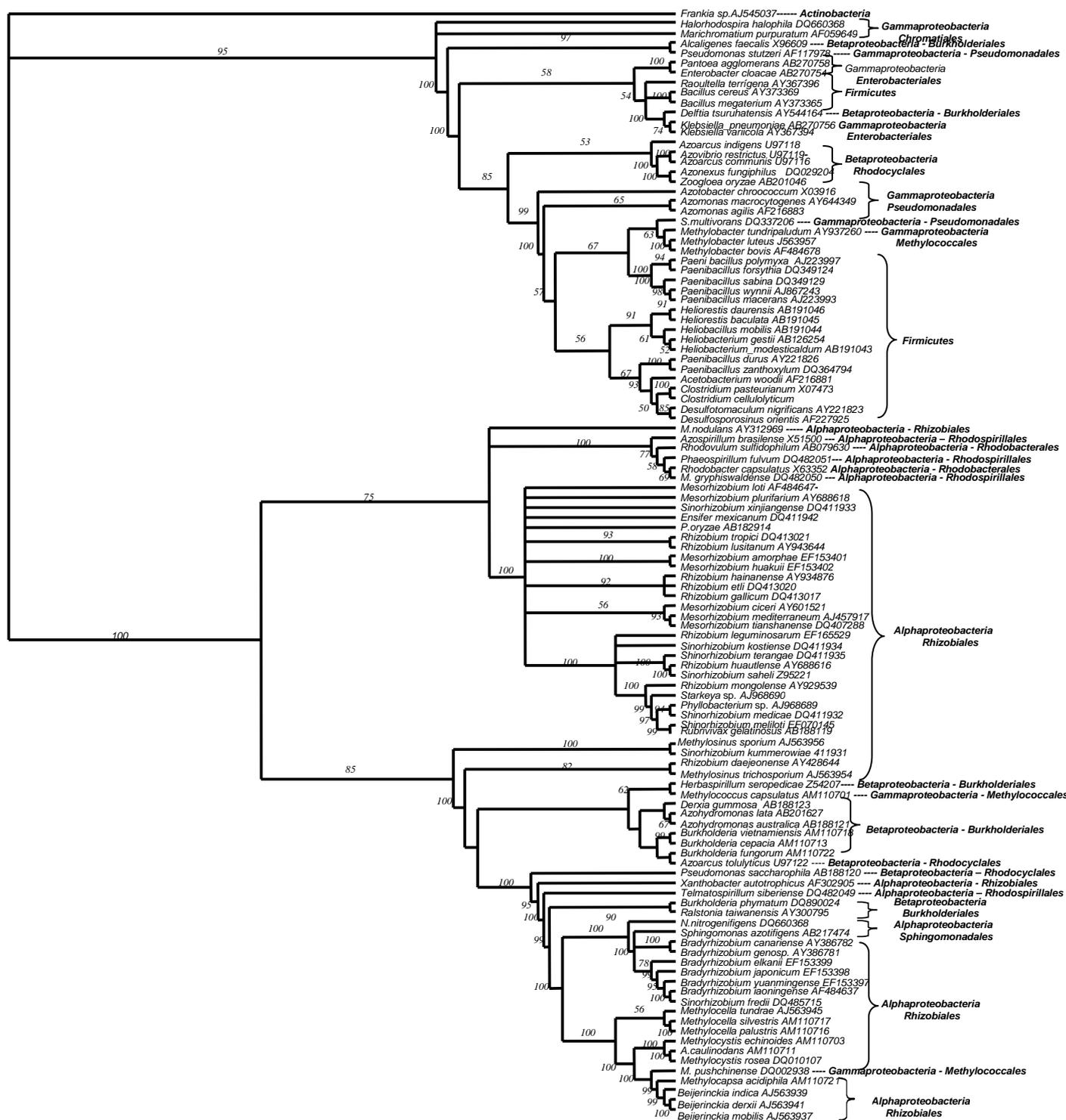


Figura 8 – Árvore filogenética consenso estrito de bactérias diazotróficas portadoras do gene *nifH* (\approx 380 nucleotídeos)

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- Pode ter ocorrido transferência gênica horizontal do gene *nifK* e *nifD* de *Alphaproteobacteria* para *Burkholderia vietnamensis* e *Herbaspirillum seropedicae* (*Betaproteobacteria*);
- Pode ter ocorrido transferência gênica horizontal dos genes *nif* fixadores de nitrogênio entre os táxons da ordem *Rhizobiales* (*Alphaproteobacteria*) e *Burkholderiales* (*Betaproteobacteria*) já que estas duas ordens encontram-se próximas em todas as árvores filogenéticas propostas para a distribuição dos genes *nif*, ao contrário da filogenia do gene *16S rRNA* para estes táxons;
- Pode ter ocorrido transferência gênica horizontal para os genes *nifK* e *nifD* entre *Firmicutes* principalmente do gênero *Clostridium* (*C. cellulolyticum* e *C. beijerinckii*) e *Deltaproteobacteria*;
- Pode ter ocorrido transferência gênica horizontal do gene *nifD* entre os representantes da ordem *Burkholderiales* (*Betaproteobacteria*), com espécies de *Alphaproteobacteria* sendo mais provável que essa transferência tenha sido de *alfa* para *beta*, já que de acordo com o padrão *16S* para estes táxons, verifica-se que todas as classes de *Alphaproteobacteria* encontram-se organizadas num mesmo clado, sem haver nesse caso a ocorrência de outros grupos da taxonomia diversa.
- Pode ter ocorrido transferência gênica horizontal do gene *nifH* entre a bactéria *Alcaligenes faecalis* (*Betaproteobacteria*) da ordem *Burkholderiales* e *Pseudomonas stutzeri* (*Gammaproteobacteria*), onde provavelmente a primeira deva ter recebido da segunda o referido gene.
- Pode ter ocorrido transferência gênica horizontal do gene *nifH* entre *Firmicutes* e espécies de *Gammaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* já que o padrão

16S demonstra que *Gammaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* constituem um grupo extremamente organizado, sustentado por um ramo único no cladograma.

6. REFERÊNCIAS

- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.47, n.4, p.996-1006, 1997.
- AMORIM, D. **Elementos Básicos de Sistemática Filogenética**. Ribeirão Preto. Holos editora. 1997.
- ANDERS, H.-J. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K172 and KB740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.45, n.2, p.327-333, 1995.
- ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.11, p.4016-4021, 1995
- ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, U. B. & PÜHLER, A. Nucleotide sequence of 24,206 base pair fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **Jornal of Molecular Biology**. 203:715-738, 1988.
- BAKER, D.D.; MULLIN, B.C. Actinorhizal symbioses. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J., ed. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman, 1992 p.259-292.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing

bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.36, n.1, p 86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.911-922, 1997a.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMAN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Hesbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.46, n.3, p.802-810, 1996.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, n.8, p.869-881, 1983.

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.69, n.1, p.116, 1997b.

BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the ¹⁵N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, n.8, p.1036-1045, 1983.

BROWN, J. **Ancient Horizontal Gene Transfer**. *Nature Reviews-Genetics*,4: 121-132. 2003

- BRUNELL, B.; ROME, S.; CLEYET-MAREL, J.C. Symbiotic and genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* populations associated with *Medicago* spp. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E., ed. **Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century**; proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation, Institut Pasteur, Paris, France, July 20-25, 1997. Dordrecht: Kluwer, 1998. p.585. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, v.31).
- BULL, A.T.; WARD, A. C.; GOOD FELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Washington, DC, v. 64, p. 573-606, 1992.
- BURNES, R. C. & HARDY, R.W.F. **Nitrogen fixation in bacteria and higher plants**. Springer-Verlag, Berlin, 1975.
- BUSHMAN, F. Lateral DNA Transfer: Mechanisms and Consequences. (Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press 2003. 448p.
- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar-cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, n.1, p.23-31, 1988.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.38, n.4, p.392-397, 1988.
- CHEN, W.X.; TAN, Z.Y.; GAO, J.L.; LI, Y.; WANG, E.T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.47, n.3, p.870-873, 1997
- DAMS, E.; HENDRIKS, L.; VAN DE PEER, Y.; NEEFS, J-M.; SMITS, GEERT.; VANDENBEMPT, I.; WACHTER, R. **Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences**. Nucleic Acids Res., v. 16, p. 87-173, 1988. DAMS ET AL., 1988

DeLAJUDIE, P.; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal Systematic of Bacteriology**, Baltimore, v.44, p.715-733, 1994.

DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKBRANDT, E. & SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *Largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum lagomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**. 20:72-77. 1997.

DEMANÈCHE, S.; BERTOLLA, F.; BURET, F.; NALIN, R.; SAILLAND, A.; AURIOL, P.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.3440-3444, 2001.

DI FIORI, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. Ed. **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, p. 169-187, 1995.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Rio de Janeiro, v.1, p.261-272, 1958.

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, n.3, p.251-258, 1959.

DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II-Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.401-412, 1959.

- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp.n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.1, p.357-365, 1966.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J., ed. **Nitrogen fixation**; proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Pullman: Washington State University, 1975. v.2. p. 518-538.
- DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.22, n.10, p.1464-1473, 1976.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.34, n.7, p.869-881, 1982.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Springer-Verlag, 1987. 155p.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; REIS, V.M. Endophytic diazotrophs: The key to graminaceous plants. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MORRIB, M., eds. **Nitrogen fixation with non-legumes**. Cairo: The American University, 1994, p.395-408.
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, Angra dos Reis, 1995. **Abstracts...** Angra dos Reis: The National Centre for Agrobiological Research (Embrapa-CNPAB), 1995. p.3-4.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 1995, 60p.

- DOOLITTLE, R. F. The Case of Gene Transfer between very Distantly Related Organisms. In: M. SYVANEN; C.I. KADO. (Ed.). *Horizontal Gene Transfer*. Chapman and Hall, London, United Kingdom 1998. 311p.
- DREYFUS, B.; DOMMERGUES, Y.R. Nitrogen-fixing nodules induced by Rhizobium on the stem of the tropical legume, *Sesbania rostrata*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.10, p.313-317, 1981.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.38, n.1, p.89-98, 1988.
- ELKAN, G.H.; KUYKENDALL, L.D. Energy metabolism in Rhizobium. In: BROUGHTON, W.J. ed. **Ecology of nitrogen fixation**. Oxford: Oxford University Press, 1981. p.145-166.
- ELKAN, G.H.; BUNN, C.R. The Rhizobia. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. eds. **The prokaryotes**. 2ed., v.3 New York: Springer-Verlag, 1992, p.2197-2213.
- EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.0
- FERREIRA, A.C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A.R.V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, Angra dos Reis, 1995. **Abstracts...** Angra dos Reis: The National Centre for Agrobiological Research (Embrapa-CNPAB), 1995. p.210.

- FOX, G. E.; PECKMAN, K. J.; WOESE, C. R. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *Inst. J.Syst. Bacteriol*, v. 27, p. 44-57, 1977. FOX, PECKMAN E WOESE, 1977
- FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, São Paulo, v.20, n.1, p.68-74, 1994.
- GAUTHIER, D.L.; DIEM, H.G.; DOMMERGUES, Y. In vitro nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from Casuarina nodules. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.41, n.1, p.306-308, 1981.
- GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, P.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationship between (*Pseudomonas*) *Rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *Autotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VICENZINI, M. eds. **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991, p.293-294.
- HAAHTELA, K.; WAARTIOVAARA, T.; SUNDMAN, V.; SKUJINS, J. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold climate spodosols. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.41, n.1, p.203-206, 1981.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* v. 35, p. 1–21, 1998.
- HEIJNEN, C.E.; BURGERS, S.C.G.E.; VAN VEEN, J.A. Metabolic activity and population dynamics of rhizobia introduced into unamended and bentointeamended loamy sand. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.3, p.743-747, 1993.

- HIRSCH, P.R.; JONES, M.J.; MC GRATH, S.P.; GILLER, K.E. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii populations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.25, n.11, p.1485-1490, 1993.
- HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, C.; HERSHBERGER, K. L.; PACE, N. R. **Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring**. *J. Bacteriol.*, v. 180, p. 366-76, 1998a. HUGENHOLTZ ET AL., 1998^A
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Effects of high temperatures on nodulation and N₂ fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 149, n. 1, p. 95-102, 1993.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Identification of *Azoarcus* spp grass-associated diazotrophs, by analysis of partial 16S rRNA sequences. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M. **Nitrogen fixation with non-legumes**. Cairo: The American University, 1994. p.59-68.
- JARVIS, B.D.W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tiashanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.47, n.3, p.895-898, 1997.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.32, n.1, p.136-139, 1982.
- JORDAN, D.C. Rhizobiaceae. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.1 Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, p.234-256.

- KAHINDI, J. H. P. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of nitrogen fixing bacteria. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 6, p. 55-76, 1997.
- KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research Microbiology**, Paris, v.140, p.679-693, 1989.
- KITCHING, I.J.; P.L. FOREY; C.J. HUMPHRIES & D.M. WILLIAMS. 1998. **Cladistics: The theory and practice of parsimony analysis**. New York, Oxford University Press, II+228p.
- KUSS-DANEL, K. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. **New Phytologist**, New York, v.136, n.3, p.375-405, 1997.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan. 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.38, n.6, p.501-505, 1992.
- LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROWN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relation ship among *Phaseolus vulgaris* simbiotes. **Microbiology**, Reading, v. 174, p. 981-993; 1996.
- LINDSTROM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legumes root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.39, n.3, p.365-367, 1989.
- LINDSTROM, K.; LAGUERRE, G.; NORMAND, P.; RASMUSSEN, U.; HEULIN, T.; JARVIS, B.D.W.; DE LAJUDIE, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CHEN, W.-X. Taxonomy and phylogeny of diazotrophs. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. eds. **Biological Nitrogen Fixation for the 21st century**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.559-570.

- LINDSTRÖM, K.; VAN BERKUM, P.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ, E.; NOVIKOVA, N.; JARVIS, B. Report from the roundtable on rhizobium taxonomy. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, N.A., ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. eds. **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p.807-810.
- LOHNIS, F.; HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **Journal Agricultural Research**, Washington, v.20, p.543-556, 1921.
- LUDDEN P. W. Nif gene products and their roles in nitrogen fixation. **Current in Plant Science Biotechnology and Agriculture**, 17:101-104, 1993.
- MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M. KUYKENDALL, J. R. & DOBEREINER, J.. A new acid-tolerant *Azospirillum* species (Bacterium, nitrogen fixation, soil, microorganism). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 55:417-430. 1983)
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v.15, p.113-140, 1996.
- McINROY, J.A.; KLOPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.173, n.2, p.337-342, 1995.
- MILLER, I.M.; BAKER, D.D. Nodulation of actinorhizal plants by *Frankia* strains capable of both root hair infection and intercellular penetration. **Protoplasma**, New York, v.131, n.1, p.82-91, 1986.
- MORGANTE, P. G.. Fixação Biológica e Assimilação de Nitrogênio. 1997. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- NIELSEN, K. M.; GEBHARD, F.; SMALLA, K.; BONES, A.M.; VAN ELSAS, J. D. Evaluation of Possible Horizontal Gene Transfer from Transgenic Plants to the

Soil Bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413. Theoretical and Applied Genetics, v.95, p.815-821, 1997.

NIELSEN, K. M.; VAN ELSAS, J. D.; SMALLA, K. Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413(pFG4?nptII) with Transgenic Plant DNA in Soil Microcosms and Effects of Kanamycin on Selection of Transformants. Applied and Environmental Microbiology, v.66, p.1237-1242, 2000.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral Gene Transfer and the Nature of Bacterial Innovation. Nature, v.405, p.299-304, 2000.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field incubation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, n.12, p.1591-1601, 1994.

OLSEN, G. J.; WOOSE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. J. Bacteriol., v. 176(1) p. 1–6, 1994.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J.. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. Adv. Microb. Ecol., v. 9, p. 1-55, 1986.

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

PALUS, J.A.; BORNEMAN, J.; LUDDEN, P.W.; TRIPLETT, E.W. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Ilts and Doebley. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.186, n.1, p.135-142, 1996.

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.141, n.1, p.13-39, 1992.

- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.C.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grasses leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.137, n.1, p.61-65, 1991.
- RAO, A.V.; VANKATESWARLU, B. Associative symbiosis of *Azospirillum lipoferum* with dicotyledonous succulent plants of the indian desert. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.28, n.7, p.778-782, 1982.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; NIEMAN, E.G.; FENDRIK, I. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zone of Kallar grass. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.3, p.520-526, 1986.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogenfixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.37, n.1, p.43-51, 1987.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; VLAEYSSSENS, M.; VAN MONTAGU, M. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.175, n.21, p.7056-7065, 1994.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Diazotrophs repeatedly isolated from roots of Kallar grass form a new genus, *Azoarcus*. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L.E.; STACEY, G.; NEWTON, W.L. eds. **Nitrogen fixation: achievements and objectives**. New York: Chapman and Hall, p.432, 1990.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Azoarcus* gen. Nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis*

sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.43, n.3, p.574-584, 1993.

RENNIE, R.J. Dinitrogen-fixing bacteria: computer assisted identification of soil isolates. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.26, n.11, p.1275-1283, 1980.

RUPPEL, S.; HECHT-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, U.; SCHMELZER, R. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISE and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.145, n.2, p.261-273, 1992.

SALZBERG, S. L.; WHITE, O.; PETERSON, J.; EISEN, J. A. Microbial Genes in the Human Genome: Lateral Transfer or Gene Loss? *Science*, v.292, p.1903-1906, 2001.

SCHENK, H.E.A. Cyanobacterial symbioses. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H..G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.-H. **The prokaryotes** – A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2ed. vol IV New York: Springer-Verlag, 1992, p.3819-3854.

SEGOVIA, L. YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains in a new species, *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.43, n.2, p.374-377, 1993.

SMALLA, K.; BORIN, S.; HEUER, H.; GEBHARD, F., VAN ELSAS, J. D.; NIELSEN, K. Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes from Transgenic Plants to Bacteria – Are there New Data to Fuel the Debate? *In*: C. Fairban, G. Scoles, A. McHughen (Eds.). Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms: 146-154, 2000.

- SOKAL, Q.N.; ROHLF, F.J. *Biometry* Freeman, San Francisco, 859p. 1981
- SPRENT, J.I. Which steps are essential for the formation of functional legume nodules. **New Phytologist**, New York, v.111, n.2, p.129-153, 1989.
- SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms**. London: Chapman and Hall, 2ed., 1990. 256p.
- STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. 943p.
- STOLTZFUS, J.R.; MALARVITHI, P.P.; LADHA, J.K.; BRUJIN, F.J. de. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, n.1, p.25-36, 1997.
- STREICHER, S. L.; GURNEY, E. G.; VALENTINE, R. C. **The nitrogen fixation genes**. *Nature*. 26:389-426, 1972.
- SWOFFORD D.L. 2001. **Paup 4.0b10 for 32-bit Microsoft Windows: Phylogenetics analysis using parsimony and other methods**. Sunderland, Sinauer.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.24, n.8, p.967-980, 1978.
- TRINICK, M.J. Structure of nitrogen-fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.25, n.5, p.565-578, 1979.

- TRINICK, M.J.; HADOBAS, P.A. Competition by *Bradyrhizobium* strains for nodulating of the nonlegume *Parasponia andersonii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.5, p.1242-1248, 1989.
- VAN DE PEER, Y.; CHAPELLE, S.; De WACHTER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res*, v. 24, n 17, p. 3381-3391, 1996.
- VAN DER WIELEN, P. W.; BOLHUIS, H.; BORIN, S.; DAFFONCHIO, D.; CORSELLI, C.; GIULIANO, L.; D'AURIA, G.; de LANGE, G. J.; HUEBNER, A.; VARNAVAS, S. P.; THOMSON, J.; TAMBURINI, C.; MARTY, D.; MCGENITY, T. J.; TIMMIS, K. N. The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science*, v. 7, p. 121-123, 2005. VAN DER WIELEN ET AL., 2005
- WILLIAMS & WILKINS, 1984. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**.
- WOESE, C. R.; GUTELL, R.; GUPTA, R.; NOLLER, H. F. **Detailed Analysis of the Higher-Order Structure of 16S-Like Ribosomal Ribonucleic Acids**. *Microbial Rev*, v. 47, n^o4, p. 621-669, 1983.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. **Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria e Eucarya**. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v. 87, p. 4576-4579, 1990.
- WOLFF, A.B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H.; WERNER, D. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.12, n.3, p. 170-176, 1991.
- WONG, P.; STENBERG, N.E. Characterization of *Azospirillum* isolated from nitrogen-fixing roots of harvested sorghum plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.38, n.6, p.1189-1191, 1979.

- XU, L.M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.45, n.4, p.706-711, 1995.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.36, p.1251-1275, 1992.
- 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. Ecol.*, 107:115-120, 1993.
- YOU, C.; ZHOU, F. Non-nodular endorhizosphere nitrogen fixation in wetland rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.35, n.3, p.403-408, 1989.
- YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, New York, v.133, n.1, p.87-94, 1996.
- YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strain BTAi by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol*, Washington, v. 173, p. 2271-2277, 1991.
- YOUNG, M. I.; CRAWFORD, J. W. Interactions and self-organization in the soilmicrobe complex. *Science*, v. 304, p. 1634-1637, 1994.
- ZHOU, J.; FRIES, M.R.; CHEE-SANFORD, J.C.; TIEDJE, J.M. Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus toluolyticus* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.45, n.3, p.500-506, 1995.

7. ANEXOS

ANEXO I.....	76
ANEXO II.....	77
ANEXO III.....	83

**ANEXO I - ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NO GENE
16S *rRNA* DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS OBJETOS
DE ESTUDO**

ANEXO II - RELAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS DO GENE 16S *rRNA* DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS OBTIDAS NO GENBANK

SEQÜÊNCIAS 16S *rRNA*

ESPÉCIES	Nº DE ACESSO
1. <i>A. agilis</i>	AB175652
2. <i>A. australica</i>	AB188124
3. <i>A. brasilense</i>	X79739
4. <i>A. caulinodans</i>	X94200
5. <i>A. chroococcum</i>	AB175653
6. <i>A. communis</i>	AF011343
7. <i>A. cylindrica</i>	AJ630414
8. <i>A. doebereineriae</i>	AJ238567
9. <i>A. faecalis</i>	EF195170
10. <i>A. fungiphilus</i>	AJ630292
11. <i>A. indigens</i>	AF011345
12. <i>A. lata</i>	AB201626
13. <i>A. lipoferum</i>	DQ787330
14. <i>A. macrocytogenes</i>	AB175654
15. <i>A. nitrofigilis</i>	L14627
16. <i>A. oryzae</i>	DQ863512
17. <i>A. restrictus</i>	AF011348
18. <i>A. tolulyticus</i>	AF229876
19. <i>A. vinelandii</i>	EF100155
20. <i>A. woodii</i>	X96954
21. <i>Anabaena</i> sp.	DQ294214
22. <i>Azoarcus</i> sp.	EF158388
23. <i>B. canariense</i>	AB195986
24. <i>B. cepacia</i>	EF178444
25. <i>B. cereus</i>	EF195169
26. <i>B. derxii</i>	AB119198
27. <i>B. elkanii</i>	AB231916

28. <i>B. fungorum</i>	AY568512
29. <i>B. genosp.</i>	AJ810377
30. <i>B. indica</i>	AB119199
31. <i>B. japonicum</i>	EF394156
32. <i>B. liaoningense</i>	EF070138
33. <i>B. megaterium</i>	EF154249
34. <i>B. mobilis</i>	AB119200
35. <i>B. phymatum</i>	AJ302312
36. <i>B. tropica</i>	EF139183
37. <i>B. tuberum</i>	AJ302311
38. <i>B. vietnamiensis</i>	AY741147
39. <i>B. yuanmingense</i>	EF070141
40. <i>C. acetobutylicum</i>	AM231184
41. <i>C. beijerinckii</i>	AB020191
42. <i>C. cellulolyticum</i>	X71847
43. <i>C. desertica</i>	AM230699
44. <i>C. pasteurianum</i>	EF140983
45. <i>C. stagnale</i>	AJ133163
46. <i>Cyanothece sp.</i>	AF296872
47. <i>D. acetexigens</i>	U23140
48. <i>D. acetoxidans</i>	AY187305
49. <i>D. africanus</i>	X99236
50. <i>D. baculatum</i>	AJ277894
51. <i>D. bakii</i>	X79412
52. <i>D. chloroethenica</i>	U49748
53. <i>D. curvatus</i>	M34413
54. <i>D. dehalogenans</i>	L28946
55. <i>D. gummosa</i>	AB089482
56. <i>D. kysingii</i>	X79414
57. <i>D. latus</i>	AJ441315
58. <i>D. michiganensis</i>	AF357915
59. <i>D. multivorans</i>	X82931
60. <i>D. Nigrificans</i>	AY742958

61. <i>D. orientis</i>	AJ493052
62. <i>D. palmitatis</i>	U28172
63. <i>D. salexigens</i>	M34401
64. <i>D. succinoxidans</i>	X79415
65. <i>D. thiophila</i>	Y11560
66. <i>D. tsuruhatensis</i>	DQ313378
67. <i>D. vulgaris</i>	AB294142
68. <i>Dechloromonas</i> sp.	AF170356
69. <i>E. cloacae</i>	EF185909
70. <i>E. mexicanum</i>	DQ411930
71. <i>F. muscicola</i>	AB039003
72. <i>Frankia</i> sp.	AJ549326
73. <i>G. azotocaptans</i>	AY958232
74. <i>G. bemidjiensis</i>	AY187307
75. <i>G. bremensis</i>	U96917
76. <i>G. chapelleii</i>	U41561
77. <i>G. diazotrophicus</i>	AY230816
78. <i>G. ehrlichii</i>	AY155599
79. <i>G. electrodiphilus</i>	AY187304
80. <i>G. grbicum</i>	AF335183
81. <i>G. humireducens</i>	AY187306
82. <i>G. johannae</i>	AF111841
83. <i>G. metallireducens</i>	L07834
84. <i>G. pelophilus</i>	U96918
85. <i>G. psychrophilus</i>	AY653549
86. <i>G. sulfurreducens</i>	U13928
87. <i>H. baculata</i>	AB100838
88. <i>H. chlorum</i>	M11212
89. <i>H. daurensis</i>	AF079102
90. <i>H. gestii</i>	AB100837
91. <i>H. halophila</i>	AJ278688
92. <i>H. maura</i>	AJ271864
93. <i>H. mobilis</i>	AB100835

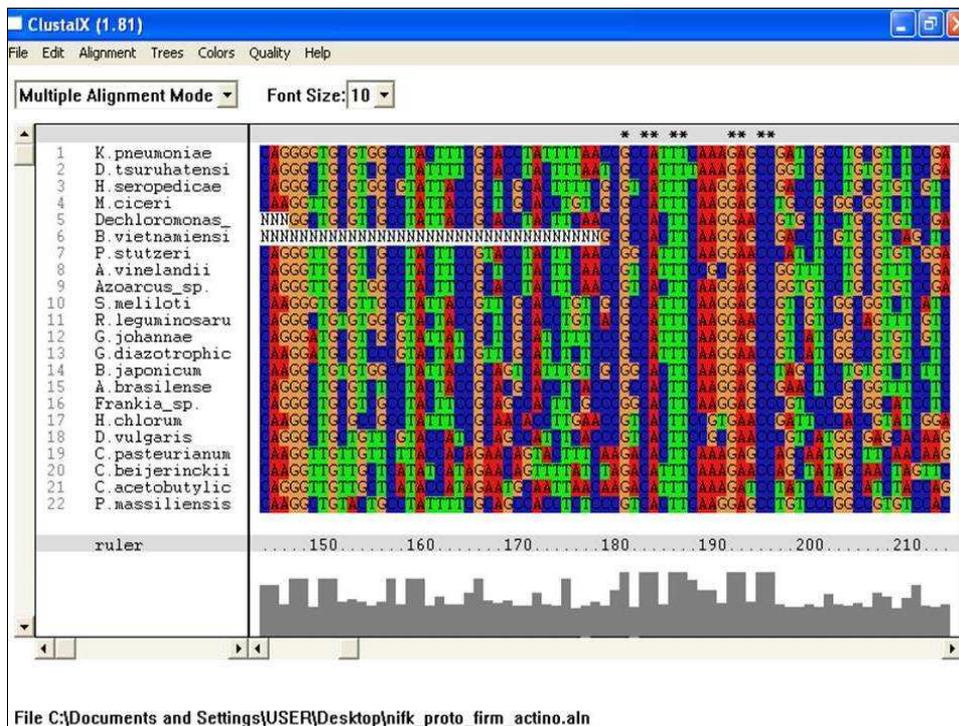
94. <i>H. modesticaldum</i>	AB100836
95. <i>H. seropedicae</i>	AY486380
96. <i>K. pneumoniae</i>	EF091148
97. <i>K. variicola</i>	AJ783916
98. <i>M. acidiphila</i>	AJ278726
99. <i>M. amorphae</i>	EF061107
100. <i>M. bovis</i>	L20839
101. <i>M. capsulatus</i>	AJ563935
102. <i>M. ciceri</i>	AY904731
103. <i>M. echinoids</i>	AJ458502
104. <i>M. huakuii</i>	D13431
105. <i>M. loti</i>	DQ310706
106. <i>M. luteus</i>	X72772
107. <i>M. mazei</i>	AB065296
108. <i>M. mediterraneum</i>	AM181745
109. <i>M. nodulans</i>	AF220763
110. <i>M. palustris</i>	AJ563927
111. <i>M. plurifarum</i>	EF173325
112. <i>M. purpuratum</i>	AJ224439
113. <i>M. rosea</i>	AJ414656
114. <i>M. rubra</i>	Y17712
115. <i>M. silvestris</i>	AJ491847
116. <i>M. sporium</i>	Y18946
117. <i>M. tianshanense</i>	AY195846
118. <i>M. trichosporium</i>	AJ868424
119. <i>M. tundrae</i>	AJ563929
120. <i>M. tundripaludum</i>	AJ414655
121. <i>N. nitrogenifigens</i>	DQ448852
122. <i>P. acetylenicus</i>	X70955
123. <i>P. acidigallici</i>	X77216
124. <i>P. agglomerans</i>	EF178448
125. <i>P. azotifigens</i>	AB189452
126. <i>P. carbinolicus</i>	U23141

127. <i>P. durus</i>	X77846
128. <i>P. forsythia</i>	DQ338443
129. <i>P. fulvum</i>	AF508113
130. <i>P. macerans</i>	AM406669
131. <i>P. masseliensis</i>	AY187308
132. <i>P. oryzae</i>	AB159681
133. <i>P. polymyxa</i>	EF154267
134. <i>P. propionicus</i>	X70954
135. <i>P. sabina</i>	DQ338448
136. <i>P. saccharophila</i>	AF368755
137. <i>P. stutzeri</i>	AB088754
138. <i>P. venetianus</i>	U41562
139. <i>P. wynnii</i>	AJ633647
140. <i>P. zanthoxylum</i>	DQ471303
141. <i>Paenibacillus</i> sp.	AY323608
142. <i>Phyllobacterium</i> sp.	EF035066
143. <i>R. capsulatus</i>	DQ342320
144. <i>R. daejeonense</i>	AY341343
145. <i>R. etli</i>	DQ648575
146. <i>R. fauriae</i>	AF533354
147. <i>R. gallicum</i>	AM181756
148. <i>R. gelatinosus</i>	D16213
149. <i>R. genomospecies</i>	AY150050
150. <i>R. gilardii</i>	AY220740
151. <i>R. hainanensis</i>	U71078
152. <i>R. huautlense</i>	AM237359
153. <i>R. leguminosarum</i>	DQ835308
154. <i>R. lusitanum</i>	AY738130
155. <i>R. mongolense</i>	U89822
156. <i>R. rhizogenes</i>	AY206687
157. <i>R. strictum</i>	AB079635
158. <i>R. sulfidophilum</i>	D16422
159. <i>R. taiwanensis</i>	AY303977

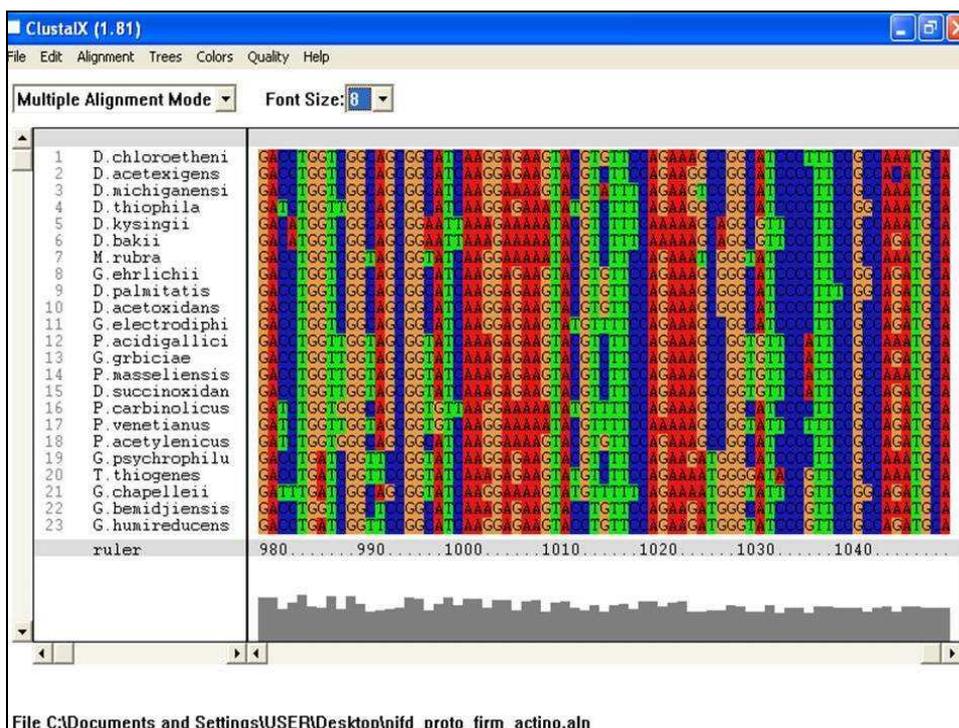
160. <i>R. terrigena</i>	DQ223873
161. <i>R. tropici</i>	D11344
162. <i>S. atlantica</i>	AB075997
163. <i>S. azotifigens</i>	AB217473
164. <i>S. fredii</i>	DQ989229
165. <i>S. kostiense</i>	AM181750
166. <i>S. kummerowiae</i>	AF364067
167. <i>S. medicae</i>	EF201801
168. <i>S. melliloti</i>	EF070136
169. <i>S. saheli</i>	AM181753
170. <i>S. terangae</i>	AJ295075
171. <i>S. xinjiangense</i>	D12796
172. <i>Starkeya</i> sp.	AB166877
173. <i>Synechococcus</i> sp.	AM259271
174. <i>T. siberiense</i>	AF524863
175. <i>T. thiebautii</i>	AF091321
176. <i>T. thiogenes</i>	AF223382
177. <i>Trichodesmium</i> sp.	X70767
178. <i>V. diazotrophicus</i>	DQ068941
179. <i>X. autotrophicus</i>	X94203
180. <i>Z. oryzae</i>	AB201044

ANEXO III – ALINHAMENTO MÚLTIPLOS DAS SEQÜÊNCIAS REALIZADOS EM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICAS PORTADORES DOS GENES NIFK (A), NIFD (B) E NIFH (C).

(A)



(B)



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)