

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - GENÉTICA E**  
**MELHORAMENTO DE PLANTAS**

Bethânia Figueiredo Barbosa de Toledo

**IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS POR SEQUENCIAMENTO**  
**PARCIAL DOS GENES 16S *rDNA* E *nifH*.**

**Jaboticabal – SP**

**2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Bethânia Figueiredo Barbosa de Toledo

**IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS POR SEQUENCIAMENTO  
PARCIAL DOS GENES 16S *rDNA* E *nifH*.**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias da  
Universidade Estadual Paulista como  
requisito parcial para obtenção de título de  
mestre em Genética e Melhoramento de  
Plantas**

**Orientadora: Prof. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**

**Jaboticabal – SP**

**2008**

T649i Toledo, Bethânia Figueiredo Barbosa de  
Identificação de estirpes de rizóbios por seqüenciamento parcial  
dos genes 16S *rDNA* e *nifH* / Bethânia Figueiredo Barbosa de Toledo.  
-- Jaboticabal, 2008  
xii, 127 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008  
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos  
Banca examinadora: Maria José Valarini, Jaime Maia dos Santos  
Bibliografia

1. SEMIA. 2. *Rhizobium spp.* 3. filogenia. I. Título. II. Jaboticabal-  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:631.461.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Bethânia Figueiredo Barbosa de Toledo

**IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS POR SEQUENCIAMENTO  
PARCIAL DOS GENES 16S *rDNA* E *nifH*.**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias da  
Universidade Estadual Paulista como  
requisito parcial para obtenção de título de  
mestre em Genética e Melhoramento de  
Plantas**

**Aprovado em 29 de outubro de 2008.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos – Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias**

---

**Profa. Dra. Maria José Valarini – Instituto de Zootecnia**

---

**Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**

*Dedico este trabalho ao amor de  
minha vida Xico e aos meus filhos  
João Ricardo e Victor.*

## AGRADECIMENTOS

Foram muitos os que me ajudaram a concluir este trabalho.

Meus sinceros agradecimentos...

...a Deus, sem sua ajuda nada seria possível;

...a minha família, pela confiança e pelo apoio;

...ao amigo João Carlos por sua força, conhecimento e disposição diante de minhas limitações;

...aos amigos do laboratório, pelas conversas e pela amizade;

...aos professores Lúcia, Ferraudó, Jaime e Maria José pelas valiosas sugestões na banca;

...à direção, aos professores e alunos que participaram deste trabalho;

...à Profa. Dra. Eliana Lemos, por aceitar a orientação deste estudo e conduzir seu desenvolvimento com muita sabedoria e paciência.

## RESUMO

A crescente demanda de alimentos causada pelo aumento populacional, aliado a alto custo de fertilizantes industrializados e impacto ambiental causado por eles leva, mundialmente, à utilização em grande escala de inoculantes de bactérias fixadoras de nitrogênio. Os inoculantes utilizados no Brasil (coleção SEMIA- IPAGRO) ainda não estão suficientemente caracterizados geneticamente. O objetivo deste trabalho foi avaliar e confrontar as seqüências parciais dos genes 16S *rDNA* e *nifH* de 26 estirpes padrões já classificadas, com 70 estirpes de rizóbios recomendadas e autorizadas para a produção de inoculantes no Brasil. Para esta finalidade, a partir das amostras de DNA extraídos destas bactérias foram realizadas reações de PCR com oligonucleotídeos iniciadores relativos à região codificadora do gene 16S *rDNA* e do *nifH*, sendo então seqüenciadas com o objetivo de detectar diferenças nucleotídicas entre as diferentes bactérias estudadas. Para a comparação dos resultados do seqüenciamento com a consulta de similaridade de nucleotídeos no BLASTn, foram geradas árvores filogenéticas através de ferramentas de bioinformática. Foi observado que a classificação taxonômica das estirpes SEMIA recomendadas para inoculação de leguminosas previamente disponível na FEPAGRO, com base em propriedades morfológicas e especificidade hospedeira, não foi confirmada em todas as estirpes pelos seqüenciamentos parciais dos genes estudados. Sugerimos revisão da classificação destas estirpes. Concluímos também que a consulta de similaridade ao BLASTn pelo seqüenciamento parcial dos genes 16S *rDNA* e *nifH* é, na maioria dos casos, consistente com a classificação proposta pela construção de árvores filogenéticas destas seqüências. Estas ferramentas apresentaram-se muito confiáveis para obtenção de classificação em nível de gênero das estirpes estudadas.

Palavras-chave: SEMIA. *Rhizobium* spp. *Bradyrhizobium* spp. *Ensifer* spp. Filogenia.

## ABSTRACT

The growing demand for food caused by population growth, combined with high cost of fertilizers and industrial environmental impacts caused by them leading, worldwide, the large scale use of inoculants different nitrogen-fixing bacteria. The inoculants used in Brazil (SEMIA-IPAGRO collection) are not yet sufficiently characterized genetically. The purpose of this study was to evaluate and compare the sequences of partial 16S *rDNA* and *nifH* of 26 strains already classified, with 70 strains of rhizobia recommended and authorized for the production of inoculants in Brazil. For this purpose, from DNA samples taken from these bacteria were performed with PCR reactions with primers on the coding region of the gene 16S *rDNA* and *nifH*, and sequencing with the aim of detecting nucleotide differences between different bacteria studied. To compare the results of the consultation of similarity of sequences of nucleotides in BLASTn, phylogenetic trees were generated through bioinformatics tools. It was observed that the taxonomic classification of strains SEMIA recommended for inoculation of legumes previously available in FEPAGRO, based on morphological properties and host specificity, it wasn't confirmed in all strains by partial sequencing of the genes studied. We suggest reviewing the classification of these strains. We concluded that the similarity of the consultation BLASTn by partial sequencing of 16S *rDNA* and *nifH* is, in most cases, consistent with the classification proposed by the construction of phylogenetic trees of these sequences. These tools were very reliable for obtaining classified in the genus level of strains studied.

Key-words: SEMIA. *Rhizobium* spp. *Bradyrhizobium* spp. *Ensifer* spp. Phylogeny.

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 – Árvore filogenética 16S <i>rDNA</i> de estirpes padrão do Genbank.....	59
FIGURA 2 – Árvore filogenética 16S <i>rDNA</i> de estirpes padrão do Genbank e LMG obtidas pela direção reversa.....	61
FIGURA 3 – Árvore filogenética 16S <i>rDNA</i> de estirpes padrão do Genbank e SEMIA obtidas pela direção forward.....	65
FIGURA 4 – Árvore filogenética 16S <i>rDNA</i> de estirpes SEMIA obtidas pela direção reversa.....	66
FIGURA 5 – Árvore filogenética 16S <i>rDNA</i> de estirpes padrão do Genbank e SEMIA obtidas pela direção reversa.....	67
FIGURA 6 – Árvore filogenética <i>nifH</i> de estirpes padrão do Genbank obtidas pela direção forward.....	73
FIGURA 7 – Árvore filogenética <i>nifH</i> de estirpes LMG obtidas pela direção forward.....	75
FIGURA 8 – Árvore filogenética <i>nifH</i> de estirpes SEMIA obtidas pela direção forward.....	76
FIGURA 9 – Árvore filogenética <i>nifH</i> de estirpes padrão do Genbank e SEMIA obtidas pela direção forward.....	77

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – Relação de estirpes padrões, já classificadas pelo Laboratorium voor Microbiologie e pelo Laboratoire de Microbiologie de Soil.....	37
TABELA 2 – Relação das estirpes autorizadas para a produção de inoculantes no Brasil (VI RELARE, 1994) .....	37
TABELA 3 – Composição dos meios de cultura utilizados.....	40
TABELA 4 – Condições de amplificação da PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores da região 16-S <i>rDNA</i> .....	43
TABELA 5 – Condição modificada de amplificação da PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos da região <i>nifH</i> proposta por Ueda, Suga e Matsuguchi (1995).....	44
TABELA 6 – Reação de seqüenciamento 16S.....	45
TABELA 7 – Reação de seqüenciamento <i>nifH</i> .....	46
TABELA 8 – Identificação preliminar com base na identidade de seqüência parcial do gene 16S <i>rDNA</i> , obtida pela direção forward.....	51
TABELA 9 – Identificação preliminar com base na identidade de seqüência parcial do gene 16S <i>rDNA</i> , obtida pela direção reversa.....	53
TABELA 10. Identificação preliminar com base na identidade de seqüência parcial do gene <i>nifH</i> .....	69

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 A importância da classificação sistemática de bactérias diazotróficas.....	14
2.2 Utilização do gene 16S <i>rDNA</i> como marcador molecular.....	21
2.3 Utilização do gene <i>nifH</i> como marcador molecular.....	23
2.4 Evolução Molecular e caracterização filogenética baseada em genes <i>nifH</i> e 16S <i>rDNA</i> .....	26
2.5 Bancos de dados de seqüências dos genes <i>nifH</i> e 16S <i>rDNA</i> .....	32
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
3.1 Estirpes bacterianas.....	36
3.2 Cultivo de bactérias.....	39
3.3 Extração de DNA genômico e purificação.....	40
3.4 Amplificação da seqüência conservada da região 16S <i>rDNA</i> através de PCR utilizando os oligonucleotídeos pA e pc5B.....	42
3.5 Amplificação da seqüência conservada do gene <i>nifH</i> através da PCR utilizando os oligonucleotídeos 19F e 407R.....	43
3.6 Purificação dos Produtos de PCR dos genes <i>nifH</i> 16S <i>rDNA</i> .....	44
3.7 Eletroforese em Gel de Agarose contendo Brometo de Etídio (EB AGE) e documentação.....	45
3.8 Reação da PCR para seqüenciamento do fragmento da região 16S <i>rDNA</i> amplificado.....	45
3.9 Reação da PCR para seqüenciamento do fragmento gênico <i>nifH</i> amplificado...	46
3.10 Seqüenciamento automático dos produtos de PCR 16S e <i>nifH</i> .....	46
3.11 Análise das Seqüências.....	47
3.12 Preparação da árvore filogenética.....	48
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
4.1 Seqüenciamento dos produtos de PCR 16S <i>rDNA</i> .....	50
4.2 Seqüenciamento dos produtos de PCR <i>nif</i> .....	68
4.3 Análise comparativa dos resultados do 16S <i>rDNA</i> e do <i>nifH</i> .....	79
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE - Resumo do relatório com os resultados contendo a identificação das seqüências 16S <i>rDNA</i> das estirpes obtidas pela direção forward, valores de “score”, “e-value” e alinhamento das seqüências.....</b>	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A exploração da fixação biológica do nitrogênio em relação às plantas cultiváveis torna-se uma estratégia cada vez mais relevante no panorama da agricultura atual. Em particular, destaca-se a interação entre rizóbios e leguminosas. A inoculação de rizóbios simbióticos em leguminosas de importância agrônômica dispensa a aplicação de adubos nitrogenados nos solos, o que reduz os custos de produção e provê um aumento na segurança ecológica observada no equilíbrio ambiental. Contudo, a indicação de uma estirpe de rizóbio como inoculante comercial requer estudos detalhados que permitam avaliar seu potencial em estabelecer a associação e fixar simbioticamente o nitrogênio, além de sua capacidade de competição com outras bactérias nativas no solo. Existem coleções de estirpes isoladas e recomendadas, no entanto, muitas ainda requerem uma classificação sistemática adicional que permita um agrupamento e uma diferenciação mais apropriada destas estirpes, além de novas identificações possibilitando uma recomendação adequada do uso dessas estirpes bacterianas.

No Brasil, a recomendação de estirpes de rizóbios para tal finalidade ficou a cargo da RELARE (“Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola”), cabendo à FEPAGRO (coleção SEMIA) a atribuição de preservar e distribuir as estirpes para as indústrias. Esta coleção é reconhecida internacionalmente, porém ainda faltam estudos e informações taxonômicas com base nos métodos moleculares aceitos atualmente. A caracterização de estirpes da coleção, considerando genes conservados e simbióticos, é essencial para comparar e identificar tais rizóbios e compará-los aos nativos dos solos brasileiros.

O objetivo deste trabalho foi avaliar e confrontar as seqüências do gene *nifH* e do gene 16S *rDNA* de 26 estirpes padrão já classificadas, com estirpes de rizóbios recomendadas e autorizadas para a produção de inoculantes no Brasil, cuja classificação ainda encontra-se incompleta, para determinar a congruência entre classificações baseadas no gene *nifH* e 16S *rDNA*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A importância da classificação sistemática de bactérias diazotróficas

Microrganismos diazotróficos são aqueles capazes de fixar biologicamente o  $N_2$  atmosférico. São divididos em grupos de acordo com o tipo de relação que estabelecem com as plantas em que estão associados, a exemplo dos diazotróficos de vida livre, dos endofíticos e dos simbiontes. Os diazotróficos de vida livre são capazes de fixar o  $N_2$  mesmo quando não associados a um hospedeiro superior, permanecendo geralmente na região radicular, utilizam energia disponível no ambiente, e normalmente não excretam  $NH_3$ . Os microrganismos conhecidos como endofíticos permanecem dentro dos tecidos das raízes, colmos e folhas das plantas, estabelecendo uma relação mais estreita com a planta hospedeira. Porém, a relação mais estreita com o hospedeiro, ocorre em microrganismos classificados como simbióticos, que utilizam energia dos fotossintatos fornecidos pela planta e excretam diretamente no tecido vegetal a  $NH_3$  produzida.

Nas associações simbióticas, o processo de fixação biológica do  $N_2$  pelos diazotróficos requer condições ambientais favoráveis, como ausência de  $NH_3$ , baixas tensões de oxigênio ( $O_2$ ), presença de molibdênio (Mo), temperaturas adequadas, entre outras (Postgate, 1982). Esses fatores atuam sobre a regulação da síntese e atividade do complexo enzimático nitrogenase, variando de acordo com a fisiologia do organismo específico (Postgate, 1982; Eady, 1996).

O nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas e é diretamente relacionado à obtenção de altas produtividades na agricultura tropical, incluindo o Brasil, em contrapartida, geralmente possui solos pobres neste nutriente. Sua forma mais abundante é a gasosa, constituindo cerca de 80% da atmosfera, forma esta que não pode ser utilizada diretamente como nutriente pelas plantas ou animais devido à tríplice ligação covalente que existe entre os dois átomos de N ser uma das mais fortes na natureza. A maior contribuição com o processo de fixação biológica do  $N_2$  ocorre pela associação simbiótica de plantas da família Fabaceae (conhecidas também por leguminosas) com bactérias pertencentes a diversos gêneros [*Allorhizobium* (= *Rhizobium*), *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), *Rhizobium* e outros gêneros recentemente descritos como simbiontes, *Burkholderia*, *Methylobacterium* e *Ralstonia* (= *Cupriavidus*)],

mas costumam ser denominadas, de modo popular e coletivo, como rizóbios. Bactérias conhecidas como rizóbios formam nódulos nas raízes ou caules de plantas, e utilizam o  $N_2$  dos gases atmosféricos que se difundem para o espaço poroso do solo, e, através de um complexo enzimático denominado dinitrogenase, são capazes de romper a tripla ligação do  $N_2$  e reduzi-lo a amônia ( $NH_3$ ), que será assimilada em aminoácidos e proteínas utilizados pelas plantas hospedeiras. Atualmente, têm-se descritas 62 espécies encontradas em 12 gêneros, estando inclusas, além de espécies dos gêneros da família Rhizobiaceae, espécies de *Methylobacterium spp.*, *Burkholderia spp.*, *Cupriavidus spp.*, *Devosia spp.*, *Herbaspirillum spp.*, *Ochrobactrum spp.*, *Phyllobacterium spp.*.

As principais fontes para o fornecimento de nitrogênio para as plantas são através da decomposição da matéria orgânica do solo, de descargas elétricas, combustão, vulcanismo, dos fertilizantes nitrogenados e da fixação biológica do nitrogênio atmosférico. (Brill, 1979; Postgate, 1982). A matéria orgânica é rapidamente decomponível nos solos tropicais devido à temperatura e umidade, podendo ser esgotada, rapidamente, após alguns cultivos. A fixação não-biológica resulta de processos naturais, como a reação de descargas elétricas. Essas fontes de  $N_2$  porém, contribuem com pequena parcela do necessário para a agricultura. Os fertilizantes nitrogenados representam a forma assimilada com maior rapidez pelas plantas. Entretanto a sua eficiência é reduzida, sendo perdido geralmente mais que 50% do nitrogênio aplicado por lixiviação, desnitrificação e volatilização. Além disso, apresenta um custo energético muito elevado, chegando a seis barris de petróleo por tonelada  $NH_3$  sintetizada, pois o processo industrial que transforma o  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ) requer hidrogênio derivado de gás de petróleo, catalisador contendo ferro, temperaturas de até  $600^\circ C$  e pressões de 200 a 800 atm. Além disso, o uso de fertilizantes nitrogenados está relacionado à poluição ambiental, pois a lixiviação do N e o escoamento desse nutriente pela superfície do solo resultam em acúmulo de formas nitrogenadas, principalmente nitrato, nas águas dos rios, lagos e lençóis subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos aos peixes e ao homem. Têm sido associadas ao consumo de águas contaminadas com nitrato doenças como câncer e problemas respiratórios. A liberação de óxido nitroso na atmosfera é responsável, em grande parte, pela formação do buraco de ozônio e pelo efeito estufa (Norse, 2003). Daí a importância da fixação biológica do  $N_2$  para a sustentação dos agroecossistemas.

Durante a simbiose, as bactérias devem entrar nas células das raízes da planta hospedeira e se diferenciar para a forma fixadora de nitrogênio, denominada bacteróide, encontrada nos nódulos radiculares. Os processos de nodulação, diferenciação em bacteróide e fixação do nitrogênio envolvem a expressão de genes do hospedeiro e do simbionte (Keen,

1988; Oke e Long, 1999). Tanto uma espécie de leguminosa pode ser nodulada por várias espécies de rizóbios, como a relação inversa também pode ocorrer, podendo ser espécies de crescimento lento ou rápido. O alto grau de especificidade em relação ao hospedeiro parece ser a exceção (Moreira et al., 1993). A ocorrência deste processo envolve vários compostos indutores e inibidores da etapa de formação do nódulo.

A inoculação de culturas agronomicamente importantes com bactérias fixadoras de nitrogênio traz grandes benefícios. Além de dispensar a aplicação de adubos nitrogenados no solo, reduzindo significativamente os custos da produção, evita trânsito de máquinas que causam compactação do solo e desequilíbrios ecológicos pela poluição do ambiente.

O Brasil é um dos países que possuem maior biodiversidade, e, à medida que a fixação biológica do nitrogênio assume importância nos sistemas de produção agrícola, aumenta o número de coleções de espécies de rizóbios isoladas. A identificação de estirpes mais eficientes no processo de fixação biológica de  $N_2$  com as leguminosas de maior importância econômica sempre foi uma meta dos grupos envolvidos em estudos de microbiologia do solo no Brasil. Na década de 1950, foi criada na FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, em Porto Alegre - RS) a “Coleção de Culturas SEMIA” (Seção de Microbiologia Agrícola), a partir de 60 culturas de rizóbios que foram obtidas na década de 1920, de diversas leguminosas dos E.U.A. e da Europa e trazidas ao Brasil, que a partir de 1978 passou a fazer parte do Centro de Recursos Microbiológicos (MIRCEN). Então, muitas estirpes de importância econômica para o Brasil foram adicionadas à coleção, que já conta com cerca de 1.200 estirpes indicadas para 200 plantas leguminosas, e é considerada como a “Coleção de Referência Nacional para Rizóbio” (FEPAGRO, 1999; Hungria & Campo, 2007).

No Brasil, a indicação de uma estirpe de rizóbio para utilização como inoculante comercial é definida e indicada pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) após detalhados estudos que permitem avaliar seu potencial como simbionte fixador do nitrogênio. Estas estirpes são fornecidas pela FEPAGRO (Fundação de Pesquisa Agropecuária), sem custo tecnológico para as indústrias de inoculantes, e a recomendação é legalizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A coleção SEMIA conta, hoje, com 142 estirpes recomendadas oficialmente para a elaboração de produtos inoculantes para 96 leguminosas hospedeiras, sendo que a “Relação de Microrganismos Autorizados para a Produção de Inoculantes no Brasil” atualmente em vigor consta no Anexo II, da Instrução Normativa nº 10, de 21 de março de 2006.

A partir de 1889, quando foi isolado por Frank, pela primeira vez, o primeiro rizóbio denominado *Rhizobium leguminosarum*, algumas espécies foram descritas com base nos grupos de inoculação cruzada entre o simbiote e a planta hospedeira, a exemplo de *R. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. lupini*, *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. trifolii* (Fred et al., 1932). Outras características fisiológicas, bioquímicas e genéticas, além da inoculação cruzada e do crescimento lento com reação alcalina em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono, passaram a ser consideradas nas décadas seguintes, permitindo a divisão das bactérias simbióticas em dois grupos, de crescimento rápido ou lento, mas todas continuaram a ser classificadas no gênero *Rhizobium* (Buchanan, 1980). Contudo, somente em 1982, bactérias da espécie *Rhizobium japonicum* foram reclassificadas em um novo gênero, *Bradyrhizobium*, nessa época apenas com uma espécie definida, *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982). O nome *Bradyrhizobium* é alusivo às taxas de crescimento dessa bactéria, pois "bradus" vem do grego, significando lento e *Rhizobium* é o nome genérico da bactéria. Na primeira edição do Manual Bergey de Bacteriologia Sistemática, as demais estirpes de crescimento rápido continuaram a ser classificadas em cinco espécies de *Rhizobium* (Jordan, 1984).

No ano de 1970, a taxonomia era baseada, principalmente, em propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (Buchanan e Gibbons, 1974). Nas décadas de 1980 e 1990, com desenvolvimento de técnicas de amplificação gênica, particularmente a PCR ("polymerase chain reaction", reação em cadeia da polimerase, Saiki et al., 1988) e das técnicas de seqüenciamento direto do DNA amplificado (Innes et al., 1988), teve início uma verdadeira revolução na taxonomia e filogenia de procariotos. Nessa época, alguns estudos passaram a ser conduzidos com os genes RNA ribossomais (RNAr). Como consequência dessas limitações, apesar dos grandes avanços nas técnicas moleculares e da concretização de uma era genômica, a definição atual de espécie procariótica continua a ser a de um grupo de estirpes, incluindo a estirpe tipo, que apresenta valores de reassociação de DNA-DNA superiores a 70%, com 5°C ou menos de Tm (diferença da temperatura de desnaturação entre os híbridos e os homólogos formados em condições padrão) (Vandamme et al., 1996). Esse método representa uma grande limitação à descrição de novas espécies, particularmente nos países de maior biodiversidade, pois é extremamente laborioso, exigindo a hibridização de centenas e centenas de estirpes sem, muitas vezes, solucionar problemas taxonômicos. No caso de *Bradyrhizobium*, tem sido relatado que, apesar da diversidade elevada em propriedades morfológicas, fisiológicas e genéticas, a diversidade nos genes ribossomais de *Bradyrhizobium* é baixa. Os resultados coerentes obtidos pela análise dos genes 16S *rDNA*

resultaram na escolha preferencial dessa molécula para estimar relações filogenéticas entre as bactérias (Garrity & Holl, 2001). Uma polêmica nos estudos de taxonomia reside em que alguns dogmas evolucionários em procariotos estão sendo quebrados, como a constatação de taxas elevadas de transferência horizontal de genes, produzindo genomas extremamente dinâmicos, com quantidades substanciais de DNA que são incorporadas ou perdidas do genoma, criando controvérsias sobre a definição de espécies em procariotos (Gevers et al., 2005).

Os rizóbios integram um grupo taxonomicamente heterogêneo, cuja classificação encontra em constante revisão e evolução. No “Taxonomic Outline of the Prokariotic Genera” (Garrity et al., 2007) do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (2a ed.) verifica-se que alguns gêneros foram retirados da família Rhizobiaceae e também foram adicionados outros gêneros como mostra Kuykendall et al. (2005) e Willems (2006).

Nas análises dos genes 16S *rDNA*, os rizóbios, alpha-proteobacterias da Ordem Rhizobiales, inicialmente classificados em uma única família, a “Rhizobiaceae”, foram subdivididos nas famílias “Rhizobiaceae” (*Rhizobium spp.*, *Sinorhizobium spp.* e *Ensifer spp.*), “Phyllobacteriaceae” (*Mesorhizobium spp.*), “Bradyrhizobiaceae” (*Bradyrhizobium spp.*) e “Hiphomicrobiaceae” (*Azorhizobium spp.*) (Garrity & Holt, 2001), contando com um total de 54 espécies descritas até o momento, sendo 23 representantes de *Rhizobium spp.* (estando inclusas bactérias do antigo gênero *Agrobacterium spp.* e *Allorhizobium spp.*), 11 espécies do *Ensifer spp.*, uma de *Sinorhizobium sp.*, 11 do gênero *Mesorhizobium spp.*, 6 do gênero *Bradyrhizobium spp.* e 2 espécies do gênero *Azorhizobium spp.* (Garrity et al., 2007).

Além das bactérias conhecidas tradicionalmente como rizóbios, nos últimos anos foram identificados novas famílias e gêneros como simbioss de leguminosas, tanto nas alfa-Proteobacterias, incluindo *Methylobacterium spp.* (Samba et al., 1999; Sy et al., 2001; Jourand et al., 2004), *Devosia spp.* (Rivas et al., 2003), *Ochrobactrum spp.* (Trujillo et al., 2005) e *Phyllobacterium spp.* (Valverde et al., 2005), como nas beta-Proteobacterias, incluindo *Burkholderia spp.* (Chen et al., 2003) e *Ralstonia spp.* (Chen et al., 2001).

Estudos atuais de taxonomia, a seqüência completa do gene 16S *rDNA* consegue definir a posição dos procariotos em nível de gênero (Garrity & Holl, 2001). Contudo, às vezes a variabilidade no gene 16S *rDNA* é baixa, dificultando a classificação em nível de espécie. Nesses casos, outros genes conservados passaram a ser utilizados em complementação ao 16S *rDNA*, podendo-se citar o 23S *rDNA* e o espaço intergênico 16S-23S *rDNA* (IGS, região intergênica). Tanto o 23S *rDNA*, como o IGS, apresentam maior divergência entre as espécies, diferem quanto à taxa de evolução e, no caso do 23S *rDNA*,

apresenta maior número de bases, contribuindo para a especiação (Vinuesa et al., 1998; van Berkum & Furhmann, 2000). Uma limitação no uso do IGS pode residir em que muitos gêneros de bactérias contêm cópias múltiplas do operon *rDNA* (16S, IGS, 23S, 5S), e os alelos em cada cópia podem divergir, em maior ou menor extensão, devido à recombinação intragênica localizada e à transferência horizontal, parcial ou total, dos operons *rDNA*, ou, ainda, devido a uma estrutura completamente diferente da sequência da região intergênica (Haukka et al., 1996; Tan et al., 2001). A transferência horizontal de genes, porém, já foi verificada também no gene 16S *rDNA* (van Berkum et al., 2003). Quando vários genes ribossomais são analisados, é possível considerar a contribuição de todos eles em conjunto, em uma análise polifásica (Vinuesa et al., 1998). Além dos genes ribossomais, alguns estudos identificaram que outros genes também podem dar maior suporte para a definição de relações filogenéticas entre procariotos, por exemplo, os genes *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *sodA* e *dnaK* (Coenye & Vandamme, 2003). Esses genes têm, como principal vantagem, o fato de apresentarem uma taxa de evolução mais rápida do que os genes ribossomais (Gevers et al., 2005). A análise conjunta de vários genes também representa uma estratégia útil pela idéia de funcionar como um “tampão” contra efeitos de recombinação ou transferência horizontal que podem ocorrer em um gene específico. Desse modo, os resultados encontrados em estudos polifásicos com genes ribossomais e não-ribossomais, indicam uma nova tendência em taxonomia e filogenia bacteriana, que consiste na análise conjunta de múltiplos genes (loci) (Gevers et al., 2005). A disponibilidade de diversos genomas seqüenciados vem facilitando os estudos com múltiplos genes, pois as ferramentas de bioinformática permitem a busca de genes em comum para estudos de filogenia.

Com a era da genômica outras metodologias também vêm sendo pesquisadas para o emprego em taxonomia e filogenia. Como exemplo, analisando 70 genomas de bactérias estreitamente relacionadas, Konstantinidis e Tiedje (2005) procuraram compreender melhor os limites entre espécies e a influência dos nichos ecológicos. Os autores encontraram que a identidade média dos nucleotídeos (average nucleotide identity – ANI) dos genes compartilhados entre duas estirpes foi um parâmetro robusto para a comparação da similaridade, e valores de, aproximadamente, 94% corresponderam aos tradicionais 70% da reassociação DNA-DNA. Finalmente, a comparação de genomas inteiros também é sugerida como uma ferramenta útil para a taxonomia de grupos complexos. Cabe aqui salientar, porém, que, quanto à evolução do processo da fixação simbiótica do N<sub>2</sub>, a comparação das seqüências dos genes *nifH*, que codificam a enzima redutase da nitrogenase, indicam que, embora esses microrganismos estejam hoje em grupos taxonômicos muito distintos, a evolução

provavelmente ocorreu a partir de um único ancestral fixador de N<sub>2</sub> e apenas alguns poucos organismos adquiriam os genes fixadores de N<sub>2</sub> por transferência lateral (Young, 1992; Wang & Martinez-Romero, 2000). Do mesmo modo, a evolução de genes de nodulação, como *nodA*, *nodB* e *nodC* pode diferir substancialmente quando comparada ao 16S *rDNA*, indicando mecanismos de transferência horizontal de genes e taxas evolucionárias distintas (Laguerre et al., 2001; Batista et al., 2007).

Vários métodos têm sido empregados na classificação e identificação de bactérias. A presença de numerosas seqüências de genes e de árvores filogenéticas depositadas em bancos de dados, derivadas tanto dos genes 16S *rDNA* e *nifH*, ampliou e facilitou a identificação de rizóbios. Os genes *nif*, que codifica uma ferro-nitrogenase, é um dos genes funcionais mais antigos em termos de evolução. Árvores filogenéticas baseadas nas comparações de seqüências *nifH* mostram confiabilidade e repetibilidade quando comparadas com a filogenia do 16S *rDNA*. Estas características permitem realizar estudos de diversidade genética de rizóbios através da análise molecular de seqüências *nifH*. A identificação e estudo da expressão destes genes são de grande interesse para o entendimento destes eventos, além do seu aproveitamento na área de pesquisa agrônômica, com potencial econômico.

Apesar de ser muito reconhecida por sua importância econômica e como fonte de bioprospecção de genes, faltam estudos e informações taxonômicas das estirpes SEMIA, com base nos métodos moleculares aceitos atualmente. No catálogo da FEPAGRO de 1999, as estirpes são classificadas como *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *B japonicum*, *Bradyrhizobium* sp., *R. fredii*, ou *R. loti*, com base no grupo de inoculação cruzada e no crescimento rápido ou lento e na reação ácida ou alcalina em meio de cultura contendo manitol como fonte de C (FEPAGRO, 1999). Sendo assim, a caracterização de bactérias padrões é de extrema importância para possibilitar não só a caracterização de grupos de bactérias que se encontram com a classificação incompleta, mas também para entender as relações entre planta e simbiote.

## 2.2 Utilização do gene 16S *rDNA* como marcador molecular

O marco principal do uso de marcadores moleculares foi quando WOESE e colaboradores, em 1987, descreveram o uso do gene 16S *rDNA* na filogenia de bactérias (Woese et al., 1987). O gene 16S *rDNA* codifica para a subunidade ribossômica menor, que é parte do sítio de ocorrência da síntese protéica e, portanto, está presente em todas as bactérias. Esse gene apresenta características conservativas ao longo da evolução e pode servir como indicador de como os microrganismos estão intimamente relacionados durante a evolução em milhares de anos. A utilização do gene 16S *rDNA* revolucionou o campo da ecologia microbiana, e com seu uso, é possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas de meio ambiente (Ludwig, et al., 1997; Hentschel et al., 2002). Os estudos com o gene 16S *rDNA* foram iniciados por Carl Woese, que relataram que esta molécula era um excelente marcador molecular (Atlas e Bartha, 1998).

O ribossomo bacteriano é composto do RNA ribossomal e várias proteínas. Os RNAs ribossomais (*rDNA*) estão entre as moléculas mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos e são codificadas por seqüências de DNA denominadas *rDNAs*. Seu papel funcional no sistema de processamento de informações deve ter sido bem estabelecido nos primeiros ancestrais comuns de Bactéria, Arquea e Eucaria. Ele é constituído de duas subunidades principais, a 50S (denominada subunidade maior) e a 30S, (subunidade menor). Na subunidade maior estão as moléculas de 23S *rDNA*, a de 5S e mais 31 proteínas; na subunidade menor estão o 16S *rDNA* e mais 21 proteínas (Woodson & Leontis, 1998).

Os genes ribossomais RNA (*rDNA*) apresentam uma série de características favoráveis a sua utilização em filogenia: i) são encontrados em todos os organismos vivos, uma vez que a síntese de proteínas ribossomais é obrigatória; ii) expressam estruturas secundárias altamente conservadas, que são consideradas para o alinhamento correto das seqüências destes genes; iii) são componentes principais da estrutura dos ribossomos e, portanto, abundantes nas células, facilitando a sua identificação; iv) posições diferentes das seqüências nesses genes evoluíram em taxas diferentes, permitindo que análises filogenéticas sejam realizadas em vários níveis de resolução taxonômica (Woese, 1987; Weisburg et al., 1991; Willems e Collins, 1993; Olsen et al., 1994; Vandamme et al., 1996; Martínez-Romero e Caballero-Mellado, 1996; Pace, 1997; van Berkum et al., 1998; Garrity e Holl, 2001). Devido a essas propriedades, as seqüências do gene 16S *rDNA* passaram a ser consideradas como boas

escolhas para comparar organismos e para inferir filogenias e, por isso, vêm sendo utilizados para derivar filogenias universais da vida.

Os genes dos *rDNA* em todos os organismos contemporâneos partem de um ancestral comum e eles não parecem submeter-se à transferência lateral de gene entre espécies. Por causa das unidades funcionais, as seqüências de *rDNA* contém domínios altamente conservados, intercalados com regiões variáveis (Head et al., 1998), e suas seqüências podem ser usadas para deduzir relações filogenéticas e evolutivas, mesmo entre os organismos mais distintamente relacionados (Weisburg et al., 1991).

Variações nas seqüências dos nucleotídeos do gene de *rDNA* são indícios de mudanças evolucionárias. Resultados de filogenia baseados nas análises do gene 16S *rDNA* revelaram separação dos domínios Bactéria, Arquea e Eucaria. Estudos filogenéticos moleculares proporcionaram uma idéia de evolução em grande escala, quando vista desta maneira mostram a importância dos microrganismos na história evolutiva da vida na Terra, que não pode ser ignorada (Atlas e Bartha, 1998).

Nas duas últimas décadas métodos moleculares, especialmente o seqüenciamento do gene 16S *rDNA* foram confiáveis técnicas para a identificação da diversidade bacteriana. Diversos oligonucleotídeos iniciadores foram desenvolvidos para permitir o seqüenciamento do gene 16S *rDNA*, podendo-se mencionar os Y1 e Y2 de Young et al. (1991), que amplificam um fragmento de cerca de 300 bp dos 16S *rDNAs* bacterianos, uma região relativamente variável, possuindo, portanto, um alto conteúdo de informação, especialmente para comparações de parentais próximas. Outros oligonucleotídeos iniciadores permitem o estudo de todo o gene com, aproximadamente, 1.540 pares de bases (Brosius et al., 1981), podendo-se citar os primers fD1 e rD1 (Weisburg et al., 1991) e os de Menna et al. (2006). Embora o método do 16S *rDNA* sirva como uma poderosa ferramenta para se estabelecer as relações filogenéticas entre bactérias (Ciapina, 1997) devido às suas propriedades moleculares e grande base de dados para comparação de seqüências, a técnica também é utilizada para inferências nos níveis de espécie e subespécie (Fox et al., 1992).

O gene 16S *rDNA* é um gene universal e tem função conservada, que permite construir um esboço da árvore evolutiva de bactérias. Essa análise re-afirma certas categorias baseadas nas relações fenotípicas e fisiológicas, mas desestrutura outras, colocando os organismos em novos grupos (Young, 1992). A similaridade entre seqüências indica uma origem comum de genes correspondentes (Ludwig & Schleifer, 1994). Esse fato possibilita o uso de seqüências de DNA ou RNA na identificação bacteriana.

Embora os genes ribossomais, particularmente o 16S *rDNA*, sejam, hoje, as moléculas mais utilizadas para estimar as relações filogenéticas entre as bactérias, em alguns casos, conforme constatado em *Burkholderia spp.*, a magnitude da divergência na seqüência do gene 16S *rDNA* é limitada e insuficiente para distinguir, claramente, as espécies desse gênero (Coenye & Vandamme, 2003). Situação semelhante já foi relatada, várias vezes, para *Bradyrhizobium spp.* (Vinuesa et al., 1998; Molouba et al., 1999; Chen et al., 2000; van Berkum & Furhrmann, 2000; Willems et al., 2001). Embora revolucione nossa visão da diversidade microbiana, a análise do *rDNA* isoladamente é insuficiente para uma compreensão completa da ecologia microbiana, porque não fornece a informação definitiva das funções biológicas, fisiológicas ou ecológicas.

### 2.3 Utilização do gene *nifH* como marcador molecular

Os genes *nif* estão envolvidos com a fixação de nitrogênio, os quais estão envolvidos na expressão da enzima nitrogenase (Vance e Griffith, 1995). Segundo Choo et al.(2003), os genes relacionados com a fixação do nitrogênio permaneceram conservados durante o processo evolutivo, entretanto eles apresentam-se distribuído entre eubactérias e arqueas. Em termos de propriedades físicas e químicas o mecanismo da fixação do nitrogênio é muito similar entre esses organismos. A nitrogenase é o complexo enzimático responsável pela redução do  $N_2$  a  $NH_4^+$ , que ocorre pela reação:  $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP.Mg > 2NH_3 + 16ADP.Mg + 16 PO_4^- + H_2$ .

O complexo da enzima nitrogenase é composto por duas multi-subunidades de metal-proteínas: a primeira é a dinitrogenase ou proteína-MoFe (proteína ferro-molibdênio), que contém um site ativo de redução de nitrogênio, com peso molecular de aproximadamente 250 kDa, que é composto de dois heterodímeros, sendo que as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são codificadas pelos genes *nifD* e *nifK*, respectivamente; e a segunda componente é a dinitrogenase redutase ou proteína-Fe (proteína ferro), de cerca de 70 kDa, um homodímero com motivo estrutural do tipo  $\alpha/\beta$  (duas subunidades idênticas), o qual é responsável pela hidrólise do ATP para a transferência de elétrons inter-proteínas e é codificada pelo gene *nifH* (Eady, 1996). Os centros Fe-S estão presentes nas duas proteínas e são coordenados entre as subunidades.

Através de estudos realizados por Bishop et al. (1980) e Robson et al. (1986) estabeleceu-se que sistemas alternativos da nitrogenase eram independentes geneticamente. A

nitrogenase “convencional” (nitrogenase tipo 1) é caracterizada por um complexo enzimático composto de duas metalo-proteínas, designadas Fe-proteína e MoFe-proteína, ambas requeridas para a catálise do  $N_2$ , sendo codificada pelo gene *nif* (Dean e Jacobson, 1992). Nitrogenases “alternativas” substituem Mo por outros elementos, como a nitrogenase dependente de Vanádio (V) (nitrogenase tipo 2), codificada por genes *vnf*, ou ainda dependente de Ferro (Fe) (nitrogenase tipo 3), codificada por genes *anf* (Evans e Burris, 1992; Teixeira, 1997). Estirpes com deleções nos genes estruturais (*nifHDK*) facilitaram o isolamento das nitrogenases 1, 2 e 3 de *A. vinelandii* (Bishop et al., 1980) e da nitrogenase 2 de *A. chroococcum* (Robson et al., 1986). Desde então, a existência de nitrogenases alternativas deixou de ser um dogma e já foram identificadas em diversos grupos de microrganismos diazotróficos, tais como: *Anabaena variabilis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Methanosarcina barkeri* e *Clostridium pasteurianum* (Zinoni et al., 1993). A reação da nitrogenase é energeticamente cara (requer 16 ATPs e oito elétrons por molécula reduzida) e é sensível, in vitro, ao oxigênio, que inativa-a. Também é conhecida outra nitrogenase que é ligada à atividade de redutase do monóxido de carbono, descrita em *Streptomyces thermoautotrophicus*, isolado em um ambiente incomum, rico em monóxido de carbono (Ribbe et al., 1997). Interessantemente, a CO desidrogenase de *Streptomyces sp.* utiliza  $O_2$  para gerar radicais  $O_2$ , que são usados como carregadores de elétrons.

Todas as bactérias fixadoras de nitrogênio possuem o gene *nifH*, e a análise de seqüências de genes *nif*, mostrou que genes homólogos estão presentes em procariotos filogeneticamente muito distintos, isto leva a um estudo detalhado de que o primeiro ancestral comum de todos os organismos vivos possuía genes da nitrogenase, sendo este considerado um dos genes evolutivamente mais antigos, junto com a Rubisco (Fani et al., 2000; Line, 2002). Dessa forma, a elevada similaridade verificada entre um isolado considerado diazotrófico e uma espécie não fixadora de N poderia ser explicada pela perda dos genes *nif* no processo de evolução dos organismos. Esta suposição tem sido aceita por diversos pesquisadores e pode ser reforçada ao se considerar que o processo de fixação de nitrogênio é muito custoso energeticamente, justificando a relativa instabilidade de genes de fixação em algumas bactérias quando presentes em meio não seletivo. Por esse motivo, o gene *nifH* tem sido largamente estudado por diversos pesquisadores, de forma independente, buscando uma melhor compreensão de rizóbios.

Uma característica importante do genoma de algumas estirpes de *Rhizobium* é a presença de seqüências reiteradas de DNA, detectadas em regiões do plasmídeo simbiótico, *pSym*, contendo genes estruturais da nitrogenase, *nif*, ou genes da nodulação *nodD* (Martínez

*et al.*, 1985; Segovia et al., 1993). Essas cópias são, normalmente, necessárias para a expressão e efetividade do processo de fixação do N<sub>2</sub>, mas também representam sítios de recombinação, onde ocorrem rearranjos genômicos, que podem conduzir a perdas das propriedades simbióticas nessas estirpes, passando a ser a explicação para a ocorrência freqüente da perda da habilidade de nodular e fixar N<sub>2</sub> de diversas estirpes, como ocorreu com a estirpe de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* SEMIA 4064, recomendada em inoculantes comerciais brasileiros até 1994 (Hungria & Araujo, 1995).

Os estudos conduzidos com *R. tropici* mostraram que essa espécie apresentava maior estabilidade genética do que os demais microssimbiontes do feijoeiro, provavelmente por apresentar uma única cópia do gene *nifH* (Martínez- Romero *et al.*, 1991). Conseqüentemente, ficou decidido, na VI RELARE, que os programas brasileiros de seleção de estirpes de rizóbio para o feijoeiro deveriam procurar selecionar estirpes mais eficientes e competitivas dentro da espécie *R. tropici* (Hungria & Araujo, 1995).

Em estudos sobre a filogenia deste gene, múltiplas espécies de *Azoarcus* spp. do grupo beta-proteobactéria apresentaram um forte agrupamento com  $\alpha$ -proteobactéria, quando comparado com outras espécies de *Azoarcus* spp., sugerindo a existência de transferência lateral de genes (Boucher et al., 2003). A espécie *Methanocaldococcus maripaludis* contém um operon do gene *nif* que apresenta a ordem dos genes bastante similar aos operons encontrados em outras bactérias e que a maior parte da regulação da fixação biológica de nitrogênio é realizada por outros genes. Operons similares tem sido encontrado em todas as arqueas. Alguns representantes das bactérias metanogênicas apresentam mais de um grupo de genes relacionados à nitrogenase. Isto pode ser observado na espécie em *M. barkeri* 2278 que apresenta dois agrupamentos separados, isto pode ter ocorrido devido as diferentes origens (Boucher et al., 2003).

No trabalho realizado por Zhang et al. (2001), as seqüências de genes *nifH* obtidas através de DNA extraído de raízes de arroz, comprovaram que a maioria dos diazotróficos associados a essas plantas apresentavam-se ainda não cultivado e identificado. Os resultados obtidos demonstram que a diversidade de organismos existentes é muito superior àquela conhecida e que seria presumível a não verificação de similaridade de alguns isolados obtidos de raízes de arroz com os taxa já descritos.

A clonagem e o sequenciamento de um dos genes estruturais da nitrogenase, o *nifH*, têm resultado em um grande banco de dados de seqüências de diversos ambientes aquáticos e terrestres. Os estudos de diversidade de nitrogenases são amplamente realizados com base em análises filogenéticas de *nifH* e, em alguns casos, de *nifD*. Entretanto ainda são relativamente

poucas as seqüências de *nifD* e *nifK*, tornando as análises filogenéticas destes genes ainda limitadas.

#### **2.4 Evolução Molecular e caracterização filogenética baseada em genes *nifH* e 16S *rDNA***

A associação entre rizóbios e leguminosas é regulada por diversos genes, tanto do simbionte como do hospedeiro, envolvidos nos processos de atração e reconhecimento entre microrganismo e hospedeiro, nodulação das raízes da planta, diferenciação da bactéria em bacterióide e fixação do nitrogênio (Broughton et al., 2000).

Uma importante contribuição de Charles Darwin para a Biologia foi propor um mecanismo de evolução no quais as espécies submetidas a fenômenos de natureza populacional evoluíram e diversificariam. A esse processo foi denominado de “Seleção natural”, onde as variações herdáveis propagam-se nas populações de acordo com as vantagens adaptativas oferecidas pelo ambiente. O efeito cumulativo dessas variações origina a diversidade biológica (Calcagnotto, 2001). Nos dias atuais sabe-se que a variabilidade genética existe em nível de ácidos nucléicos, tendo como origem o processo de mutação. Além disso, graças à seleção natural e o processo de deriva genética um alelo pode ter sua freqüência alterada por uma questão de amostragem aleatória entre diferentes gerações de uma população (Calcagnotto, 2001).

A taxa de substituição de um gene pode ser considerada um bom indicativo funcional e a análise das taxas entre diferentes genes fornece dados sobre fatores históricos e demográficos (Muse, 2000). Dada altas taxas de reprodução e baixos tempos de geração em microrganismos, estas freqüências são bem mais dinâmicas em populações bacterianas. O conhecimento da variabilidade genética, também denominada de biodiversidade molecular, é de extrema importância para o entendimento da evolução, permitindo o estudo comparativo entre indivíduos, populações ou espécies diferentes (Solé-Cava, 2001).

Taxonomia é a ciência da classificação dos organismos, ou seja, a ciência de ordená-los em grupos com base em suas características comuns (Busse et al., 1996). A taxonomia é determinada, geralmente, através da observação de reações fisiológicas características de determinados grupos de bactérias que possam vir a ajudar nessa classificação. Testes bioquímicos, nutricionais e fisiológicos são usados na taxonomia de bactérias desde a década de 20 (Busse et al., 1996). Esses métodos testam, entre outras coisas, a capacidade de

utilização de diferentes fontes de carboidrato e a presença de determinadas enzimas. Até pouco tempo atrás a identificação bacteriana baseava-se somente nessas características. Isso gerava um problema, pois organismos não relacionados filogeneticamente podem apresentar características semelhantes quando ocupam o mesmo ambiente.

A identificação de novos isolados é pouco confiável quando baseada em critérios puramente fenotípicos e fisiológicos e, principalmente, quando as características mostradas por um isolado em particular não são completamente idênticas às espécies já descritas (Kirchoff, 1997). Por esse motivo tem se recomendado uma abordagem polifásica para a identificação de bactérias. Isso inclui informação fenotípica, genotípica e filogenética (Vandamme, 1996). Um dos desafios da sistemática tem sido estabelecer uma classificação que reflita a filogenia dos organismos. Os inúmeros avanços dos métodos moleculares, nas últimas duas décadas permitiram que os dados moleculares fossem utilizados como fonte de informação biológica (Burks, 1997). Os marcadores moleculares de ácidos nucleicos tornaram-se ferramentas poderosas na aquisição de informações sobre a diversidade genética, relações filogenéticas e origem evolutiva entre as espécies, que auxiliem na sua classificação. Para ser usada como marcador molecular, a molécula deve ter as seguintes características: deve ser universalmente distribuída no grupo a ser estudado; deve ser funcionalmente homóloga em cada organismo; o alinhamento das seqüências das moléculas deve ser perfeitamente possível para poder identificar regiões conservadas e não-conservadas; a seqüência da molécula deve mudar num índice mensurável.

O conjunto de dados moleculares que pode ser utilizado para a reconstrução filogenética pode ser um conjunto de seqüências de aminoácidos ou de nucleotídeos. Para a escolha de dados moleculares de aminoácidos ou ácidos nucleicos deve se ter o cuidado e levar em consideração a taxa de evolução do gene e o tempo de divergência das espécies a serem estudadas (Russo, 2001). Seqüências alinhadas de nucleotídeos ou aminoácidos podem ser comparadas quantitativamente por vários modelos que demonstrem sua semelhança (Miyaki et al., 2001). As seqüências homólogas são de extrema importância para a filogenia, levando-se em conta que a comparação de caracteres em diferentes espécies consiste em uma propriedade relativa a entidades que tenham sua origem comum, ou seja, um ancestral comum. (Russo, 2001). As diferenças entre essas seqüências originam-se de mutações que ocorreram em linhagens que se diversificaram a partir de um ancestral comum. Dessa forma, a reconstrução filogenética consiste em uma ferramenta que possibilita estimar as relações de ancestralidade para um determinado número de organismos. A quantificação dessas diferenças pode ser realizada através de valores ou distâncias que podem ser utilizadas, na

interferência da filogenia. Os algoritmos para reconstrução filogenética que utilizam estas medidas são conhecidos como métodos de distância e a árvore filogenética é uma forma representativa da história evolutiva dos organismos presentes nelas (Miyaki et al., 2001).

A taxonomia de rizóbios não reflete globalmente as características simbióticas dos rizóbios, particularmente em relação a suas plantas hospedeiras. Uma classificação de rizóbios relacionada com suas características simbióticas colide com a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos na especificidade de hospedeiros, e também a dificuldade de estabelecer-se uma faixa de hospedeiros (Pueppke & Broughton, 1999), particularmente por causa do grande número de espécies de leguminosas. Além disso, uma classificação requer uma padronização de testes de nodulação e controle das condições para otimização do crescimento das plantas.

A utilização de diferentes oligonucleotídeos iniciadores em diferentes estudos pode resultar em tendenciosidade, e oligonucleotídeos iniciadores tendenciosos não são avaliados quantitativamente na maioria dos estudos (Zehr e Capone, 1996). Muitos estudos têm sido voltados ao desenho de oligonucleotídeos iniciadores universais, porém sequências recuperadas em diferentes habitats, muitas vezes, podem refletir em diferentes condições de PCR, como por exemplo, no número de ciclos.

O uso de sequências de gene da nitrogenase para desvendar a diversidade de diazotróficos é um tanto limitada ao uso do *nifH*, que é altamente conservado, e o uso de um único gene para uma análise filogenética pode resultar em erros. Um grande número de genomas microbianos tem sido recentemente seqüenciado, entretanto ainda há relativamente poucos diferentes ramos principais de procariotos representados pelos genomas que contêm genes estruturais *nif* (*nifHDK*) no banco de dados de genomas microbianos. Contudo, está claro que o contexto genômico fornece informações para estudos de relações filogenéticas baseadas na organização dos genes melhor que o sequenciamento de genes individualmente, bem como estudos da transferência lateral de genes. Além disso, diferenças na homologia de nitrogenases podem ser obtidas com base no arranjo dos genes *nifH* (Dominic et al., 2000), e pela presença ou ausência de genes específicos *nif* e outros genes relacionados no genoma. Nas Archaea metanogênicas, os genes *nifH* e *nifDK* são separados pelo homólogo *glnB*, o gene regulador da proteína PII. Estas diferenças são alvos de ensaios moleculares dirigidos. A organização de genes fornece dados que podem resolver filogenias de alguns organismos que são dificilmente identificados de maneira conclusiva. Entretanto a representação de microrganismos fixadores de nitrogênio em bancos de dados de sequências genômicas ainda é pobre.

O gene *nifH* apresenta uma larga correspondência com a filogenia do gene 16S *rDNA*. Árvores filogenéticas baseadas nas comparações de seqüências *nifH* mostram confiabilidade e repetibilidade quando comparadas com a filogenia do 16S *rDNA* (Hennecke *et al.*, 1985; Young, 1992; Dobert *et al.*, 1994; Ueda *et al.*, 1995; Zehr *et al.*, 1995). Essas características permitem estudar a diversidade genética das bactérias fixadoras de nitrogênio através da evolução do gene *nifH*. A análise comparativa deste gene foi empregada em espécies de bactérias que colonizam ambientes variados, tais como: solos de florestas, solos alagados, solos cultivados. Estes estudos descrevem um grande número de seqüências *nifH* desconhecidas, indicando uma diversidade indefinida de microrganismos diazotróficos (Poly *et al.*, 2001). A classificação resultante da análise dos genes *Sym* reflete diretamente a hospedeiro-especificidade das amostras de *Mesorhizobium spp.* investigadas, enquanto a filogenia baseada em 16S *rDNA* não têm relação com as plantas hospedeiras (Sullivan *et al.*, 1996; Laguerre *et al.*, 1997; de Lajudie *et al.*, 1998).

A comparação de filogenias obtidas à partir dos genes 16S *rDNA* e *nifH* dos mesmos organismos mostraram poucas evidências de transferência lateral de genes (Zehr *et al.*, 2003). Entretanto, foram reportados alguns casos de incongruência entre filogenias de 16S *rDNA* e *nifH* (Eardly *et al.*, 1992), e alguns destes têm sido comprovados por dados de sequenciamento obtido do operon *nif* completo. Um exemplo disso é o *Herbaspirillum seropedicae*, espécie membro das Betaproteobacteria, fixadora de nitrogênio em associação com as raízes. Árvores filogenéticas agruparam seqüências desta espécie em um ramo caracterizado por organismos do membro das Alpha-proteobacteria (Eardly *et al.*, 1992). Outros exemplos são duas espécies de rizóbios betaproteobacterias, sendo uma de vida livre, *Burkholderia fungorum*, e outra simbiótica, '*Candidatus Glomeribacter gigas*', que é um endossimbionte do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora margarita* (Minerdi *et al.*, 2001). O gênero *Burkholderia* representa um grupo extremamente heterogêneo, que inclui bactérias de solo, rizobactérias promotoras de crescimento e patógenos de humanos e plantas. Então, o número de espécies de *Burkholderia* que exibem filogenia de suas seqüências de gene *nifHD* aberrantes ainda é desconhecido, devido principalmente ao número limitado de estirpes as quais tem os dados de seqüências de 16S *rDNA* e *nif* analisados.

Haukka *et al.* (1998) analisaram muitas seqüências e concluíram que, para rizóbios, a filogenia de *nifH* é geralmente não coincidente com a filogenia de 16S *rDNA*, mas é muito similar a dos genes *nod A*. Este resultado está de acordo com o fato de que os genes *nif* e *nod* estão frequentemente muito ligados, e podem ser localizados em elementos transmissíveis,

como plasmídeos em muitas espécies de rizóbios ou transposon como em *Mesorhizobium loti* (Sullivan et al., 1995; Sullivan & Ronson, 1998).

Roßsch et al. (2002) acessaram a diversidade microbiana em solos ácidos de floresta pela caracterização de sequências ambientais dos genes 16S *rDNA* e *nifH*, usando oligonucleotídeos iniciadores considerados universais para *nifH*. Também foi mostrado em estudos prévios oligonucleotídeos iniciadores alvo de *nifH* utilizados por Roßsch et al. (2002) amplificaram o fragmento gênico correspondente a uma ampla gama de organismos diazotróficos, incluindo membros das Proteobacteria, *Firmicutes* (representantes de *Actinobacteria* e grupos dos *Bacillus* e *Clostridium*), e Cianobacterias. A análise do gene 16S *rDNA* revela uma enorme diversidade de bactérias, enquanto as sequências *nifH* apontam para principalmente um único agrupamento característico de *Alphaproteobacteria*. Uma explicação possível para isto é que muitos microrganismos apresentados não possuem *nifH*, ou possuem genes *nifH* que não foram alvo dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Outra hipótese é que estes microrganismos adquiriram genes *nifH* de alphaproteobacterias por transferência lateral. A elevada prevalência de sequências de genes *nifH* de alphaproteobacterias têm sido reportada em outros estudos ambientais (Widmer et al., 1999; Lovell et al., 2001).

Laguerre et al (2001), seqüenciou fragmentos dos genes *nodC* e *nifH* para obter uma relação representativa entre os diferentes gêneros e espécies, muito dos quais possuem sua origem nos nódulos de *Phaseolus vulgaris* spp. Foi construída uma árvore filogenética que revelou uma relação muito próxima entre os genes simbióticos dos microrganismos simbiotes de *Phaseolus* spp. sem levar em consideração a classificação baseada no gene 16S *rDNA*. As filogenias de *nodC* e *nifH* são geralmente similares, mas existe casos de incogrüência que foram detectados, sugerindo que possa ter ocorrido um rearranjo genético durante o processo evolutivo. Como resultado deste trabalho pode-se dizer que existe uma transferência intergênica entre espécies de rizóbios.

Amgalam et al. (2005) determinaram quase que completamente todas as bactérias que pertencem ao gênero *Heliobacteria* através de técnicas moleculares e compararam com outras espécies de rizóbios através dos genes *nifH* e *nifD*. A relação filogenética entre espécies do gênero *Heliobacteria*, mostrada pelas árvores filogenéticas de *nifH* e *nifD* corresponde perfeitamente com a filogenia baseada em 16S *rDNA*. Chen et al. (2003) realizaram estudos com diferentes estirpes pertencentes à subclasse  $\beta$  - proteobactéria. Análises filogenéticas de sequências *nodA* e *nifH* disponíveis para esta classe sugerem que  $\beta$ -rizóbios evoluíram a partir de diazotróficos através de múltiplas transferências gênicas laterais. Esta hipótese foi reiterada

por Verma, et al. (2004), trabalhando com bactérias simbióticas presentes em nódulos indeterminados de *Mimosa pudica* no Norte e no Sul da Índia, verificaram que as mesmas mostraram máxima similaridade com *Ralstonia taiwanensis* com base na fonte de carbono e do gene 16S *rDNA*. O alinhamento de seqüências dos genes *nifH* dessas bactérias revelou uma alta afinidade com  $\alpha$ -rizóbios, sugerindo que os genes *nifH* de  $\beta$ -rizóbios podem ter sido adquiridos a partir de  $\alpha$ -rizóbios, via transferência lateral durante a co-ocupação dos nódulos por membros de ambas subclasses de proteobactérias.

Cantera et al. (2004) comparou filogeneticamente os genes *nifH* visando verificar o processo de evolução sofrido por *Rhodopseudomonas palustris*. Nesta análise, *R. palustris* mostrou-se próxima de *Rhodobacter spp.* e a uma outra bactéria fototrófica pertencente a  $\alpha$ -Proteobactéria. Contudo, apresentou-se separada de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium spp.* IRBG2, este último fototrófico, conforme deduzido pela filogenia do 16S *rDNA*. Em contraste, *R. palustris* apresentou-se mais relacionado à *B. japonicum* baseado no número de genes operacionais e informacionais comuns. A associação próxima entre as espécies *R. palustris*, *Rhodobacter spp.*, *Rhodovulum spp.* e *Rhodospirillum rubrum* pôde ser observada através do conteúdo mol% G+C presente no gene *nifH* e do alinhamento das seqüências. Os resultados obtidos indicaram que o gene *nifH* de *R. palustris* está altamente relacionado com aquele da bactéria fototrófica roxa não-sulfurosa incluída no estudo, e que pode ter origem evolucionária a partir de espécies fototróficas. Embora o uso do gene *nifH* tenha se mostrado complicado para estabelecer relações filogenéticas entre bactérias fototróficas, em estudos de diversidade molecular, ele estabelece uma estrutura para resolver origens e diversificações da fixação do nitrogênio entre bactérias fototróficas em  $\alpha$ -Proteobactérias.

Menna et al. (2006) estudaram 66 estirpes de rizóbios SEMIA pelo seqüenciamento do gene 16S *rDNA* e pela construção de árvores filogenéticas. Os resultados deste estudo indicam que não há uma relação evidente entre a diversidade do gene 16S *rDNA* destas estirpes e a especificidade de hospedeiros das mesmas. Muitas delas, quando tiveram suas seqüências comparadas no banco de dados BLAST, apresentaram classificação diversa à sugerida pelo MIRCEN. Os autores concluíram que o conhecimento genético destas estirpes ainda é bastante deficiente.

## 2.5 Bancos de dados de seqüências dos genes *nifH* e 16S *rDNA*

Numerosos bancos de dados e ferramentas computacionais têm sido desenvolvidos para permitir o acesso de toda a comunidade científica aos diferentes dados genômicos disponíveis, bem como a análise comparativa dos mesmos. Variadas opções de visualização, busca, obtenção e análise destes dados são oferecidas, permitindo a aquisição de conhecimento cada vez mais detalhado sobre os genomas e seus respectivos organismos.

Criado em 1988 como um recurso de informações sobre biologia molecular, o NCBI agrega um banco de dados público, para condução de pesquisas de bioinformática, desenvolvimento de ferramentas para softwares de análise de dados genômicos, e disseminação de informações biomédicas, tudo para melhor entendimento de processos moleculares que afetam a saúde humana. Nesta última década, o número de genomas de bactérias seqüenciadas cresceu exponencialmente, de tal forma que, até em fevereiro de 2008, estavam depositados, no GenBank, mais de 1800 genomas completos, além de vários outros projetos em andamento, sendo que no mesmo mês de 2007 havia em torno de 400 genomas completos (NCBI, 2008). A diversidade e a versatilidade que vêm sendo reveladas nesses genomas de procariotos são surpreendentes em vários aspectos, com variabilidade no tamanho dos genomas, número e densidade de genes, número de operons *rDNA*, ordenação dos genes nos operons, entre outros.

Os maiores genomas seqüenciados até o presente momento foram os de *Burkholderia xenovorans* estirpe LB400, com 9.767.620 pb distribuídos em três cromossomos (NCBI, 2008) e o único cromossomo com 9.105.828 pb da estirpe USDA 110 de *Bradyrhizobium japonicum* (Kaneko et al., 2002). Com o crescimento exponencial no número de genomas seqüenciados, ao contrário do que inicialmente se previa (Chothia, 1992), o número de novas famílias de proteínas continua incrementando regularmente a cada novo genoma publicado, particularmente entre procariotos. Modelos matemáticos predizem, inclusive, que novos genes serão descobertos mesmo após o seqüenciamento de centenas de genomas por espécie e podem conduzir à descoberta de inúmeras novas famílias de proteínas com propriedades bioquímicas de interesse (Tettelin et al., 2005). Além disso, o número ainda elevado de CDSs (coding DNA sequences) com função hipotética ou hipotética conservada continua a crescer, particularmente entre procariotos, indicando que o nosso conhecimento sobre seqüências de nucleotídeos ainda é pequeno.

Os genomas apresentam grande variação na ordenação dos genes conhecidos e organizados em operons, com poucos operons sendo mantidos entre linhagens evolucionariamente distantes e existem diferenças marcantes na estabilidade dos mesmos (Boucher et al., 2001; Gevers et al., 2005). Além disso, a grande maioria dos genomas de bactérias atualmente disponível ou em progresso é de patógenos humanos, ou de patógenos de animais, ou de plantas. Poucos são os genomas de bactérias de vida livre e não-patogênicas e apenas uma porcentagem mínima inclui representantes da biodiversidade dos trópicos (NCBI, 2008), havendo grande defasagem de conhecimento sobre essas bactérias.

Comparativamente aos genomas depositados de bactérias, o número de genomas completos de diazotróficos simbióticos é pequeno, apenas cinco: *Mesorhizobium loti* estirpe MAFF303099 (Kaneko et al., 2000), *Sinorhizobium meliloti* estirpe 1021 (Capela et al., 2001; Galibert et al., 2001), *Bradyrhizobium japonicum* estirpe USDA 110 (Kaneko et al., 2002), *Rhizobium etli* estirpe CFN42 e *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* estirpe 3841 (Young et al., 2006). Nos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, o plasmídeo simbiótico *pSym* contém a maioria dos genes responsáveis pela nodulação e fixação do nitrogênio e, além dos genomas completos, tem-se o seqüenciamento do plasmídeo simbiótico de *Rhizobium sp.* NGR234 (Freiberg et al., 1997) e da ilha simbiótica de *M. loti* (Sullivan et al., 2002).

O seqüenciamento do plasmídeo simbiótico de *Rhizobium sp.* NGR234 identificou a presença de 416 genes funcionais, incluindo 26 genes para nodulação e 26 genes para fixação do nitrogênio (Freiberg et al., 1997). O seqüenciamento completo do genoma de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 apontou a existência de um único cromossomo, de 7 Mb e dois plasmídeos, pMLa, de 351,9 kb e pMLb, de 208,3 kb. Um segmento de DNA de 611 kb foi identificado como uma possível ilha simbiótica, contendo 30 genes para fixação de nitrogênio e 24 genes para nodulação. Os genomas dos plasmídeos pMLa e pMLb contêm, respectivamente, 320 e 209 genes potenciais para diferentes funções biológicas. Contudo, apenas um único gene plasmidial para nodulação foi identificado (Kaneko et al., 2000). As ilhas simbióticas apresentam semelhança com as ilhas de patogenicidade (Hacker & Carniel, 2001). O genoma de *S. meliloti* estirpe 1021 consiste de um cromossomo de 3,7 Mb e dois plasmídeos, pSymA de 1,4 Mb e pSymB de 1,7 Mb. O plasmídeo pSymA contém a maioria dos genes relacionados à nodulação e fixação do N<sub>2</sub>, conferindo à bactéria a capacidade para colonizar ambientes de baixa tensão de O<sub>2</sub> e metabolizar uma variedade de formas químicas de nitrogênio, além de N<sub>2</sub> (Galibert et al., 2001).

Em *Bradyrhizobium*, os genes envolvidos no evento de nodulação (genes *nod*, *nol* e *noe*), fixação do nitrogênio (genes *fix*) e síntese de nitrogenase (genes *nif*) estão localizados no

cromossomo. A seqüência completa do genoma de *B. japonicum* estirpe USDA110 confirmou que seu genoma consiste em um único cromossomo de 9 Mb, sem a presença de plasmídeos. Um segmento de 681 kb foi identificado como uma possível ilha simbiótica, incluindo a região cromossômica de 410 kb onde estão agrupados os genes de nodulação e fixação previamente identificada por Göttfert et al. (2001). Foram atribuídos 655 genes codificantes de proteína para essa região, sendo que 301 deles estão envolvidos na transmissão de DNA e fixação de N<sub>2</sub>. Estas observações sugerem uma plasticidade elevada no genoma de *B. japonicum*, a qual, provavelmente, ocorre devido ao rearranjo complexo do genoma, incluindo transferência horizontal e inserção de vários elementos de DNA e recombinação homóloga (Kaneko et al., 2002).

O genoma de *R. leguminosarum* biovar *viceae* estirpe 3841 também foi completamente seqüenciado, sendo indicado que consiste de um cromossomo de 5,05 Mb e seis plasmídeos com tamanhos de pRL12 (870 kb), pRL11 (684 kb), pRL10 (488 kb), pRL9 (352 kb), pRL8 (147 kb) e pRL7 (151 kb), perfazendo um total de 7,75 Mb (Young et al., 2006). A seqüência completa do genoma de *Rhizobium etli* CFN42 demonstrou que seu genoma consiste de um único cromossomo, de 4,38 Mb e seis plasmídeos, p42a (194 kb), p42b (184 kb), p42c (250 kb), plasmídeo simbiótico p42d (371 kb), p42e (505 kb) e p42f (642 kb) perfazendo um total de 6,53 Mb. Vários genes relacionados à simbiose estão localizados nos p42b (*lps*) e p42f (*fix*) e outros no cromossomo. As características estruturais do genoma de *R. etli* CFN 42 refletem taxas evolucionárias de transferência horizontal de genes, duplicações, deleções e rearranjos genômicos.

Todas estas observações indicam que rizóbios diferem significativamente quanto ao conteúdo e organização gênica, independentemente de suas relações taxonômicas e hábitos simbióticos. O Brasil é, provavelmente, o país que mais tem utilizado os benefícios da fixação biológica do N<sub>2</sub> em culturas de grãos. Por isso, torna-se importante desenvolver estudos de genômica com estirpes brasileiras, particularmente aquelas utilizadas em inoculantes comerciais, mas o custo de um genoma completo é bastante elevado.

A presença de numerosas seqüências de genes e de árvores filogenéticas depositadas em bancos de dados, derivadas tanto dos genes 16S *rDNA* e *nifH*, ampliou e facilitou a identificação de rizóbios. Estas características permitem realizar estudos de diversidade genética de rizóbios através da análise molecular de seqüências *nifH* e 16S *rDNA*.

Enquanto as seqüências de nitrogenase e de 16S *rDNA* acumulam-se nos bancos de dados, o grau elevado de similaridade das seqüências supõe a evolução adiantada do nitrogenase em um antepassado distante (Postgate e Eady, 1988). Pesquisas atuais sobre

número de genes (Doolittle, 1999) e genômica comparativa, entretanto, concluem que as nitrogenases poderiam ter sido dispersadas por mecanismos de transferência lateral de genes. Análises filogenéticas comparativas detalhadas adicionais ajudarão a resolver a história evolucionária das nitrogenases e dos genes do *rDNA*.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Estirpes bacterianas

Os organismos que foram utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho não oferecem risco para o meio ambiente e nem para a saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

As estirpes padrões utilizadas foram obtidas a partir do *Laboratorium voor Microbiologie – Universiteit Gent* e do *Laboratoire de Microbiologie de Sol – INRA* (Bélgica) e as estirpes SEMIA autorizadas para produção de inoculantes no Brasil foram obtidas da FEPAGRO, sendo posteriormente cultivadas e mantidas no Laboratório de Bioquímica de Microrganismo e Plantas, localizado na FCAV – UNESP, no Departamento de Tecnologia. As estirpes Padrões de Rizóbios apresentam-se descritas na Tabela 1 e as demais, cujas classificações encontram-se incompletas e que foram comparadas com as estirpes padrões, encontram-se na Tabela 2.

TABELA 1. Relação de estirpes padrões, já classificadas pelo Laboratorium voor Microbiologie e pelo Laboratoire de Microbiologie de Soil

<b>ORIGEM: Laboratorium voor Microbiologie</b>		
<b>HOSPEDEIRO</b>	<b>SIMBIONTE</b>	<b>ESTIRPES</b>
<i>Prosopis chilensis</i>	<i>Ensifer arboris</i>	LMG 14919
<i>Glycine Max</i>	<i>Ensifer fredii</i>	LMG 6217
Acácias	<i>Ensifer kostiense</i>	LMG 19227
<i>Medicago truncatula</i>	<i>Ensifer medicae</i>	LMG 18864
<i>Medicago sativa</i>	<i>Ensifer meliloti</i>	LMG 6133
<i>Acacia laeta</i>	<i>Ensifer teranga</i>	LMG 7834
<i>Sesbania rostrata</i>	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	LMG 6465
<i>Amorpha fruticosa</i>	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	LMG 18977
<i>Cicer arietinum</i>	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	LMG 14989
<i>Astragalus sinicus</i>	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	LMG14107
<i>Lotus corniculatus var. tenuifolium</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	LMG 6125
<i>Cicer arietinum</i>	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	LMG 17148
<i>Acacia Senegal</i>	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	LMG 11892
<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	LMG 18976
<i>Glycine Max</i>	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	LMG 6134
<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	LMG6138
<i>Neptunia natans</i>	<i>(Allo)Rhizobium undicola</i>	LMG 11875
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium etli</i>	LMG17827
<i>Sesbania herbacea</i>	<i>Rhizobium huautlense</i>	LMG18254
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli</i>	LMG8819
<i>Trifolium</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>	LMG8820
<i>Psium sativum and Vicia villosa</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	LMG14904
<i>Medicago ruthenica</i>	<i>Rhizobium mongolense</i>	LMG 19141
<i>Gueldenstaedita multiflora</i>	<i>Rhizobium yanglingense</i>	LMG 19592
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium gallicum bv.gallicum</i>	R602sp
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium giardini bv.giardini</i>	H152

TABELA 2. Relação das estirpes autorizadas para a produção de inoculantes no Brasil (VI RELARE, 1994)

<b>LEGUMINOSAS DE GRÃOS</b>		
<b>HOSPEDEIRO</b>	<b>SIMBIONTE</b>	<b>SEMIA</b>
<i>Arachis hypogaeae.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	6144
<i>Cicer arietinum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	396
<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	5079
<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	5080
<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	587
<i>Glycine max</i>	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	5019
<i>Lens esculenta</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	344
<i>Lens esculenta</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	3025
<i>Lens esculenta</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	3026

continua

<b>HOSPEDEIRO</b>	<b>SIMBIONTE</b>	<b>SEMIA</b>
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	4077
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	4080
<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	3007
<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	3012
<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6145

#### **LEGUMINOSAS PARA FORRAGEIRAS DE CLIMA TEMPERADO**

<b>HOSPEDEIRO</b>	<b>SIMBIONTE</b>	<b>SEMIA</b>
<i>Lathyrus odoratus</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	388
<i>Lotus corniculatus</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	806
<i>Lotus corniculatus</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	816
<i>Lotus tenuis</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	830
<i>Medicago polymorpha</i>	<i>Ensifer meliloti</i>	103
<i>Medicago sativa</i>	<i>Ensifer meliloti</i>	116
<i>Medicago sativa</i>	<i>Ensifer meliloti</i>	134
<i>Medicago sativa</i>	<i>Ensifer meliloti</i>	135
<i>Ornithopus sativus</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	929
<i>Trifolium pratense</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	265
<i>Trifolium semipilosum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	2002
<i>Trifolium subterraneum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	265
<i>Trifolium vesiculosum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	2050
<i>Trifolium vesiculosum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	2051
<i>Vicia sativa</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	384

#### **LEGUMINOSAS PARA FORRAGEIRAS DE CLIMA TROPICAL**

<b>HOSPEDEIRO</b>	<b>SIMBIONTE</b>	<b>SEMIA</b>
<i>Cajanus cajan</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6156
<i>Cajanus cajan</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6157
<i>Centrosema</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6146
<i>Centrosema</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6424
<i>Desmodium intortum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	656
<i>Desmodium ovalifolium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6209
<i>Galactia striata</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6150
<i>Indigofera hinsurta</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6158
<i>Lablab purpureus</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	662
<i>Lablab purpureus</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	695
<i>Macroplium atropurpureum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	656
<i>Neonotonia wightii</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	656
<i>Stilozanthes</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6154

#### **LEGUMINOSAS PARA ADUBAÇÃO VERDE**

<b>HOSPEDEIRO</b>	<b>SIMBIONTE</b>	<b>SEMIA</b>
<i>Calopogonio</i> spp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6152
<i>Canavalia ensiformes</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6156
<i>Canavalia ensiformes</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6158
<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6156
<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6145
<i>Crotalaria spectabilis</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6156
<i>Crotalaria spectabilis</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6158

continuação

<b>HOSPEDEIRO</b>	<b>SIMBIONTE</b>	<b>SEMIA</b>
<i>Cyamopolis tetragonoloba</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6319
<i>Cyamopolis tetragonoloba</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6145
<i>Lupinus</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	928
<i>Lupinus</i> sp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	938
<i>Pueraria phaseoloides</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6175
<i>Stizolobium atterrimum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6158
<b>LEGUMINOSAS ARBÓREAS</b>		
<b>HOSPEDEIRO</b>	<b>SIMBIONTE</b>	<b>SEMIA</b>
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6159
<i>Enterolobium ciclocarpum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6159
<i>Enterolobium timbouva</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6159
<i>Falcataria mollucanna</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6169
<i>Gliricida sepium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6168
<i>Leucaena diversifolia</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6162
<i>Leucaena diversifolia</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6169
<i>Leucaena leucocephala</i> v.k72	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6153
<i>Leucaena leucocephala</i> v.k8	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6153
<i>Leucaena leucocephala</i> v.Peru	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6153
<i>Leucaena leucocephala</i> v.Cunnighan	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6069
<i>Leucaena leucocephala</i> v.Cunnighan	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6070
<i>Mimosa scrabella</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6165
<i>Prosopis juliflora</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6161
<i>Prosopis juliflora</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6162
<i>Tipuana tipu</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6192
		conclusão

### 3.2 Cultivo de bactérias

As estirpes de rizóbios foram cultivadas e mantidas em placas de Petri contendo meio sólido YMA (*Yeast Mannitol Agar*) (Vincent, 1970) com vermelho congo (Tabela 3), em B.O.D. a 28°C. A manutenção foi semanal, através de passagens para placas contendo meio fresco. O corante utilizado permitiu monitorar eventuais contaminações, baseado na coloração das colônias crescidas no meio. Os rizóbios praticamente não absorvem o corante e a colônia apresenta-se incolor, enquanto contaminantes apresentam coloração vermelha intensa decorrente da absorção do corante pelos microrganismos.

Posteriormente, as estirpes foram repassadas e cultivadas em meio TY (*Triptone-Yeast Medium*) sólido (Beringer, 1974) por três vezes, com finalidade de diminuir a produção de exopolissacarídeos, e então cultivadas durante 48 horas, a 28° C sob agitação de 180 rpm em meio de cultivo TY líquido (Tabela 3). A suspensão contendo bactérias foi centrifugada a

TABELA 3. Composição dos meios de cultura utilizados

Meio de Cultura	Composição do Meio	Concentração
YMA ( <i>Yeast Mannitol Agar</i> ) / Vermelho Congo pH 6,8	$K_2HPO_4$	500 mg/l
	$MgSO_4 \times 7H_2O$	200 mg/l
	NaCl	100 mg/l
	Manitol	10 g/l
	Extrato de Levedura	500 mg/ml
	Ágar	9 g/l
	corante Vermelho Congo	0,025 mg/ml
TY ( <i>Tryptone-Yeast Medium</i> ) / pH 7,0	Triptona	500 mg/ml
	Extrato de Levedura	300 mg/ml
	$CaCl_2$	870 mg/ml

12.000 xg por 30 min., a 4° C. O sedimento foi lavado com solução salina (0,85% NaCl) para remoção de polissacarídeos extracelulares e possíveis resíduos do meio de cultivo. A suspensão foi novamente centrifugada, obtendo-se um pellet de células, que foram utilizados para a extração do DNA.

### 3.3 Extração de DNA genômico e purificação

Para extração do DNA genômico das bactérias, seguiu-se o procedimento descrito por Sambrook et al. (1989), com algumas modificações.

As células foram então ressuspensas em 1 mL de solução salina-EDTA (NaCl-0,15M; EDTA-0,01M; pH 8,0) e incubadas a 37°C durante 10 minutos, em tubos de vidro especial para centrífuga “CÓREX” (n° 00156 – Pirex). Após esse período, adicionaram-se 500 µL de lisozima (5mg/mL), preparada em tampão Tris- EDTA-Dextrose (Tris-HCl-24mM; EDTA-10mM; Dextrose-50mM; pH 8,0) e RNase 10 mg /mL (15 µL/ tubo), procedendo-se, então, uma nova incubação a 37°C por 40 minutos, agitando suavemente os tubos a cada 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 500 µL de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 20% (p.v.), realizando nova incubação a 56° C durante 20 minutos.

Decorrido o tempo de incubação, foram adicionados à suspensão, 500 µL de solução de perclorato de sódio 5 M, gota a gota, com agitação suave. Em seguida, adicionaram-se 2 mL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), deixando-se por 1 hora em

agitação orbital a 220 rpm à 8 °C (no gelo). Após esse período de incubação, centrifugou-se o material a 12000xg, por 20 minutos, a 4° C. A fase superior foi coletada e transferida para tubos limpos “COREX” (n° 00152 – Pirex).

Adicionou-se à fase recuperada, 2 mL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), procedendo-se uma agitação orbital por 20 minutos, a 220 rpm e 8°C. O material foi centrifugado a 5860xg por 20 minutos à 4 °C, e , após esse passo procedeu-se a coleta da fase superior, a qual foi novamente transferida para tubos limpos. Mais uma vez adicionou-se 2 mL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), repetindo toda essa marcha, até a recuperação e transferência da fase superior para tubos limpos, aos quais foram adicionados 2 volumes de etanol 95% gelado, agitando-se manualmente e incubando-se a –20° C por 12 horas.

Após esse período, centrifugou-se o material a 5.860xg por 20 minutos a 4° C, descartando-se então o sobrenadante. O precipitado foi lavado rapidamente, para evitar a perda do DNA, por duas vezes com 1 mL de etanol 70% (gelado).

Os tubos foram então vertidos sobre papel absorvente para eliminar o excesso de etanol. Adicionou-se 1 mL de tampão TE 10:1(Tris-HCl-10mM; EDTA-1mM; pH 8,0) gelado para a ressuspender o DNA, o qual foi transferido para tubos eppendorf e estocados a – 20° C.

Para a quantificação do DNA realizou-se uma diluição 10 X do DNA em água grau MilliQ. A leitura de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro Beckmann-Du 640-B, onde se utilizou o comprimento de onda de 260 e 280 nm para se determinar possíveis contaminações do mesmo com proteína e/ou fenol. O DNA foi considerado purificado quando a relação entre as leituras da absorbância em 260 e 280 nm apresentou-se na faixa correspondente entre 1,7 e 2,0. Para os cálculos da concentração do DNA, considerou-se o padrão de que uma unidade de absorbância a 260 nm equivale a 50 µg de DNA por mL de solução (Sambrook et al., 1989).

A concentração do DNA genômico também foi avaliada através da comparação visual com a intensidade das bandas de pGEM, com concentrações conhecidas, por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

### 3.4 Amplificação da seqüência conservada da região 16S *rDNA* através de PCR utilizando os oligonucleotídeos pA e pc5B

Nas reações de amplificação das estirpes foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores universais que geram um fragmento de 1,5 Kb, o pA “forward”, localização em *E. coli*: bases 8 a 27, e o pc5B “reverse”, localização em *E. coli*: bases 1507 a 1492 (Wilson, 1990).

*forward* pA (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') e *reverse* pc5B (5'- TCA CTT GTT ACG ACT T -3') (Wilson, 1990)

Em busca de concentrações ótimas de reagentes e condições ótimas de amplificação, foram realizados sucessivos testes. Os volumes dos reagentes, bem como as condições de amplificação do DNA que foram definidos estão listados na Tabela 4. Os reagentes utilizados na reação de PCR foram obtidos junto a “Invitrogen”. Em todos os passos da reação utilizou-se água MilliQ previamente filtrada em millipore 0,45/ $\mu$ M. O aparelho termociclador utilizado é um MJ RESEARCH Inc., modelo PTC-100TM.

Os produtos da amplificação foram examinados em gel de agarose (GIBCO BRL) 1,5% fundida em tampão TEB (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), contendo brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/mL de gel). Uma alíquota de 3  $\mu$ L foi aplicada no gel, acrescida de 3  $\mu$ L de tampão da amostra (0,10% de azul de bromofenol + 40% de glicerol). A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba horizontal, e conduzida em tampão TBE 1X, adicionado de brometo de etídio (5  $\mu$ g/mL), durante 1 hora a 100 V constante. O padrão de peso molecular utilizado foi de 0,2  $\mu$ g do DNA “Ladder” de 1 Kb (Invitrogen). A visualização foi realizada sob luz ultravioleta e a imagem de gel documentada em um fotodocumentador modelo GEL DOC 1000 (BIO-RAD), com a opção de imagem invertida a fim de se produzir uma imagem negativa, utilizando-se o programa Quantity One.

Além disso, um DNA de concentração conhecida (50 ng/ $\mu$ L) foi aplicado em diferentes volumes para a comparação visual da intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídeo e cálculo da concentração do material. A quantificação aproximada do fragmento amplificado foi realizada à partir da visualização do gel fotodocumentado e

TABELA 4. Condições de amplificação da PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores da região 16-S *rDNA*

REAGENTES (concentração)	VOLUME REAÇÃO (μL)	NA
DNA (50ng/mL)	2	
Tampão da enzima (10X)	2	
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,6	
DNTPs (10 mM)	0,4	
Taq DNA polimerase (5U/μL)	0,3	
“oligonucleotídeo iniciador” pA (50 ng/μL)	1,3	
“oligonucleotídeo iniciador” pc5bB (50 ng/μL)	1,3	
Água MilliQ	12,1	
TOTAL	20	

**Programas utilizados no Termociclador:**

01) 94°C – 2 min.; 02) 50°C – 30 seg.; 03) 72°C – 1 min.; 04) 94°C –30 seg.; 05) 30 ciclos etapas 02 a 04; 06) 72°C – 5 min.; 07) 4°C por tempo inderteminado.

comparação do tamanho das bandas dos isolados em relação à banda do DNA com concentração conhecida.

### 3.5 Amplificação da seqüência conservada do gene *nifH* através da PCR utilizando os oligonucleotídeos 19F e 407R

Um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores foi sintetizado para amplificação de fragmentos do gene *nifH*, com base nos trabalhos de Ueda et al. (1995), que, após cuidadosa inspeção de 37 seqüências publicadas do gene *nifH* disponíveis nos bancos de dados GenBank, EMBL e DDBJ, selecionaram os oligonucleotídeos iniciadores 19F e 407R, que amplificam um fragmento de aproximadamente 390 pb. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores são apresentadas a seguir:

*forward* 19F (5'-CCI WTY TAY GGI AAR GGI GG-3') e *reverse* 407R (5'-AAI CCR CCR CAI ACI ACR TC-3') Ueda et al.(1995)

onde I representa inosina, R representa A ou G, W representa A ou T e Y representa C ou T. O iniciador 19F corresponde a uma região *ATP-binding*. Para a amplificação das estirpes utilizadas foram realizadas algumas modificações nas condições propostas por Ueda et al. (1995) (Tabela 5).

TABELA 5. Condição modificada de amplificação da PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos da região conservada *nifH* proposta por Ueda et al. (1995)

REAGENTES (concentração)	VOLUME REAÇÃO (μL)	NA
DNA (50ng/ μL)	1,5	
Tampão da enzima (10X)	2	
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,6	
DNTPs (10 mM)	0,4	
Taq DNA polimerase (5U/μL)	0,3	
“oligonucleotídeo iniciador” 19F (1μg/μL)	1	
“oligonucleotídeo iniciador” 407R (1μg/μL)	1	
Água MilliQ	13,2	
TOTAL	20	
Programas utilizados no Termociclador:		
01) 95°C – 5 min.; 02) 95°C – 1 min.; 03) 46°C – 1 min.e 30 seg.; 04) 72°C – 2 min.; 05) 40 ciclos etapas 02 a 04; 06) 72°C – 5 min.; 07) 4°C por tempo indeterminado.		

### 3.6 Purificação dos Produtos de PCR dos genes *nifH* 16S *rDNA*

Os produtos de PCR foram submetidos a purificação através do uso da enzima ExoSAP-IT<sup>®</sup> *usb(GE)* antes do seqüenciamento. Para tal, foram adicionados 2μL da enzima a 5μL do produto de PCR, que então foram mantidos a 37°C por 15 minutos para degradar o excesso de oligonucleotídeos iniciadores e nucleotídeos da reação. Posteriormente as amostras foram mantidas a 80°C por 15 minutos, para a inativação da enzima ExoSAP-IT *usb(GE)*.

### 3.7 Eletroforese em Gel de Agarose contendo Brometo de Etídio (EB AGE) e documentação

A separação dos produtos amplificados pela PCR foi realizada em géis de agarose (BioRad) na concentração de 1,5%, em cuba horizontal, em tampão TBE (89mM de Tris – base, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH8,3). Estes géis também foram visualizados através da incidência de luz ultravioleta, identificados e registrados através de um sistema de documentação de géis (GEL Doc1000 BioRad).

### 3.8 Reação da PCR para seqüenciamento do fragmento da região 16S *rDNA* amplificado

As reações de seqüenciamento foram realizadas em microplacas utilizando o Kit DyeNamic™ET terminator. Foram efetuadas reações para o oligonucleotídeos iniciadores, forward pA-F e pc5B-R de forma independente. As reações de seqüenciamento apresentam-se na Tabela 6. As condições utilizadas no termociclador estão especificadas na Tabela 4.

TABELA 6. Reação de seqüenciamento 16S

Reagentes	Volume nas reações (µL)
pA-F (50 ng/µL)	0,6
produto de PCR 16S	3,5
terminadores Dynamic;	0,4
tampão 2,5 X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl <sub>2</sub> )	5,5
TOTAL	10
<hr/>	
pc5B-R (50 ng/µL)	0,6
produto de PCR 16S	3,5
terminadores Dynamic;	0,4
tampão 2,5 X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl <sub>2</sub> )	5,5
TOTAL	10

### 3.9 Reação da PCR para seqüenciamento do fragmento gênico *nifH* amplificado

As reações de seqüenciamento foram realizadas em microplacas utilizando o Kit DyeNamic™ET terminator. Foram efetuadas reações somente para o oligonucleotídeo iniciador 19F. As reações de seqüenciamento apresentam-se na Tabela 7. As reações foram submetidas ao termociclador segundo as condições especificadas na Tabela 5.

TABELA 7: Reação de seqüenciamento *nifH*

Reagentes	Volume nas reações (µL)
19F (1µg/µL)	1
produto de PCR <i>nifH</i> + Exo-SAP	3,5
terminadores Dynamic;	0,5
tampão 2,5 X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl <sub>2</sub> )	5
TOTAL	10 µL

### 3.10 Seqüenciamento automático dos produtos de PCR 16S e *nifH*

Após a reação, as amostras foram preparadas para o seqüenciamento parcial de DNA em microplacas. Para a precipitação, foram adicionados 80µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Posteriormente, as amostras permaneceram por 15 minutos em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 3.220xg por 45 minutos, a 20°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e a placa deixada por 5 minutos em temperatura ambiente, invertida em papel absorvente. Foram adicionados 200µL de etanol 70% e a microplaca foi submetida à centrifugação a 3.220xg por 10 minutos, a 20°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi novamente dispensado e a placa invertida novamente sobre papel absorvente para uma breve centrifugação (spin). As amostras foram secas em fluxo laminar por 30 minutos.

A desnaturação foi realizada com Hi-Di Formamide – Catálogo – P/N 4311320 (ABI Prism) a 95°C, por 5 min, sendo então seqüenciados no 3700 DNA Analyzer ABI Prism (Applied Biosystems).

### 3.11 Análise das Seqüências

A análise para verificar a qualidade das seqüências geradas foi realizada pelo programa “Sequencing Analysis 3.4”, que gerou arquivos contendo o eletroforetograma de cada seqüência. Estes eletroforetogramas eram inicialmente analisados com o auxílio do programa PHRED (Ewing et al., 1998) que fez a chamada de bases (*basecalling*) e gerou um arquivo contendo a seqüência de bases no formato “fasta”. Além disso, este programa calculou um valor de qualidade para cada uma das bases. O valor de qualidade atribuído a cada base pelo programa PHRED ( $q$ ) é obtido por:

$$q = -10 \times \log_{10}(p),$$

onde  $p$  é a probabilidade de erro estimada para uma determinada chamada de base. Os arquivos contendo a seqüência de bases e seus respectivos valores de qualidade são gerados pelo programa PHRED (contendo a extensão “.phd”). Levando em consideração a seqüência de bases e os valores de qualidades calculados pelo PHRED, o programa PHRAP (Ewing et al., 1998) gera uma seqüência consenso, com base na sobreposição de seqüências. As seqüências alinhadas e o consenso foram visualizados e analisados no editor de seqüências CONSED (Gordon et al., 1998). Esses arquivos foram analisados pelo programa “Contgen.pl” e tiveram as seqüências menores que 100 nucleotídeos com qualidade inferior a 20 descartadas, para permitir maior confiabilidade nos resultados.

Em seguida as seqüências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos através do programa BLASTn (Altschul, 1997), para comparação com seqüências homólogas depositadas no banco de dados público mundial (GenBank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para confirmar o seqüenciamento, acessado através do programa BLAST “Basic Local Alignment Search Tools” (Altschul et al., 1997), realizada em uma “workstation” SUNBLADE 1000 (SUN Microsystems), pelo “site” do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (<http://lbmp.fcav.unesp.br/blast>). O programa “BLAST” verificou a identidade do material que foi seqüenciado, confrontando com seqüências já existentes no banco de dados, retornando um relatório com os resultados contendo a identificação das seqüências (nome dos genes e organismo ao qual elas pertencem), valores de identidade, “score”, “e-value” e alinhamento das mesmas. A qualidade do alinhamento é dada pelo valor *score*, e um *valor E*, que indica a probabilidade daquele alinhamento ter sido ao acaso e não devido a uma relação entre as seqüências. A qualidade do

alinhamento é dada pelo valor *score*, em bits (quantidade de informação). Este valor representa o valor do *score* para o alinhamento, denominado S' e calculado a partir de um segundo valor de *score* para o alinhamento, denominado S (ou *score* bruto). O valor de S' é calculado pela seguinte fórmula:

$$- S' = (\frac{S}{K} - \ln.K) / \ln 2$$

Os parâmetros  $\frac{S}{K}$  e K dependem da matriz de substituição escolhida e das penalizações para os gaps (descontos nos valores de *score*). Essa matriz define os valores dados aos diferentes tipos de substituição. O valor do *score* bruto (S) é calculado diretamente a partir do alinhamento, como sendo a soma dos valores de substituição (obtidos a partir das matrizes de substituição) menos a soma para os “gaps”.

### 3.12 Preparação da árvore filogenética

Depois de analisadas todas as seqüências consenso, um alinhamento global foi realizado com todas as seqüências dos isolados juntamente com as seqüências que apresentaram maior grau de identidade identificado pelo programa BLASTn e alguns organismos de referência obtidos do banco de dados Kazusa (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) (Nakamura et al., 2000). Esse alinhamento foi feito pelo programa “CLUSTALX V.1.81” (Thompson et al., 1997) com base no gene *nifH* e na região 16S *rDNA*, com o propósito de agrupar as bactérias nos respectivos gêneros, com os seguintes parâmetros: Pairwise Alignment (Gap opening 10.00, Gap Extension 0.10), Multiple Alignment (Gap opening 10.00, Gap Extension 0.10).

Para matriz de distância das árvores filogenéticas foi utilizado o algoritmo “Jukes-Cantor” (Jukes e Cantor, 1969) e o método de construção de filogramas foi o “Neighbor-Joining” (Saitou e Nei, 1987), processados pelo programa de Análise Genética de Evolução Molecular MEGA3 (Kumar et al., 2004). Nessa análise a distância evolutiva foi calculada para cada par de seqüências do alinhamento através do método JUKES & CANTOR, que constrói uma matriz numérica, onde cada valor representa a estimativa da distância entre cada par de seqüências. Para que não haja uma sub-estimativa da distância evolutiva real que separa os organismos, o programa aplica um modelo evolutivo específico, com correção para

ocorrência de substituições múltiplas. O método de Neighbor-Joining parte de uma topologia sem resolução (estrela) e procura, em cada ciclo, o par de seqüências que contribui com a menor soma de ramos para a topologia da árvore (Método de Evolução Mínima).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estirpes de rizóbios utilizadas foram cultivadas conforme descrito na metodologia, sem ocorrência de interferências. Os procedimentos de extração do DNA mostraram-se bastante eficientes, proporcionando amostras concentradas, íntegras e ausentes de resíduos. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro com uma absorvância de 260 nm, sendo que todas as amostras apresentaram a relação 260/280 entre valores de 1,8 e 2,2, que é a faixa de relação ideal. As concentrações de DNA genômico foram ajustadas para aproximadamente 50ng para utilização nas preparações de PCR. Para otimização e padronização das condições de amplificação e concentrações de reagentes, tanto nas PCR da região do 16S *rDNA* quanto do gene *nifH*, foram realizados diversos testes.

### 4.1 Sequenciamento dos produtos de PCR 16S *rDNA*

As reações de amplificação da região que codifica o gene 16S *rDNA* das estirpes estudadas resultaram em fragmentos de em torno de 1,5Kb, que foram então purificados com a enzima Exosap, para retirada de resíduos de reagentes. Os produtos de PCR purificados foram então utilizados nas reações de sequenciamento, tanto pela direção forward, utilizando o oligonucleotídeo iniciador pA, quanto pela direção reverse, utilizando o oligonucleotídeo iniciador pC5b. A qualidade do sequenciamento foi adequada nas duas direções, produzindo seqüências de 150 a 550 pb.

Curiosamente, as estirpes padrões LMG 6125 (*Mesorhizobium loti*) e LMG 18976 (*Mesorhizobium tianshanense*) e a recomendada SEMIA 116 (*Ensifer meliloti*) não puderam ser amplificadas em nenhuma das direções. Pela direção forward, a estirpe SEMIA 6146 (*Bradyrhizobium spp.*) também não amplificou, e pela direção reverse, não puderam ser amplificadas as estirpes LMG 6134 (*Bradyrhizobium elkani*), LMG 19227 (*Ensifer kostiense*) e SEMIA 134 (*Ensifer meliloti*).

Os relatórios com os resultados contendo a identificação das seqüências, valores de identidade, “score”, “e-value” e alinhamento das seqüências encontram-se no apêndice. O resumo dos relatórios obtidos do BLASTn encontram-se nas Tabelas 8 e 9.

TABELA 8. Identificação preliminar com base na identidade de seqüência parcial do gene 16S *rDNA*, obtida pela direção forward

Estirpe	Classificação Atual	Organismo mais relacionado	Score	E Value	Identidade	Tamanho do Fragmento	Acesso no Genbank
SEMIA103	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	1201	0.0	97%	487 pb	D14509
SEMIA134	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Rhizobium loti</i>	617	e-174	94%	270 pb	U50165
SEMIA135	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	1037	0.0	95%	481 pb	EF035061
SEMIA265	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	759	0.0	95%	326 pb	DQ303304
		<i>Rhizobium leguminosarum bv. vici</i>					
SEMIA344	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	<i>Rhizobium mongolense</i>	1166	0.0	96%	463 pb	U89824
SEMIA384	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>	<i>Soil DNB bacterium</i>	1178	0.0	97%	530 pb	U89820
SEMIA388	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	<i>Mesorhizobium sp.</i>	854	0.0	97%	373 pb	AB003458
SEMIA396	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	500	e-139	96%	205 pb	EF035058
SEMIA587	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	1063	0.0	98%	477 pb	AF208510
SEMIA656	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	1021	0.0	97%	434 pb	AJ301630
SEMIA662	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	337	3e-90	90%	150 pb	AJ301631
SEMIA695	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium loti</i>	652	0.0	90%	240 pb	AB220167
SEMIA806	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Rhizobium loti</i>	496	e-138	89%	142 pb	RLU50166
SEMIA816	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Mesorhizobium sp.</i>	1197	0.0	97%	541 pb	AY491075
SEMIA830	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Rhizobium loti</i>	371	e-100	95%	164 pb	X63825
SEMIA928	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	1072	0.0	98%	500 pb	AF363148
SEMIA929	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	662	0.0	92%	246 pb	Z94812
SEMIA938	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Photorhizobium thompsonianum</i>	1130	0.0	98%	504 pb	L23405
		<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>					
SEMIA2002	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>	890	0.0	94%	278 pb	U31074
		<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>					
SEMIA2050	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	646	0.0	97%	291 pb	U31074
SEMIA2051	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	583	e-164	96%	286 pb	EF035071
SEMIA3007	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	684	0.0	93%	277 pb	AF506053
SEMIA3012	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	<i>Mesorhizobium sp.</i>	844	0.0	98%	3012 pb	EF035058
SEMIA3025	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	1174	0.0	98%	498 pb	EF035071
SEMIA3026	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	383	e-104	95%	333 pb	AB126767
SEMIA4077	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	365	e-98	94%	152 pb	EF035059
SEMIA4080	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	1116	0.0	99%	526 pb	EF035059
SEMIA5019	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1193	0.0	98%	526 pb	AF208510

continua...

Estirpe	Classificação Atual	Organismo mais relacionado	Score	E Value	Identidade	Tamanho do Fragmento	Acesso no Genbank
SEMIA5079	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	327	2e-87	97%	175 pb	DQ303326
SEMIA5080	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	504	e-140	97%	220 pb	AF293381
SEMIA6069	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	1033	0.0	97%	481 pb	AY206687
SEMIA6070	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	965	0.0	97%	492 pb	AY507977
SEMIA6144	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	771	0.0	96%	349 pb	AF293381
SEMIA6145	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	934	0.0	95%	375 pb	AY904732
SEMIA6150	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	476	e-132	94%	285 pb	AY834756
SEMIA6152	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Soil DNB bacterium</i>	381	e-103	96%	138 pb	AB003457
SEMIA6153	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Sinorhizobium xinjiangensis</i>	605	e-171	92%	209 pb	AF250377
SEMIA6154	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	1146	0.0	97%	491 pb	D86354
SEMIA6156	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	350	0.0	98%	472 pb	AJ301630
SEMIA6157	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1041	0.0	98%	456 pb	U35000
SEMIA6158	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	753	0.0	90%	222 pb	Z94821
SEMIA6159	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	293	e-163	90%	234 pb	AY834756
SEMIA6161	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Sinorhizobium saheli</i>	684	0.0	90%	191pb	X68390
SEMIA6162	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	529	e-148	95%	205 pb	AF285963
SEMIA6165	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	70	9e-10	86%	201 pb	AZ934358
SEMIA6168	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	842	0.0	94%	257 pb	AF260274
SEMIA6169	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	714	0.0	91%	239 pb	AF054930
SEMIA6175	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	914	0.0	97%	443 pb	AF208510
SEMIA6192	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	791	0.0	91%	268 pb	AY039015
SEMIA6209	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	874	0.0	92%	247 pb	AF321212
SEMIA6319	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	757	0.0	93%	285 pb	AF363136
SEMIA6424	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	529	e-148	89%	365 pb	AM412315
LMG6133	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	490	e-136	95%	223 pb	AJ004860
LMG6134	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	115	2e-23	92%	115 pb	AB126767
LMG6138	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	626	e-177	92%	182 pb	AF417549
LMG6217	<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	250	4e-64	88%	114 pb	AM412315
LMG6346	<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Rhizobium galegae</i>	1213	0.0	98%	537 pb	Y12355
LMG6465	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	682	0.0	92%	214pb	X94200
LMG7834	<i>Sinorhizobium terangae</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	807	0.0	90%	224 pb	AF364853

continuação...

Estirpe	Classificação Atual	Organismo mais relacionado	Score	E Value	Identidade	Tamanho do Fragmento	Acesso no Genbank
LMG8819	<i>Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli</i>	<i>Rhizobium etli</i>	924	0.0	96%	418 pb	AY117635
LMG8820	<i>Rhizobium leguminosarum biovar trifolii</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trif</i>	745	0.0	94%	189 pb	U31074
LMG11875	<i>Rhizobium undicola</i>	<i>Allorhizobium undicola</i>	603	e-170	91%	189 pb	Y17047
LMG11892	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	272	e-70	88%	63 pb	AF227754
LMG14107	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	803	0.0	97%	380 pb	D13431
LMG14904	<i>Rhizobium leguminosarum biovar viceae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>	835	0.0	94%	298 pb	U31074
LMG14919	<i>Sinorhizobium arboris</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	692	0.0	96%	336 pb	AM284998
LMG14989	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Rhizobium gallicum</i>	957	0.0	96%	439 pb	U86343
LMG17148	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	<i>Mesorhizobium sp.</i>	880	0.0	97%	411 pb	AJ417085
LMG17827	<i>Rhizobium etli</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	692	0.0	91%	189 pb	AJ505300
LMG18254	<i>Rhizobium huautlense</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	1332	0.0	96%	525 pb	Y12352
LMG18864	<i>Sinorhizobium medicae</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	551	e-155	96%	232 pb	AM284998
LMG18977	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viceae</i>	394	e-107	96%	176 pb	U29386
LMG19141	<i>Rhizobium mongolense</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>	624	e-177	90%	221 pb	U31074
LMG19227	<i>Sinorhizobium kostiense</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	680	0.0	95%	272 pb	AF511501
LMG19592	<i>Rhizobium yanglingense</i>	<i>Rhizobium gallicum</i>	765	0.0	97%	319 pb	U86343
LMGH152	<i>Rhizobium giardini bv. giardini</i>	<i>Rhizobium giardinii</i>	1067	0.0	97%	499 pb	U86344
LMGR602	<i>Rhizobium gallicum bv. gallicum</i>	<i>Burkholderia sp.</i>	848	0.0	95%	351 pb	AY873982
							conclusão

TABELA 9. Identificação preliminar com base na identidade de seqüência parcial do gene 16S *rDNA*, obtida pela direção reversa

Estirpe	Classificação Atual	Organismo mais relacionado	Score	E Value	Identidade	Tamanho do Fragmento	Acesso no Genbank
SEMIA103	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	1296	0.0	95%	559 pb	L39882
SEMIA135	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	1405	0.0	96%	582 pb	AF054930
SEMIA265	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	1245	0.0	96%	554 pb	EF035072
							continua...

Estirpe	Classificação Atual	Organismo mais relacionado	Score	E Value	Identidade	Tamanho do Fragmento	Acesso no Genbank
SEMIA344	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	1328	0.0	94%	520 pb	RLU29386
SEMIA384	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	1082	0.0	96%	486 pb	U89829
SEMIA388	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	979	0.0	97%	422 pb	AY437439
SEMIA396	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1417	0.0	98%	595 pb	AJ417082
SEMIA587	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1398	0.0	96%	561 pb	AF208510
SEMIA656	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	807	0.0	91%	279 pb	AY904748
SEMIA662	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1223	0.0	97%	493 pb	X70402
SEMIA695	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	874	0.0	95%	255 pb	AF208510
SEMIA806	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	1263	0.0	96%	482 pb	Y14159
SEMIA816	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	1088	0.0	97%	453 pb	Y14159
SEMIA830	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	866	0.0	96%	347 pb	Y14159
SEMIA928	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1219	0.0	95%	505 pb	AY491080
SEMIA929	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1207	0.0	97%	503 pb	AF236086
SEMIA938	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1144	0.0	98%	938 pb	AF363115
SEMIA2002	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	1003	0.0	96%	435 pb	EF035072
SEMIA2050	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	864	0.0	96%	342 pb	EF035072
SEMIA2051	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	1205	0.0	94%	472 pb	U29386
SEMIA3007	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	1243	0.0	97%	474 pb	U31074
SEMIA3012	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1386	0.0	95%	550 pb	AJ417085
SEMIA3025	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	1291	0.0	94%	544 pb	U31074
SEMIA3026	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	724	0.0	89%	460 pb	AM412315
SEMIA4077	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	1128	0.0	95%	409 pb	AY117623
SEMIA4080	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	1394	0.0	95%	574 pb	Z94806
SEMIA5019	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1459	0.0	97%	585 pb	AF208510
SEMIA5079	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1253	0.0	94%	505 pb	AF363115
SEMIA5080	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1201	0.0	94%	445 pb	AF208503
SEMIA6069	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	<i>Rhizobium</i> sp.	1193	0.0	95%	497 pb	Z94806

continuação

Estirpe	Classificação Atual	Organismo mais relacionado	Score	E Value	Identidade	Tamanho do Fragmento	Acesso no Genbank
SEMIA6070	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	599	e-169	92%	460 pb	AY507969
SEMIA6144	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1094	0.0	94%	427 pb	AF208505
SEMIA6145	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1219	0.0	96%	501 pb	AF417550
SEMIA6146	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	714	0.0	91%	319 pb	AY834756
SEMIA6150	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	1213	0.0	93%	503 pb	AY834756
SEMIA6152	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	1368	0.0	95%	556 pb	Z94816
SEMIA6153	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	1354	0.0	96%	587 pb	AF268072
SEMIA6154	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	1427	0.0	96%	575 pb	AF514704
SEMIA6156	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1316	0.0	97%	556 pb	AF208510
SEMIA6157	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1205	0.0	96%	542 pb	AF208511
SEMIA6158	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	997	0.0	93%	393 pb	Z94821
SEMIA6159	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	944	0.0	91%	412 pb	AY834756
SEMIA6161	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	1089	0.0	95%	361 pb	AF285964
SEMIA6162	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	1112	0.0	96%	456 pb	AF285963
SEMIA6165	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Burkholderia sp.</i>	1330	0.0	96%	480 pb	AY773196
SEMIA6168	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	997	0.0	94%	295 pb	AF260274
SEMIA6169	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	527	e-147	92%	153 pb	AF054930
SEMIA6175	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1181	0.0	96%	459 pb	AF208510
SEMIA6192	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium lupini</i>	831	0.0	94%	256 pb	U69637
SEMIA6209	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	890	0.0	95%	291 pb	AF321212
SEMIA6319	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	1370	0.0	97%	568 pb	AF363136
SEMIA6424	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	761	0.0	90%	431 pb	AM412315
LMG6133	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Uncultured bacterium clone</i>	295	3e-76	85%	104 pb	DQ974030
LMG6138	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	952	0.0	94%	343 pb	AF236086
LMG6217	<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	323	4e-86	89%	170 pb	AY835643
LMG6346	<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1164	0.0	90%	466 pb	EU256493
LMG6465	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	793	0.0	90%	246 pb	X94200
LMG7834	<i>Sinorhizobium teranga</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	904	0.0	90%	261 pb	AF364853
LMG8819	<i>Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	1043	0.0	94%	400 pb	EF525212
LMG8820	<i>Rhizobium leguminosarum biovar trifolii</i>	<i>Rhizobium etli</i>	680	0.0	92%	168 pb	AY999325

continuação

Estirpe	Classificação Atual	Organismo mais relacionado	Score	E Value	Identidade	Tamanho do Fragmento	Acesso no Genbank
	<i>Rhizobium leguminosarum biovar trifolii</i>						
LMG8820	<i>Rhizobium trifolii</i>	<i>Rhizobium etli</i>	680	0.0	92%	168 pb	AY999325
LMG11875	<i>Rhizobium undicola</i>	<i>Allorhizobium undicola</i>	791	0.0	92%	250 pb	Y17047
LMG11892	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	345	e-92	97%	190 pb	AB167207
LMG14107	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Mesorhizobium sp.</i>	1255	0.0	96%	566 pb	Z94807
	<i>Rhizobium leguminosarum biovar viceae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>					
LMG14904	<i>Rhizobium viceae</i>	<i>Rhizobium trifolii</i>	1209	0.0	95%	489 pb	U31074
LMG14919	<i>Sinorhizobium arboris</i>	<i>Sinorhizobium arboris</i>	1181	0.0	96%	442 pb	AM181738
LMG14989	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Rhizobium etli</i>	549	e-154	98%	293 pb	AY161164
LMG17148	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	<i>Rhizobium mediterraneum</i>	1241	0.0	98%	547 pb	L38825
LMG17827	<i>Rhizobium etli</i>	<i>Rhizobium etli</i>	981	0.0	91%	273 pb	CP000133
LMG18254	<i>Rhizobium huautlense</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	1068	0.0	95%	444 pb	EF100525
LMG18864	<i>Sinorhizobium medicae</i>	<i>Sinorhizobium medicae</i>	2957	0.0	93%	346 pb	CP000738
LMG18977	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	899	0.0	93%	383 pb	EF525232
		<i>Rhizobium leguminosarum bv. trifolii</i>					
LMG19141	<i>Rhizobium mongolense</i>	<i>Rhizobium trifolii</i>	1156	0.0	96%	354 pb	U31074
LMG19592	<i>Rhizobium yanglingense</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	1271	0.0	96%	569 pb	EF107504
LMGH152	<i>Rhizobium giardini bv.giardini</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	1465	0.0	97%	614 pb	AF511492
LMGR602	<i>Rhizobium gallicum bv.gallicum</i>	<i>Burkholderia sp.</i>	1386	0.0	95%	580 pb	AY873982

conclusão

Análises baseadas na identidade de seqüências dos genes 16S *rDNA* com seqüências do Genbank, realizada pelo BLASTn.

**Organismo mais relacionado:** organismo que possui a seqüência com a qual a seqüência parcial do gene 16S *rDNA* da estirpe estudada apresentou maior homologia.

**Score:** pontuação do alinhamento.

**E Value:** probabilidade de se encontrar aleatoriamente o mesmo alinhamento entre duas seqüências.

**Identidade:** porcentagem de identidade entre a seqüência das estirpes estudadas e o organismo relacionado.

**Tamanho do fragmento:** tamanho da seqüência consenso.

**Acesso no GenBank:** número de acesso da seqüência do organismo relacionado.

A maior parte das seqüências das estirpes padrões e das estirpes recomendadas para inoculação, tanto pelo lado forward quanto reverse, apresentaram correspondência em relação à identidade de seqüências com suas respectivas parentais na seqüência de bases dessa região cromossômica conservada. Entretanto, estirpes como a LMG 6217 (*Ensifer fredii*) e SEMIA 6069 (*Bradyrhizobium spp.*) apresentaram homologia, nas duas direções, com seqüências de *Rhizobium sp.*, além das estirpes LMG 14989 (*Mesorhizobium ciceri*) e LMG 19592 (*Rhizobium yanglingense*) pela direção forward.

Também, as estirpes LMG 18977 (*Mesorhizobium amorphae*) e LMG 19141 (*Rhizobium mongolense*) apresentaram homologia pelas duas direções com *Rhizobium leguminosarum*, bem como a estirpe LMG 19227 (*Ensifer kostiense*) pelo lado forward. Apresentaram homologia com *Rhizobium etli* as estirpes LMG 8819 (*Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*), pelo lado forward, e LMG 14989 (*Mesorhizobium ciceri*), pelo lado reverso; com *Ensifer sp.* as estirpes LMG 11892 (*Mesorhizobium plurifarum*), SEMIA 6161 (*Bradyrhizobium spp.*) e SEMIA 6162 (*Bradyrhizobium spp.*), pelas duas direções; e com *Mesorhizobium sp.* as estirpes SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*) e SEMIA 396 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*), pelas duas direções, bem como SEMIA 134 (*Ensifer meliloti*) pelo lado forward. Além disso, a estirpe SEMIA 6168 (*Bradyrhizobium spp.*) apresentou homologia com *Rhizobium tropici* nas duas direções, bem como SEMIA 388 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*) com *Bradyrhizobium sp.*, SEMIA 6153 (*Bradyrhizobium spp.*) com *Sinorhizobium xinjiangensis*, e R602 (*Rhizobium gallicum bv. gallicum*), SEMIA 6424 (*Bradyrhizobium spp.*), SEMIA 6165 (*Bradyrhizobium spp.*) e SEMIA 3026 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*) apresentaram homologia com *Burkholderia s.p.*

LMG 18864 (*Ensifer medicae*) e SEMIA 6144 (*Bradyrhizobium spp.*) apresentaram homologia pelo BLASTn com *Sinorhizobium sp.* e *Bradyrhizobium sp.*; SEMIA 6169 (*Bradyrhizobium spp.*) com *Rhizobium sp.* e *Sinorhizobium sp.*; e SEMIA 6159 (*Bradyrhizobium spp.*) e SEMIA 6150 (*Bradyrhizobium spp.*) com *Rhodopseudomonas palustris* e *Burkholderia sp.*, todos pelas direções forward e reverse. A estirpe SEMIA 6146 (*Bradyrhizobium spp.*) também apresentou homologia com *Rhodopseudomonas palustris* e *Burkholderia sp.* pelo lado reverso.

Comparado ao trabalho realizado por Menna et al. (2006), em que 66 estirpes SEMIA foram analisadas por seqüenciamento completo da região do 16S *rDNA*, 36 delas são coincidentes com estirpes estudadas neste trabalho. As seqüências das estirpes SEMIA 103,

SEMIA 396, SEMIA 6157, SEMIA 6161 e SEMIA 6192 depositadas no banco de dados mundial (NCBI) por Menna et al. (2006) permaneceram dentre as cinco com maior identidade de sequências com estas mesmas estirpes deste trabalho quando tiveram suas sequências analisadas no Blast. Além destas, as estirpes SEMIA 134, 135, 587, 656, 662, 695, 816, 830, 938, 2051, 3007, 5019, 5079, 5080, 6070, 6145, 6152, 6156, 6158, 6159, 6168, 6175 e 6319 apresentaram identidade de sequências com as mesmas espécies das estirpes semelhantes que foram seqüenciadas por Menna et al. (2006), sendo que SEMIA 396, SEMIA 6161 e SEMIA 6168 têm como classificação atual, respectivamente, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Bradyrhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp., mas, segundo estes resultados e os resultados obtidos por Menna et al. (2006), deveriam ser classificados como respectivamente *Mesorhizobium ciceri*, *Ensifer* sp. e *Rhizobium* sp.. Também as estirpes SEMIA 587, 662, 5019, 6157, 6158 e 6175 ficaram agrupadas juntamente com *Bradyrhizobium elkanii* e as estirpes SEMIA 5079, 5080 e 6152 ficaram agrupadas com *Bradyrhizobium japonicum* nas árvores construídas neste trabalho, o que corrobora com os resultados de seqüenciamento da região 16S *rDNA* obtidos por Menna et al. (2006). Estes resultados sugerem a não obrigatoriedade de seqüenciamento completo da região 16S *rDNA* para finalidade de classificação, já que o banco de dados deste tipo de sequências já é bastante extenso, possibilitando que seja realizada com sequências parciais desta região.

É interessante observar que algumas estirpes, destas 36 coincidentes, não apresentaram identidades de sequências semelhantes, como é o caso da estirpe SEMIA 384, cuja classificação atual é de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, e que neste trabalho manteve esta classificação, mas que o trabalho de Menna et al. (2006) apresentou a sugestão de classificação de *Rhizobium etli*. A estirpe SEMIA 6069, cuja classificação atual é *Bradyrhizobium* sp., apresentou identidade de sequência com *Rhizobium* sp. tanto nas análises das sequências 16S *rDNA* quanto *nifH* deste trabalho. Entretanto Menna et al. (2006) sugeriram que a classificação da mesma seja *Bradyrhizobium elkanii*.

As sequências forward e reverse produziram árvores idênticas, conforme o esperado, dividindo as estirpes em alguns grupos. As estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkani* formaram um agrupamento mais diretamente relacionado a *Azorhizobium caulinodans*. As estirpes *Mesorhizobium mediterraneum*, *M. tianshanense*, *M. amorphae*, *M. huakuii*, *M. plurifarum*, *M. loti* e *M. ciceri* formaram outro agrupamento. As estirpes de *Ensifer teranga*, *E. meliloti* e *E. fredii* formaram um grupo mais proximamente relacionado ao grupo das estirpes de *Rhizobium* (*R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. tropici*, *R. mongolense*,

*R. gallicum*, *R. yanglingense*, *R. galegae*, *R. huautlense*, *R. undicola* e *R. giardinii*) (Figura 1).

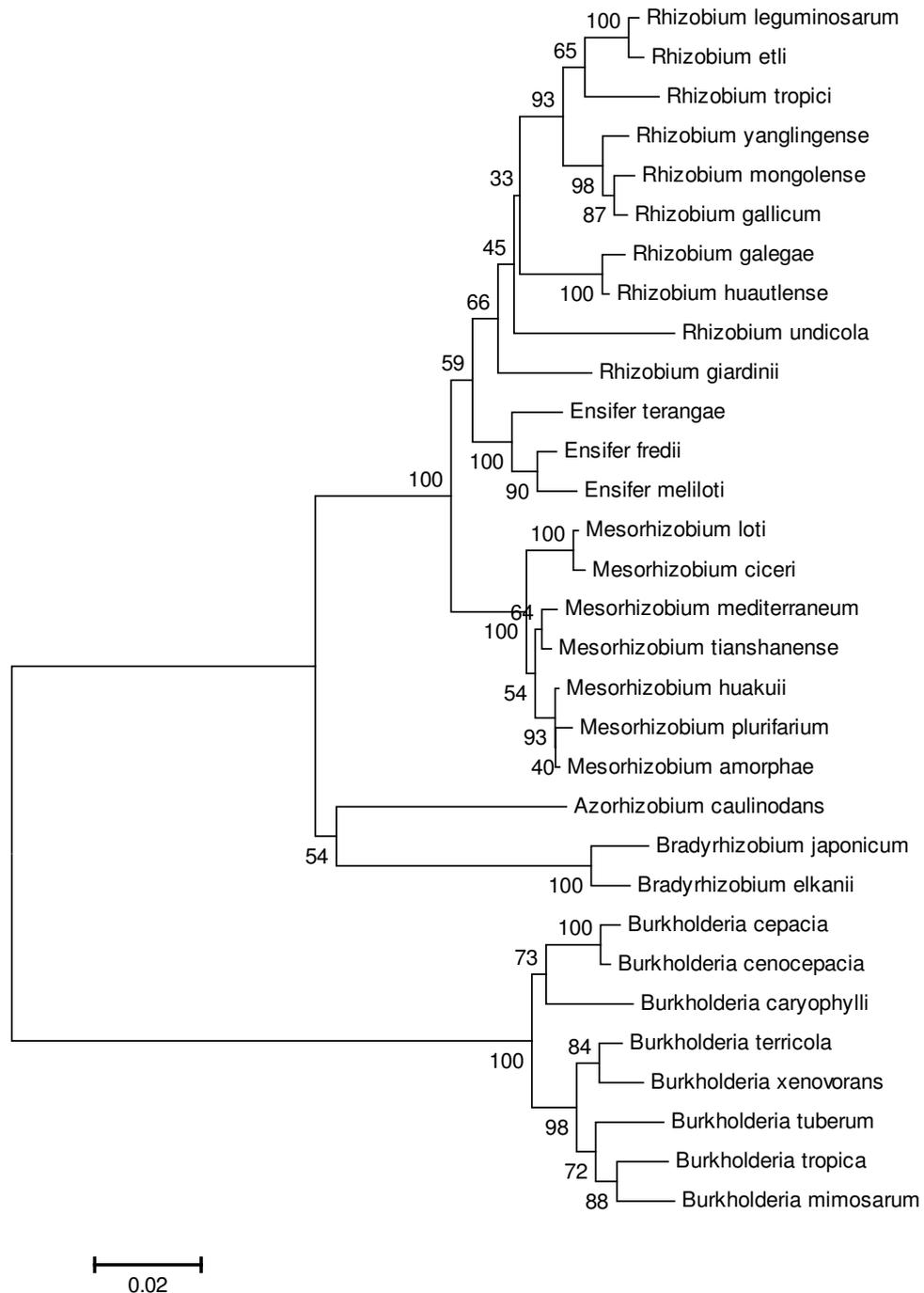


FIGURA 1. Árvore filogenética (Neighbour-Joining – Jukes Cantor) baseada nas seqüências parciais do gene 16S *rDNA*, obtidas no Genbank.

Valores de bootstrap estão indicados na árvore.

Também foi criada uma árvore filogenética a partir das seqüências obtidas no Genbank e das seqüências das estirpes padrões LGM (Figura 2). Esta árvore também permitiu a distribuição de quase todas as estirpes em grupos formados como nas árvores descritas anteriormente. Com exceção da estirpe R602 (*Rhizobium gallicum* bv. *gallicum*), que ficou próxima da estirpe LMG 6217 (*Ensifer fredii*), todas as demais estirpes de *Rhizobium* spp. permaneceram devidamente agrupadas com outras estirpes de *Rhizobium* spp.. O mesmo ocorreu com a estirpe LMG 6138 (*Bradyrhizobium japonicum*), que permaneceu próxima a estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* cuja seqüência foi obtida do banco de dados mundial. As estirpes de *Ensifer* spp. também permaneceram devidamente agrupadas, com exceção das estirpes LMG 7834 (*Ensifer teranga*), que ficou agrupada juntamente com as estirpes de *Rhizobium* spp., LMG 6217, que ficou próxima ao grupo *Ensifer*, mas formou agrupamento com R602 (*Rhizobium gallicum* bv. *gallicum*), e LMG 6133 (*Ensifer meliloti*), que formou um grupo externo com LMG 14989 (*Mesorhizobium ciceri*). É interessante observar que todas estas estirpes apresentaram correspondência com estirpes semelhantes pela análise de similaridade de nucleotídeos, com exceção da LMG 14989 (*Mesorhizobium ciceri*), que apresentou correspondência com *Rhizobium etli*. As estirpes LMG 14107 (*Mesorhizobium huakuii*) e LMG 17148 (*Mesorhizobium mediterraneum*) ficaram agrupadas corretamente com as demais estirpes de *Mesorhizobium* spp., porém LMG 18977, LMG 11892 e LMG 14989 formaram um grupo externo juntamente com LMG 6133; sendo que nenhuma delas apresentou correspondência pelo BLASTn com a devida estirpe.

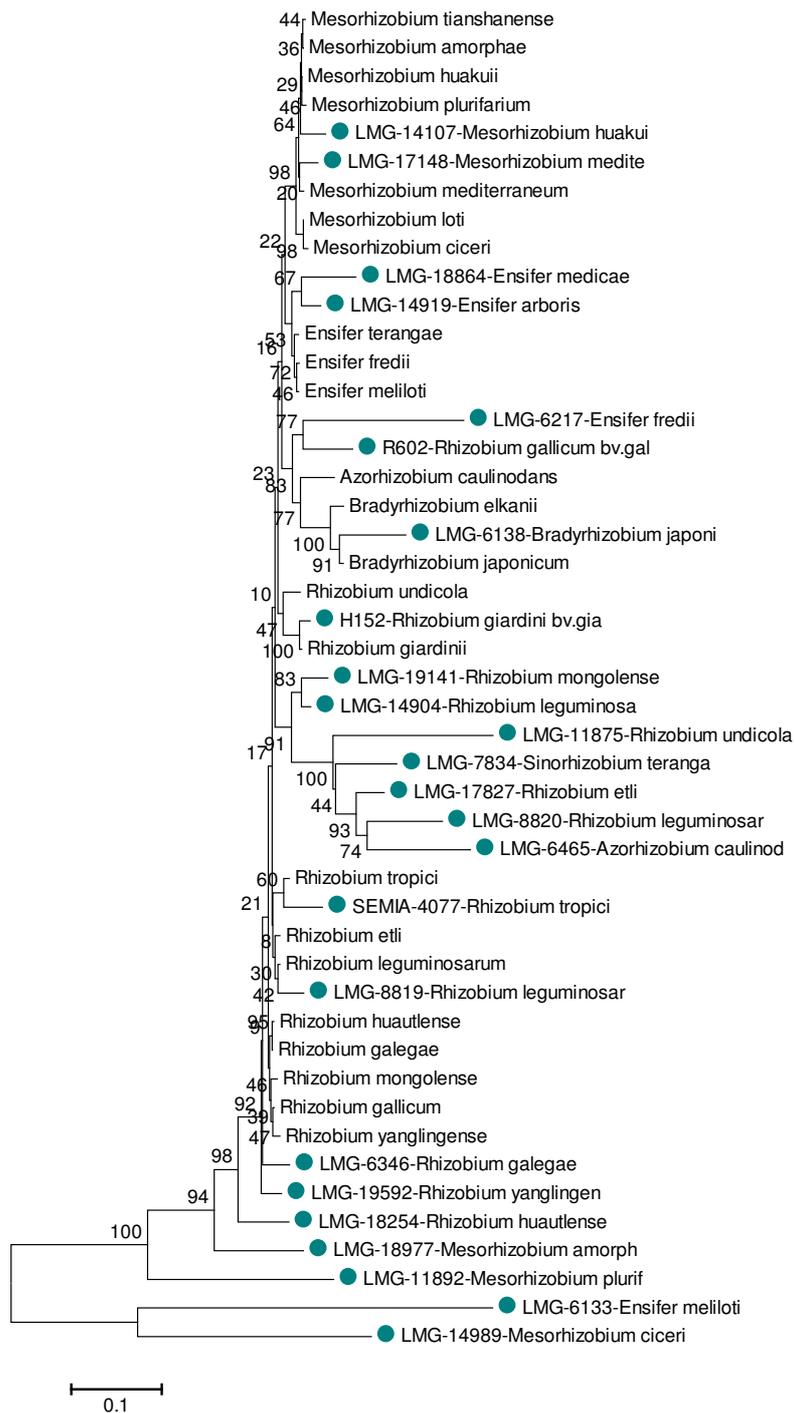


FIGURA 2. Árvore filogenética (Neighbour-Joining – Jukes Cantor) baseada nas seqüências parciais do gene 16S *rDNA* obtidas no Genbank e das estirpes LMG estudadas, obtidas pelo lado reverse.

Valores de bootstrap estão indicados na árvore.

Foram geradas outras árvores filogenéticas, tanto pela direção forward como pela direção reverse, das estirpes recomendadas para inoculação de leguminosas. Estas árvores apresentaram uma divisão bastante definida em três grupos. Um deles é o de estirpes que

apresentaram homologia por *Burkholderia sp.*, representados por um losango na cor roxa. Outro grupo é de estirpes de *Bradyrhizobium sp.* que apresentaram homologia das seqüências de nucleotídeos com estirpes de *Bradyrhizobium spp.*, representadas por círculos na cor verde, ou ainda estirpes que não sejam *Bradyrhizobium spp.*, mas que apresentam homologia pelo BLAST com *Bradyrhizobium sp.*, representados por losangos verdes. Um terceiro grupo abrange estirpes de *Rhizobium* que apresentam homologia com *Rhizobium sp.* (representados por círculos na cor laranja), estirpes classificadas em outros gêneros que apresentam homologia com *Rhizobium spp.* (representados por losangos na cor laranja), estirpes de *Ensifer spp.* que apresentam homologia com *Ensifer sp.* (representados por círculos na cor amarela), estirpes classificadas em outros gêneros que também apresentam homologia com *Ensifer sp.* (representados por losangos na cor amarela), estirpes *Mesorhizobium spp.* que apresentam homologia por *Mesorhizobium sp.* (representados por círculos na cor vermelha), ou ainda estirpes classificadas em outros gêneros que apresentem homologia por *Mesorhizobium sp.* (representados por losangos na cor vermelha).

As árvores filogenéticas construídas com seqüências das estirpes de rizóbios recomendadas para inoculação de leguminosas juntamente com seqüências da região 16S *rDNA* de estirpes padrões obtidas no Genbank estão apresentadas nas Figuras 3, 4 e 5.

Na árvore obtida por seqüências obtidas a partir da direção forward do 16S *rDNA* observou-se, conforme descrito anteriormente, um grupo de estirpes classificadas como *Bradyrhizobium sp.* que apresentaram homologia por seqüência de organismos da mesma espécie, representados por SEMIA 6154, SEMIA 6145, SEMIA 938, SEMIA 929, SEMIA 6152, SEMIA 6156, SEMIA5019, SEMIA 928, SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Estas mesmas estirpes também agruparam da mesma maneira em uma árvore construída com aquelas recomendadas para inoculação de leguminosas juntamente com estirpes padrões do Genbank, todas obtidas pelo lado reverso. Além destas, outras estirpes também permaneceram neste mesmo grupo na árvore das seqüências do lado reverso, mas foram agrupadas separadamente na árvore das seqüências do lado forward, sendo elas SEMIA 6209, SEMIA 6192, SEMIA 6319, SEMIA 6158, e SEMIA 695 (todas classificadas como *Bradyrhizobium sp.*). Verificou-se também que, dentro destes grupos, formou-se um subgrupo com as estirpes SEMIA 656 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), SEMIA 6157 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 587 (*Bradyrhizobium elkanii*), SEMIA 6175 (*Bradyrhizobium sp.*) e SEMIA 6156 (*Bradyrhizobium sp.*), que estão mais relacionadas à *Bradyrhizobium elkanii*. Além disso, a estirpe SEMIA 388 (*Rhizobium leguminosarum bv.viciae*) permaneceu junto às

estirpes de *Bradyrhizobium sp.* nas duas árvores, sendo que em ambas ficou próxima às estirpes de *B. elkanii*. A dificuldade em separar espécies de *Bradyrhizobium* deve-se a baixa variabilidade genética entre as mesmas, impossibilitando muitas vezes a diferenciação entre *B. japonicum* e *B. elkanii* (Chueire et al., 2000).

O grupo de estirpes que apresentaram homologia por *Burkholderia sp* foi formado por SEMIA 6424 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 3026 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*) e SEMIA 6070 (*Bradyrhizobium sp.*), na árvore forward, e, além destas estirpes, as SEMIA 6165 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 6146 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 6159 (*Bradyrhizobium sp.*) e SEMIA 6150 (*Bradyrhizobium sp.*), na árvore reversa. É interessante observar que a estirpe SEMIA 6070 (*Bradyrhizobium sp.*), apesar de haver apresentado homologia por *Bradyrhizobium sp.* na consulta ao BLASTn, permaneceu neste grupo de *Burkholderia SP.* nas duas árvores. A estirpe SEMIA 6168 (*Bradyrhizobium sp.*) agrupou com estirpes de *Rhizobium sp.*, *Ensifer sp.* e *Mesorhizobium sp.* nas duas árvores, assim como a estirpe SEMIA 6150 (*Bradyrhizobium sp.*) na árvore forward.

O terceiro grupo, formado por estirpes de *Rhizobium spp.*, *Ensifer spp.* e *Mesorhizobium spp.*, ficou bastante definido na árvore reversa, agrupando as estirpes *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium tropici* SEMIA 3007, SEMIA 384, SEMIA 3025, SEMIA 344, SEMIA 265 e SEMIA 4080, além da SEMIA 6069 (*Bradyrhizobium sp.*) junto às estirpes de *Rhizobium sp.* Junto a este subgrupo permaneceu também as estirpes SEMIA 6168, SEMIA 6161 e SEMIA 6169. No subgrupo formado por estirpes *Ensifer sp.* permaneceram as estirpes SEMIA 135 (*Ensifer meliloti*), SEMIA 6153 (*Bradyrhizobium sp.*) e SEMIA 103 (*Ensifer meliloti*). No subgrupo das estirpes do gênero *Mesorhizobium* ficaram agrupadas SEMIA 806 (*Mesorhizobium loti*), SEMIA 396 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum bv.viceae*). Inesperadamente, em um outro subgrupo permaneceram as estirpes SEMIA 2050 (*Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*), SEMIA 2051 (*Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*), SEMIA 6162 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 6144 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 830 (*Mesorhizobium loti*), SEMIA 2002 (*Rhizobium leguminosarum bv.trifolii*) e SEMIA 816 (*Mesorhizobium loti*).

Na árvore forward este grupo não formou subgrupos muito definidos, permanecendo “misturadas” as estirpes de *Rhizobium spp.*, *Ensifer spp.* e *Mesorhizobium spp.* (SEMIA 344 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*), SEMIA 265 (*Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*), SEMIA 384 (*Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*), SEMIA 4080 (*Rhizobium tropici*), SEMIA 3025 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*), SEMIA 6069 (*Bradyrhizobium sp.*),

SEMIA 103 (*Ensifer meliloti*), SEMIA 6153 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 6144 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 6161 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 396 (*Rhizobium leguminosarum bv.viceae*), SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*), SEMIA 6162 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 830 (*Mesorhizobium loti*), SEMIA 135 (*Ensifer meliloti*), SEMIA 3007 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*), SEMIA 2002 (*Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*), SEMIA 816 (*Mesorhizobium loti*), SEMIA 6169 (*Bradyrhizobium sp.*) e SEMIA 806 (*Mesorhizobium loti*)), ficando mais proximamente relacionadas com o grupo de *Bradyrhizobium sp.* formado pelas estirpes SEMIA 6209 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 6192 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 6319 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 6158 (*Bradyrhizobium sp.*), SEMIA 662 (*Bradyrhizobium sp.*), e SEMIA 695 (*Bradyrhizobium sp.*).

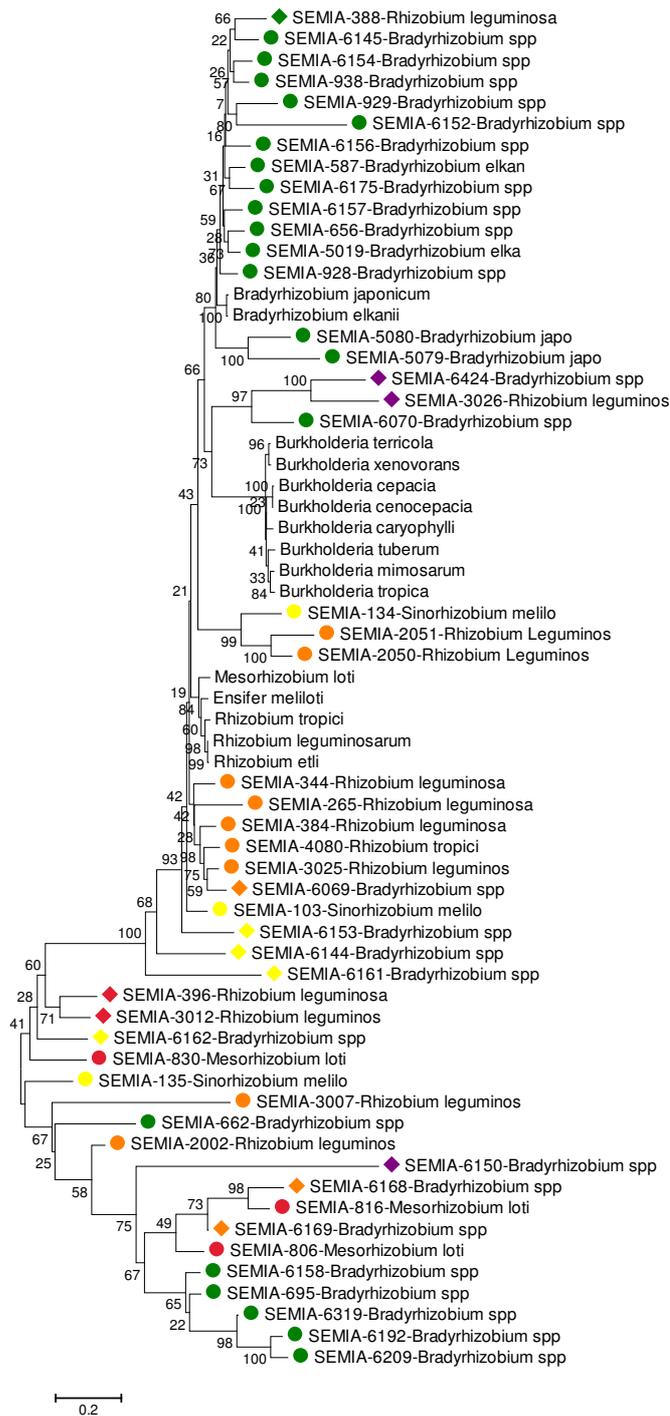


FIGURA 3. Árvore filogenética (Neighbour-Joining – Jukes Cantor) baseada nas seqüências parciais do gene 16S *rDNA* obtidas no Genbank e das estirpes SEMIA estudadas, obtidas pelo lado forward.

Valores de bootstrap estão indicados na árvore. Estão representadas por losangos coloridos as estirpes que não tiveram correspondência entre sua atual classificação e os resultados do Blastn, e por círculos coloridos, estirpes que obtiveram correspondência entre sua classificação taxonômica e os resultados do Blastn (Verde – *Bradyrhizobium* spp., Vermelho – *Mesorhizobium* spp., Amarelo – *Ensifer* spp., Alaranjado – *Rhizobium* spp., Roxo – *Burkholderia* sp. e *Rhodopseudomonas* spp.)

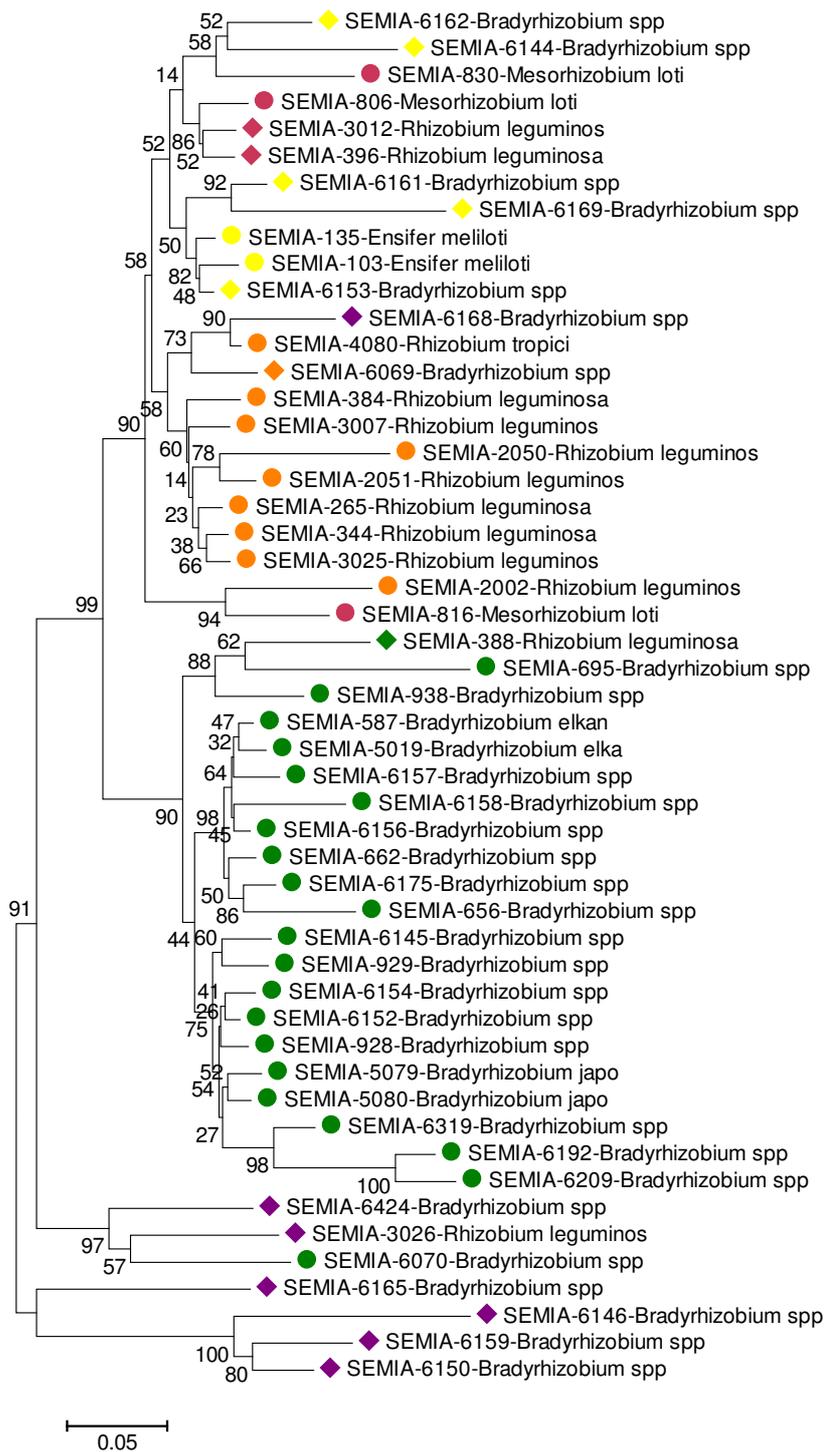


FIGURA 4. Árvore filogenética (Neighbour-Joining – Jukes Cantor) baseada nas seqüências parciais do gene 16S *rDNA* das estirpes SEMIA estudadas, obtidas pelo lado reverse. Valores de bootstrap estão indicados na árvore. Estão representadas por losangos coloridos as estirpes que não tiveram correspondência entre sua atual classificação e os resultados do Blastn, e por círculos coloridos, estirpes que obtiveram correspondência entre sua classificação taxonômica e os resultados do Blastn (Verde – *Bradyrhizobium spp.*, Vermelho – *Mesorhizobium spp.*, Amarelo – *Ensifer spp.*, Alaranjado – *Rhizobium spp.*, Roxo – *Burkholderia spp.* e *Rhodopseudomonas spp.*)

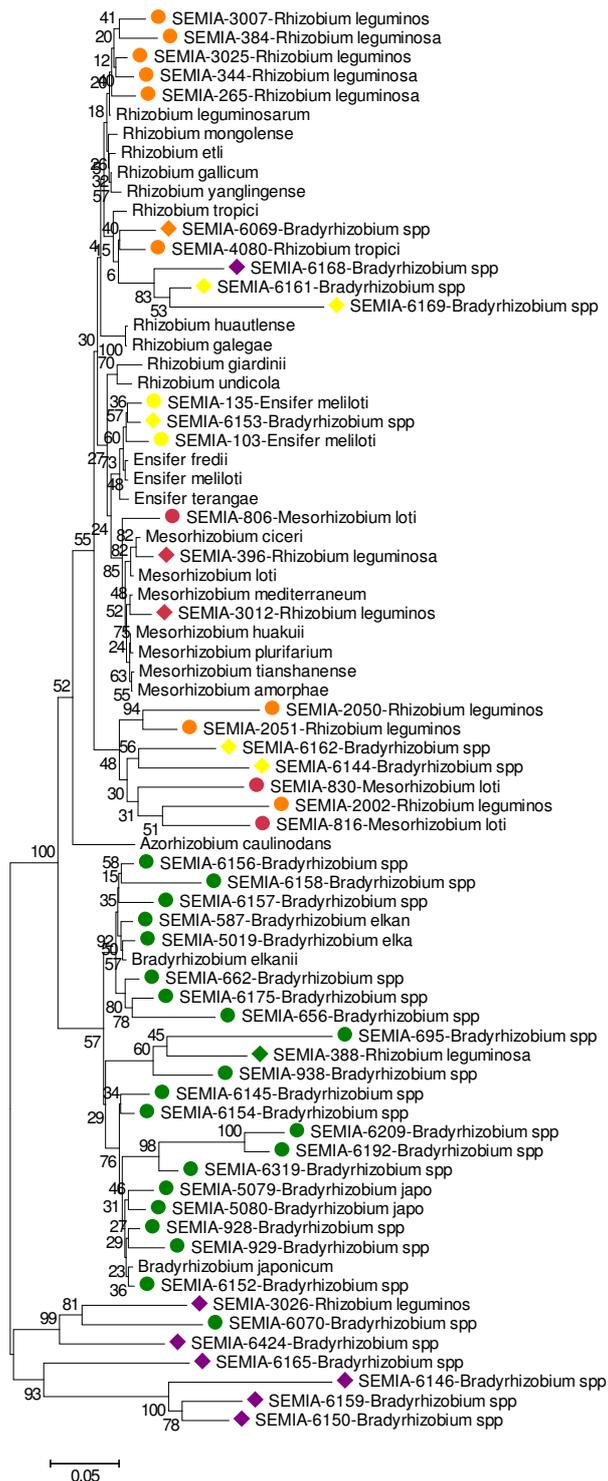


FIGURA 5. Árvore filogenética (Neighbour-Joining – Jukes Cantor) baseada nas seqüências parciais do gene 16S *rDNA* obtidas no Genbank e das estirpes SEMIA estudadas, obtidas pelo lado reverse.

Valores de bootstrap estão indicados na árvore. Estão representadas por losangos coloridos as estirpes que não tiveram correspondência entre sua atual classificação e os resultados do Blastn, e por círculos coloridos, estirpes que obtiveram correspondência entre sua classificação taxonômica e os resultados do Blastn (Verde – *Bradyrhizobium* spp., Vermelho – *Mesorhizobium* spp., Amarelo – *Ensifer* spp., Alaranjado – *Rhizobium* spp., Roxo – *Burkholderia* spp. e *Rhodopseudomonas* spp.)

## 4.2 Sequenciamento dos produtos de PCR *nifH*

As estirpes LMG 6217 (*Ensifer fredii*), LMG 6346 (*Rhizobium galegae*), LMG 8820 (*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*), LMG 11875 (*Rhizobium undicola*), LMG 14989 (*Mesorhizobium ciceri*), LMG 17827 (*Rhizobium etli*), LMG 18977 (*Mesorhizobium amorphae*), LMG 19592 (*Rhizobium yanglingense*), H152 (*Rhizobium giardini* bv. *giardini*) e R602 (*Rhizobium gallicum* bv. *gallicum*), além das estirpes SEMIA 265 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*), SEMIA 344 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*), SEMIA 384 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*), SEMIA 929 (*Bradyrhizobium* spp.), SEMIA 2002 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*), SEMIA 3007 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*), SEMIA 6161 (*Bradyrhizobium* spp.) e SEMIA 6165 (*Bradyrhizobium* spp.) não puderam ser amplificadas, o que não ocorreu com o sequenciamento do gene 16S *rDNA*, sugerindo dificuldade de anelamento com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Em trabalhos realizados por Geniaux et al. (1993) e Amarger et al. (1997) foram relatadas dificuldades em amplificar o gene *nifH* de algumas estirpes, como *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* e *Rhizobium giardini* H152 (Laguerre et al., 2001).

As seqüências foram então submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos pelo programa BLASTn. Os relatórios com os resultados contendo a identificação das seqüências, valores de identidade, “score”, “e-value” e alinhamento das seqüências encontram-se no apêndice. O resumo dos relatórios obtidos do BLASTn encontra-se na Tabela 10. A maior parte das seqüências das estirpes padrões e das estirpes recomendadas para inoculação apresentaram correspondência em relação à identidade de seqüências com seqüências de organismos classificados taxonomicamente com o mesmo nome. Entretanto, estirpes como a LMG 14107 (*Mesorhizobium huakuii*), LMG 14919 (*Ensifer arboris*), LMG 18254 (*Rhizobium huautlense*), SEMIA 6069 (*Bradyrhizobium* spp.), SEMIA 6070 (*Bradyrhizobium* spp.) e SEMIA 6168 (*Bradyrhizobium* spp.) apresentaram homologia com seqüências de *Rhizobium* sp.

TABELA 10. Identificação preliminar com base na identidade de seqüência parcial do gene *nifH*

Estirpe	Classificação Atual	Organismo mais relacionado	Score	E Value	Identidade	Tamanho do Fragmento	Acesso no Genbank
SEMIA103	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	618	e-175	98%	320 pb	AY934874
SEMIA116	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	539	e-151	95%	275 pb	AE007235
SEMIA134	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	611	e-172	98%	352 pb	AE007235
SEMIA135	<i>Ensifer meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	636	e-180	99%	324 pb	AE007235
SEMIA388	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	289	5e-76	87%	213 pb	AB079620
SEMIA396	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	133	7e-29	90%	396 pb	AJ457913
SEMIA587	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	620	e-175	99%	339 pb	DQ485702
SEMIA656	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	581	e-163	97%	305 pb	AY934869
SEMIA662	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	408	e-112	90%	244 pb	AY934869
SEMIA695	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	139	e-30	84%	238 pb	AF484631
SEMIA806	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	428	e-118	93%	215 pb	BA000012
SEMIA816	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	519	e-145	96%	267 pb	BA000012
SEMIA830	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	482	e-134	95%	229 pb	AL672111
SEMIA928	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	603	e-170	97%	316 pb	AY386783
SEMIA938	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	535	e-150	96%	328 pb	AY386783
SEMIA2050	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Rhizobium trifolii</i>	502	e-140	97%	315 pb	X02478
SEMIA2051	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Rhizobium trifolii</i>	462	e-128	98%	256 pb	X02478
SEMIA3012	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	141	3e-31	100%	119 pb	AY318755
SEMIA3025	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	529	e-148	95%	367 pb	DQ413015
SEMIA3026	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	611	e-172	99%	364 pb	AE007235
SEMIA4077	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	658	0.0	99%	356 pb	DQ284983

continua

Estirpe	Classificação Atual	Organismo mais relacionado	Score	E Value	Identidade	Tamanho do Fragmento	Acesso no Genbank
SEMIA4080	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	617	e-174	98%	257 pb	DQ284983
SEMIA5019	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	634	e-180	99%	301 pb	AY599091
SEMIA5079	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	527	e-147	96%	239 pb	AH010242
SEMIA5080	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	563	e-158	98%	247 pb	AH010242
SEMIA6069	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	377	e-102	92%	189 pb	DQ284983
SEMIA6070	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	285	8e-75	91%	113 pb	DQ284983
SEMIA6144	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Sinorhizobium medicae</i>	656	0.0	98%	330 pb	AATG01000001
SEMIA6145	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	646	0.0	100%	321 pb	AB094963
SEMIA6146	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	436	e-120	97%	233 pb	EF153399
SEMIA6150	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	256	7e-66	89%	257 pb	DQ085620
SEMIA6152	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	258	2e-66	84%	275 pb	AZ935396
SEMIA6153	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	480	e-133	94%	315 pb	DQ333890
SEMIA6154	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	268	2e-69	85%	329 pb	AB079620
SEMIA6156	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	513	e-143	95%	231 pb	AY934869
SEMIA6157	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	375	e-101	96%	178 pb	EF153399
SEMIA6158	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	551	e-155	97%	273 pb	EF153399
SEMIA6159	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	297	2e-78	98%	166 pb	EF153399
SEMIA6162	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	438	e-121	92%	277 pb	AF275670
SEMIA6168	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	311	e-82	94%	170 pb	AJ505314
SEMIA6169	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	630	e-178	98%	306 pb	AE007235
SEMIA6175	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	474	e-131	96%	227 pb	EF153399
SEMIA6192	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	244	3e-62	84%	220 pb	AZ934358
SEMIA6209	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	272	e-170	87%	272 pb	AZ934358
SEMIA6319	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	615	e-174	99%	324 pb	DQ085621
SEMIA6424	<i>Bradyrhizobium spp.</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	157	5e-36	83%	82 pb	AZ934358
LMG6125	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	361	2e-97	95%	176 pb	AL672111
LMG6133	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	291	2e-76	96%	133 pb	AY159587
LMG6134	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	272	e-170	91%	124 pb	AF484640
LMG6138	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	313	4e-83	98%	171 pb	AH010242
LMG6465	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae</i>	135	2e-29	94%	82 pb	DQ413015

continuação

Estirpe	Classificação Atual	Organismo mais relacionado	Score	E Value	Identidade	Tamanho do Fragmento	Acesso no Genbank
LMG7834	<i>Sinorhizobium teranga</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	311	e-82	90%	253 pb	AF275670
LMG11892	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	159	e-36	92%	102 pb	M26961
LMG14107	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	256	7e-66	93%	71 pb	DQ284983
LMG14904	<i>Rhizobium leguminosarum biovar viceae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae</i>	291	e-76	88%	247 pb	DQ413015
LMG14919	<i>Sinorhizobium arboris</i>	<i>Rhizobium sp.</i>	202	9e-50	87%	141 pb	M26961
LMG17148	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	<i>Mesorhizobium ciceri</i>	274	3e-71	92%	137 pb	AJ457914
LMG18254	<i>Rhizobium huautlense</i>	<i>Rhizobium fredii</i>	266	8e-69	89%	222 pb	L16503
LMG18864	<i>Sinorhizobium medicae</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	454	e-125	98%	235 pb	AY934874
LMG18976	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	406	e-111	96%	197 pb	AY159587
LMG19141	<i>Rhizobium mongolense</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	244	3e-62	95%	122 pb	AY159587
LMG19227	<i>Sinorhizobium kostiense</i>	<i>Sinorhizobium sp.</i>	325	9e-87	88%	247 pb	AF275670

conclusão

Análises baseadas na identidade de seqüências do gene *nifH* com seqüências do Genbank, realizada pelo BLASTn.

**Organismo mais relacionado:** organismo que possui a seqüência com a qual a seqüência parcial do gene *nifH* da estirpe estudada apresentou maior homologia.

**Score:** pontuação do alinhamento.

**E Value:** probabilidade de se encontrar aleatoriamente o mesmo alinhamento entre duas seqüências.

**Identidade:** porcentagem de identidade entre a seqüência das estirpes estudadas e o organismo relacionado.

**Tamanho do fragmento:** tamanho da seqüência consenso.

**Acesso no GenBank:** número de acesso da seqüência do organismo relacionado.

Também, a estirpe LMG 6465 (*Azorhizobium caulinodans*) apresentou homologia com *Rhizobium leguminosarum*. Apresentaram homologia com *Ensifer sp.* as estirpes LMG 19141 (*Rhizobium mongolense*), SEMIA 6162 (*Bradyrhizobium spp.*), SEMIA 6153 (*Bradyrhizobium spp.*) e SEMIA 6169 (*Bradyrhizobium spp.*); com *Ensifer meliloti* as estirpes LMG 18976 (*Mesorhizobium tianshanense*) e SEMIA 3026 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*); com *Ensifer medicae* a estirpe SEMIA 6144 (*Bradyrhizobium spp.*); e com *Mesorhizobium ciceri* as estirpes SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*) e SEMIA 396 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*). Além disso, as estirpes LMG 18864 (*Ensifer medicae*) e a SEMIA 388 (*Rhizobium leguminosarum bv. viceae*) apresentaram homologia com *Bradyrhizobium sp.*, bem como LMG 8819 (*Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*) com *Burkholderia sp.*. LMG 11892 (*Mesorhizobium plurifarium*) e LMG 19227 (*Ensifer kostiense*) apresentaram homologia pelo BLASTn com *Rhizobium sp.* e *Ensifer sp.*, respectivamente.

Para efeito de comparação com as árvores filogenéticas obtidas a partir das seqüências das estirpes estudadas, foi construída também uma árvore filogenética (Figura 6) com seqüências obtidas do Genbank (NCBI) de estirpes que tiveram a região que codifica o *nifH* sequenciada. As espécies escolhidas foram: *Mesorhizobium mediterraneum*, *M. ciceri*, *M. tianshanense*, *M. amorphae*, *M. loti*, *M. plurifarium*, *Rhizobium gallicum bv. gallicum*, *R. etli*, *R. huautlense*, *R. gallicum*, *R. yanglingense*, *R. mongolense*, *Ensifer fredii*, *E. meliloti*, *E. medicae*, *E. terangae*, *E. kostiensis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia tropica*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Azorhizobium caulinodans*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*. Esta árvore possibilitou uma separação, de maneira semelhante às árvores 16S *rDNA*, em três grandes grupos: o primeiro composto de estirpes de *Bradyrhizobium spp.* e *Azorhizobium spp.*; o segundo de estirpes de *Burkholderia spp.*; e um terceiro grupo composto de um subgrupo com estirpes de *Mesorhizobium spp.*, outro com estirpes de *Ensifer spp.*, e outro subgrupo com estirpes de *Rhizobium spp.*.

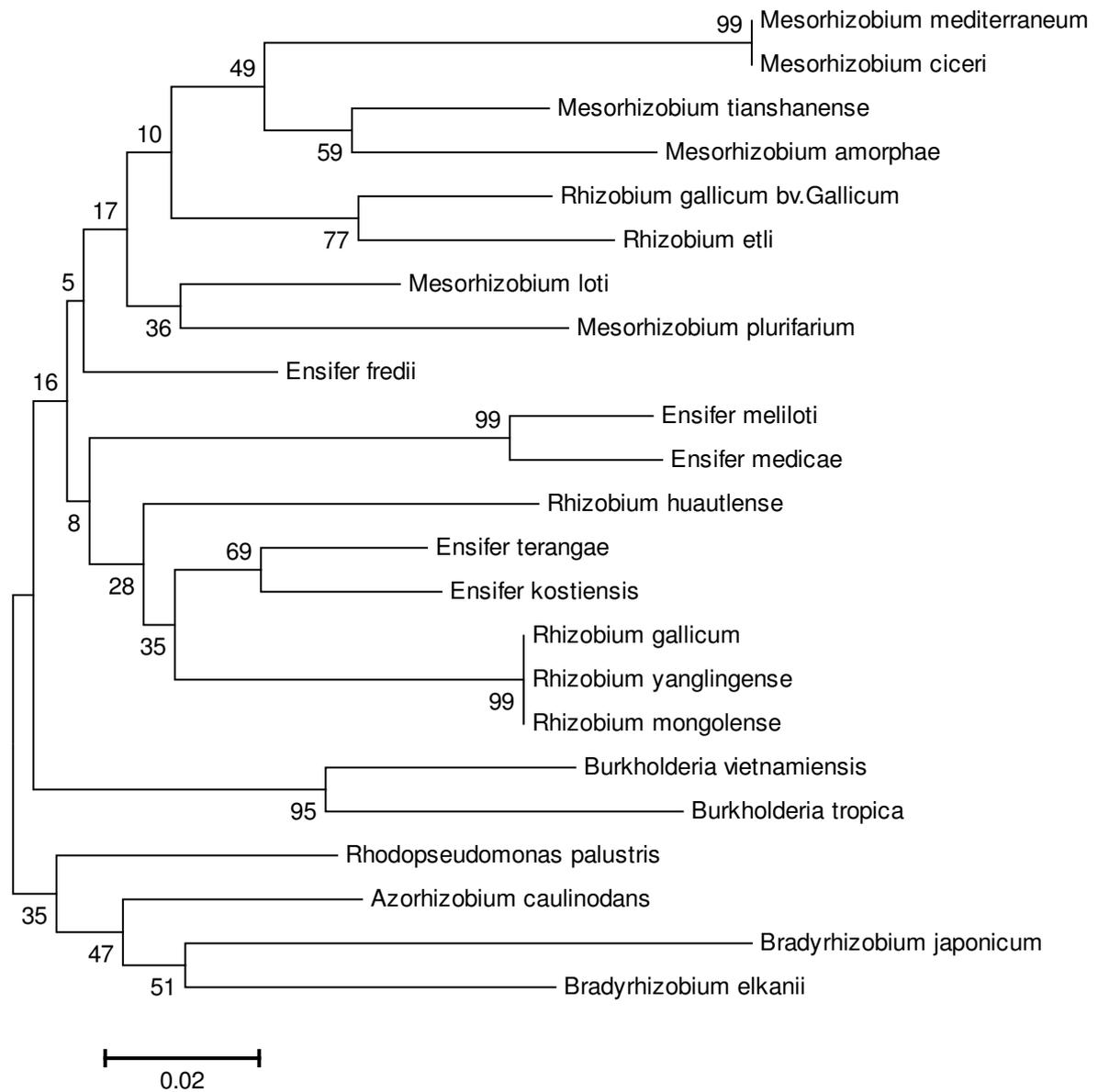


FIGURA 6 Árvore filogenética (Neighbour-Joining – Jukes Cantor) baseada nas seqüências parciais do gene *nifH* obtidas no Genbank. Valores de bootstrap estão indicados na árvore.

Observamos que *Rhizobium huautlense* permaneceu mais proximamente relacionado às estirpes de *Ensifer spp.*, e ainda que *Rhizobium etli* e *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* permaneceram mais próximos às estirpes de *Mesorhizobium spp.*.

A árvore com as seqüências de estirpes padrões LMG (Figura 7) não demonstrou a formação de grupos bem definidos. Apesar das estirpes de *Bradyrhizobium spp.* LMG 6138 e LMG 6134 permanecerem agrupadas, ficaram proximamente relacionadas à LMG 19141 (*Rhizobium mongolense*), LMG 14904 (*Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*),

LMG 6125 (*Mesorhizobium loti*) e LMG 6465 (*Azorhizobium caulinodans*). As estirpes LMG 7834 (*Ensifer teranga*) e LMG 19227 (*Ensifer kostiense*) ficaram agrupadas junto à estirpe LMG 11892 (*Mesorhizobium plurifarum*), que apresentou homologia com *Sinorhizobium sp.* na consulta de similaridade ao BLASTn. As estirpes LMG 18254 (*Rhizobium huautlense*) e LMG 14919 (*Ensifer arboris*) ficaram mais proximamente relacionadas a estas. Ficaram fora deste agrupamento as estirpes LMG 18864 (*Ensifer medicae*) e LMG 6133 (*Ensifer meliloti*), juntamente com a estirpe LMG 18976 (*Mesorhizobium tianshanense*), que também apresentou homologia com *Sinorhizobium sp.* na consulta de similaridade ao BLASTn. LMG 14107 (*Mesorhizobium huakuii*) e SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) apresentaram semelhança. LMG 8819 (*Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*), que apresentou homologia em sua seqüência *nifH* com *Burkholderia sp.*, apresentou mais semelhança com LMG 6133 (*Ensifer meliloti*), formando praticamente um grupo externo à árvore.

Foi construída uma árvore filogenética com seqüências *nifH* das estirpes recomendadas para inoculação de leguminosas (Figura 8) e outra árvore com estas estirpes e ainda as seqüências das estirpes obtidas no Genbank (Figura 9). A primeira dividiu as estirpes em grupos bem distintos: as estirpes de *Mesorhizobium spp.* SEMIA 930, SEMIA 816 e SEMIA 806 permaneceram em um grupo mais proximamente relacionado ao grupo de estirpes de *Bradyrhizobium spp.* (SEMIA 6159, SEMIA 6424, SEMIA 6146, SEMIA 6157, SEMIA 6158, SEMIA 6175, SEMIA 6192, SEMIA 6150, SEMIA 6209, SEMIA 6152 e SEMIA 6319, formando um subgrupo, e SEMIA 5080, SEMIA 5079, SEMIA 656, SEMIA 6145, SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 695, SEMIA 662, SEMIA 6156, SEMIA 938, SEMIA 928 e SEMIA 388, que é classificada como *Rhizobium leguminosarum*, formando outro subgrupo) que obtiveram homologia por análise das seqüências no BLASTn com *Bradyrhizobium sp.*.

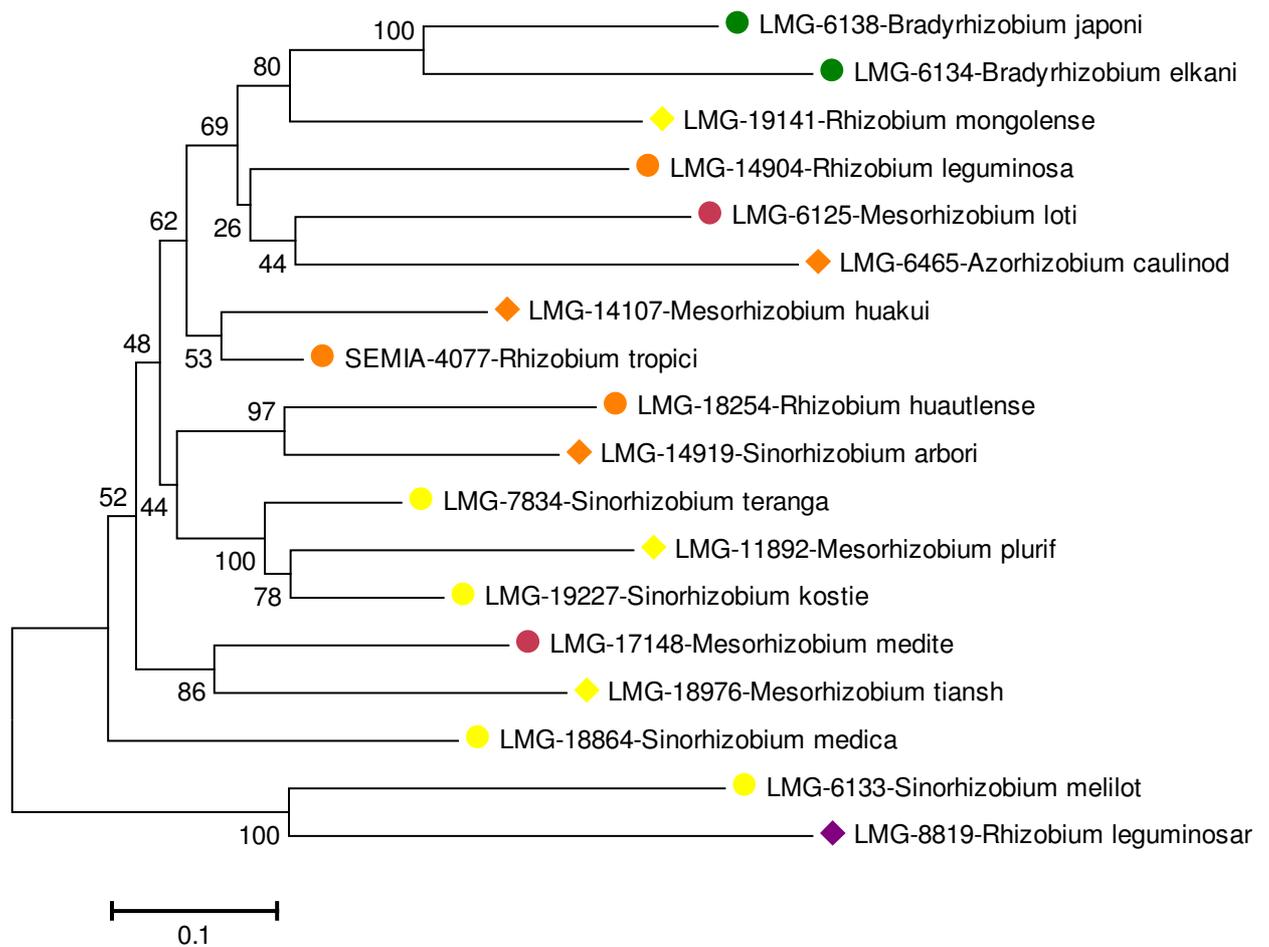


FIGURA 7 Árvore filogenética (Neighbour-Joining – Jukes Cantor) baseada nas seqüências parciais do gene *nifH* das estirpes LMG estudadas. Valores de bootstrap estão indicados na árvore. Estão representadas por losangos coloridos as estirpes que não tiveram correspondência entre sua atual classificação e os resultados do Blastn, e por círculos coloridos, estirpes que obtiveram correspondência entre sua classificação taxonômica e os resultados do Blastn (Verde – *Bradyrhizobium spp.*, Vermelho – *Mesorhizobium spp.*, Amarelo – *Ensifer spp.*, Alaranjado – *Rhizobium spp.*, Roxo – *Burkholderia spp.* e *Rhodopseudomonas spp.*)

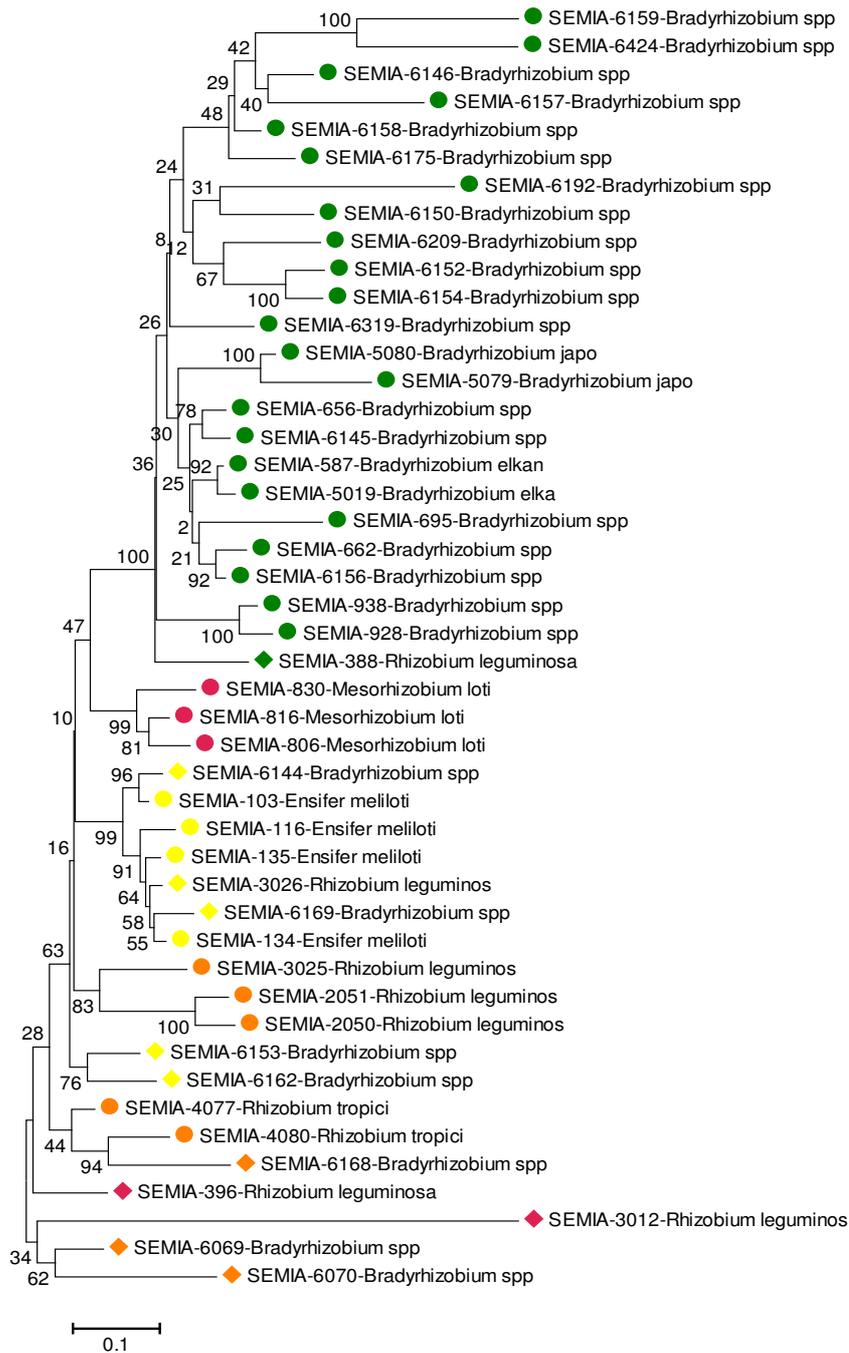


FIGURA 8 Árvore filogenética (Neighbour-Joining – Jukes Cantor) baseada nas seqüências parciais do gene *nifH* das estirpes SEMIA estudadas.

Valores de bootstrap estão indicados na árvore. Estão representadas por losangos coloridos as estirpes que não tiveram correspondência entre sua atual classificação e os resultados do Blastn, e por círculos coloridos, estirpes que obtiveram correspondência entre sua classificação taxonômica e os resultados do Blastn (Verde – *Bradyrhizobium* spp., Vermelho – *Mesorhizobium* spp., Amarelo – *Ensifer* spp., Alaranjado – *Rhizobium* spp.)

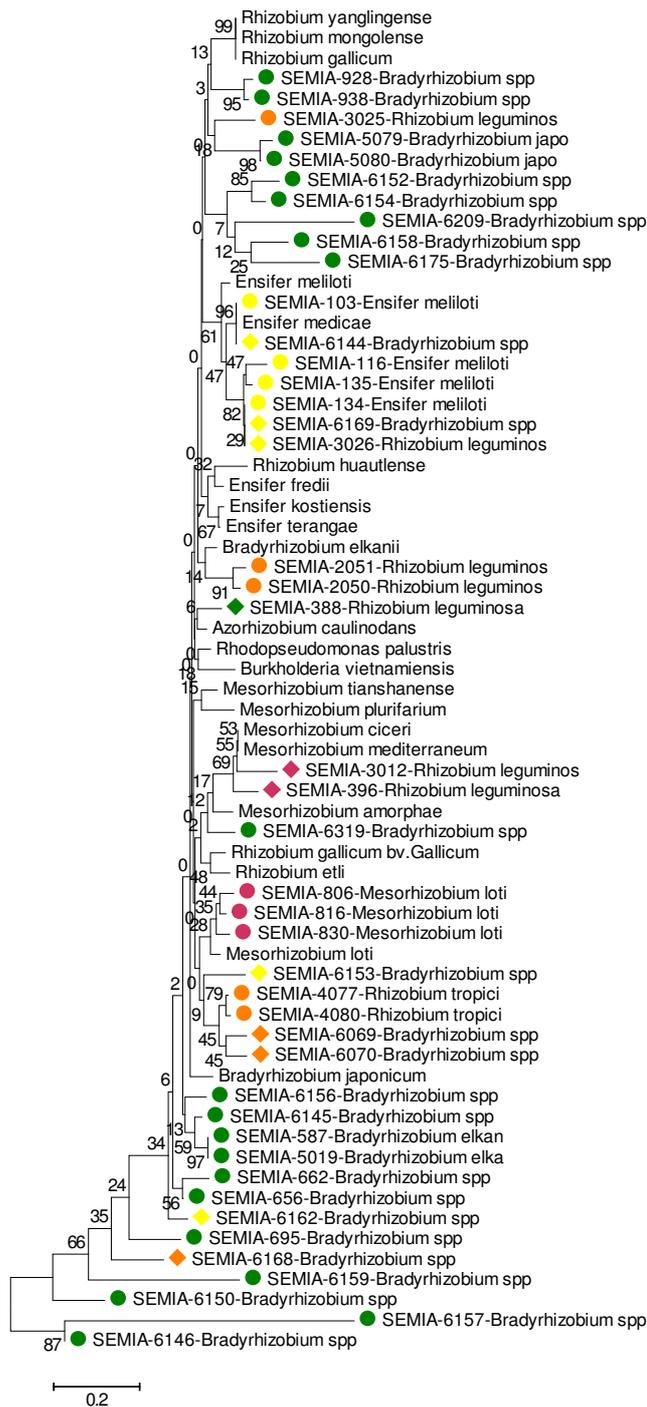


FIGURA 9 Árvore filogenética (Neighbour-Joining – Jukes Cantor) baseada nas seqüências parciais do gene *nifH* obtidas no Genbank e das estirpes SEMIA estudadas.

Valores de bootstrap estão indicados na árvore. Estão representadas por losangos coloridos as estirpes que não tiveram correspondência entre sua atual classificação e os resultados do Blastn, e por círculos coloridos, estirpes que obtiveram correspondência entre sua classificação taxonômica e os resultados do Blastn (Verde – *Bradyrhizobium* spp., Vermelho – *Mesorhizobium* spp., Amarelo – *Ensifer* spp., Alaranjado – *Rhizobium* spp., Roxo – *Burkholderia* spp. e *Rhodopseudomonas* spp.)

Foi observado que, quando foram utilizadas estas mesmas seqüências junto às seqüências obtidas no Genbank para a formação de uma árvore filogenética, os agrupamentos tornaram-se diferentes. Houve um grupo formado pelas estirpes de *Bradyrhizobium sp.* cujas consultas de similaridade de nucleotídeos foram correspondentes, SEMIA 6158, SEMIA 6175, SEMIA 6209, SEMIA 6152 SEMIA 5080, SEMIA 5079, SEMIA 938, SEMIA 928 e SEMIA 6154; mais proximamente relacionado ao grupo formado pelas estirpes SEMIA 103, SEMIA 6144, SEMIA 116, SEMIA 135, SEMIA 134, 6169 e SEMIA 3026, cujas consultas de similaridade de nucleotídeos resultou em homologia com *Ensifer sp.* As demais estirpes de *Bradyrhizobium sp.* que apresentaram homologia por análise das seqüências no BLASTn com *Bradyrhizobium sp.* (SEMIA 6159, SEMIA 6146, SEMIA 6157, SEMIA 6150, SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 695, SEMIA 662, SEMIA 6156, SEMIA 6145 e SEMIA 656) formaram um grupo externo nesta árvore, juntamente com as estirpes de *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6162 e SEMIA 6168, que apresentaram similaridade com, respectivamente, *Ensifer sp.* e *Rhizobium sp.*.

Na árvore sem as seqüências obtidas do Genbank, as estirpes com homologia por *Ensifer sp.* (SEMIA 6144, SEMIA 103, SEMIA 116, SEMIA 135, SEMIA 3026, SEMIA 6169 e SEMIA 134) ficaram agrupadas, bem como as estirpes com homologia por *Rhizobium sp.*, que formaram dois pequenos grupos, um deles com SEMIA 3025, SEMIA 2051 e SEMIA 2050, e outro com SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 6168, SEMIA 6069 e SEMIA 6070, sendo que neste também foram inclusas as estirpes SEMIA 396 e SEMIA 3012, e ambas, apesar de serem classificadas como *Rhizobium leguminosarum*, apresentaram similaridade com seqüências de *Mesorhizobium sp.* do Genbank. Nesta árvore as estirpes de *Bradyrhizobium spp.* que apresentaram homologia por *Ensifer sp.*, SEMIA 6153 e SEMIA 6162, ficaram próximas às estirpes de *Rhizobium sp.*.

Assim como na outra, a árvore com padrões do Genbank dividiu as estirpes de *Rhizobium* em dois pequenos grupos, sendo um deles composto por SEMIA 2051 e SEMIA 2050, que está mais próximo ao grupo de *Ensifer*, e outro grupo formado por SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 6069 e SEMIA 6070, que ficou mais próximo ao grupo formado por estirpes de *Mesorhizobium loti* (SEMIA 806, SEMIA 816 e SEMIA 830).

O gene da nitrogenase é conhecido por ser menos conservado que os genes do RNA ribossômico, e estes dados mostram as diferenças em relação à evolução destes genes. Em geral, a filogenia baseada no gene *nifH* tem se mostrado bastante concordante com a filogenia baseada nas seqüências de 16S *rDNA* (Young, 1992; Ueda et al., 1995; Zehr et al., 1995).

### 4.3 Análise comparativa dos resultados do 16S *rDNA* e do *nifH*

A comparação da filogenia de *nifH* com genes 16S *rDNA* de microrganismos conhecidos, onde ambas seqüências são avaliadas, permite examinar a existência de transferência lateral do gene *nifH*. Observando as filogenias 16S *rDNA* e *nifH* das estirpes estudadas, percebemos evidências que podem ser explicadas pela hipótese de transferência lateral de genes. A estirpe LMG 19141 (*Rhizobium mongolense*) obteve similaridade de nucleotídeos quando submetida a análise pelo BLASTn com uma estirpe de *Rhizobium spp.*, além de pertencer ao agrupamento das estirpes de *Rhizobium spp.* na árvore filogenética construída a partir do gene 16S *rDNA*. Entretanto, quando sua seqüência *nifH* foi submetida à análise de similaridade pelo BLASTn, apresentou similaridade de seqüência a *Ensifer spp.*, sugerindo que alguma estirpe de *Ensifer spp.*, em algum momento, transferiu seus genes *nifH* para a estirpe estudada, ou a condição inversa. A mesma hipótese pode explicar o motivo da estirpe SEMIA 3026 (*Rhizobium leguminosarum* *bv. viceae*), que apresentou similaridade de nucleotídeos da seqüência 16S *rDNA* com *Burkholderia sp.* e ficou agrupada na árvore do 16S *rDNA* junto a outras estirpes que também apresentaram homologia por *Burkholderia sp.*, quando teve suas seqüência *nifH* analisada não só por ter apresentado homologia com *Ensifer meliloti*, como ficar agrupada na árvore filogenética *nifH* com outras estirpes desta espécie.

As estirpes LMG 14919 (*Ensifer arboris*), LMG 14107 (*Mesorhizobium huakuii*) e SEMIA 6070 (*Bradyrhizobium spp.*) apresentaram correspondência na análise de similaridade de seqüências 16S *rDNA* com suas respectivas espécies adequadamente, bem como também ficaram agrupadas junto a estirpes de seus respectivos gêneros na árvore 16S *rDNA*. No entanto, todas elas apresentaram similaridade de nucleotídeos de suas seqüências *nifH* com alguma estirpes de *Rhizobium sp.* e permaneceram próximas a estirpes de *Rhizobium spp.* nas árvores do *nifH*, sugerindo transferência lateral de genes *nif* de estirpes de *Rhizobium spp.* para as estirpes estudadas. A comparação de filogenias *nifH* e 16S *rDNA* apóia a hipótese geralmente aceita de transferência de genes Sym e rearranjo genético envolvidos na aquisição e evolução das funções simbióticas de rizóbios.

Em um estudo realizado por Sullivan e colaboradores (1995), após sete anos da inoculação de uma estirpe inoculante ICMP 3153 em um solo isento de *M. loti* capaz de

nodular e fixar nitrogênio com *Lotus corniculatus*, na Nova Zelândia, diversas estirpes foram reisoladas dos nódulos. Os pesquisadores observaram que apenas 19% dos isolados apresentavam o mesmo perfil da estirpe inoculada, através de análise por hibridização do DNA genômico e pelo seqüenciamento da região que codifica o 16S *rDNA*. Entretanto, quando foram hibridizadas com genes de nodulação da estirpe inoculada, apresentaram o mesmo perfil. A hibridização com diversas enzimas de restrição revelou, então, que toda a “ilha simbiótica” havia sido cromossomalmente integrada nas estirpes, sugerindo que as estirpes foram originárias da transferência de genes simbióticos da estirpe inoculante para rizóbios não-simbióticos do solo (Sullivan *et al.*, 1995).

Em um estudo com populações de rizóbios proveniente de uma área dos Cerrados que havia recebido inoculantes há vários anos, Galli-Terasawa *et al.* (2003) constataram que não mais de cinco isolados, de uma população inicial de 100, compartilharam propriedades semelhantes. Cerca de um terço dos isolados eram estirpes de crescimento rápido e poderiam representar rizóbios nativos que, após 15 anos de cultivo com a soja, passaram a nodular de modo efetivo essa leguminosa; contudo, a maioria desses isolados apresentava várias propriedades sorológicas, bem como perfis de proteínas e lipopolissacarídeos semelhantes aos das estirpes inoculantes de *B. japonicum*/*B. elkanii*, o que poderia estar relacionado à transferência horizontal de genes. A transferência de genes foi evidenciada, também, pelas posições diferentes das estirpes nos agrupamentos formados com os perfis de DNA amplificados com o *oligonucleotídeo iniciador* RPO1 (relacionada aos genes *nif*) (Galli-Terasawa *et al.*, 2003). Em adição aos dados obtidos por Batista *et al.* (2007), esses resultados confirmam que a transferência horizontal de genes está ocorrendo em alta proporção nos solos brasileiros e que pode resultar em estirpes geneticamente estáveis em relação a essas características.

Informações sobre a estrutura das populações de rizóbios, bem como sobre a evolução dos microsimbiontes são importantes porque podem contribuir não só para delinear estratégias visando maximizar o processo de fixação biológica do N<sub>2</sub>, como também para obter informações sobre a evolução da simbiose (Grange *et al.*, 2007).

A classificação taxonômica das estirpes SEMIA recomendadas para inoculação de leguminosas previamente disponível na FEPAGRO, com base em propriedades morfológicas e especificidade hospedeira, foi confirmada na maior parte das estirpes. Entretanto algumas foram classificadas dentro de outros gêneros. As estirpes SEMIA 6169, SEMIA 6162, SEMIA 6161, SEMIA 6153 e SEMIA 6144, que são classificadas como *Bradyrhizobium* spp., neste trabalho foram reclassificadas como estirpes de *Ensifer* spp., sendo que SEMIA 6153 e

SEMIA 6144 foram reclassificadas como, respectivamente, *Ensifer xijiangensis* e *Ensifer medicae*. As estirpes SEMIA 3012 e SEMIA 396, classificadas como *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae*, foram reclassificadas neste trabalho como *Mesorhizobium* *sp.*; as estirpes SEMIA 6165 e SEMIA 6424 classificadas como *Bradyrhizobium* *spp.*, foram então reclassificadas como *Burkholderia* *spp.*; as estirpes de *Bradyrhizobium* *spp.* SEMIA 6168 e SEMIA 6069 foram reclassificadas como de *Rhizobium* *spp.* e a estirpe SEMIA 388, classificada como *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* foi reclassificada como *Bradyrhizobium* *spp.*, pelo sequenciamento das regiões codificadoras do 16S *rDNA* e *nifH* em todos os casos.

Considerando todos os resultados nas árvores filogenéticas, foi observado que a grande maioria dos grupos formados obedecem às classificações realizadas pela consulta ao BLASTn. Árvores construídas baseadas em genes *nifH* e 16S *rDNA* da mesma estirpe, representadas por ambos genes, geram árvores muito consistentes. Provavelmente uma das principais constatações desse estudo foi a do grau elevado de diversidade genética observado entre as estirpes de rizóbios simbióticas da coleção SEMIA, demonstrando que as regiões tropicais são importantes reservatórios de bactérias e de genes de fixação de nitrogênio.

A legislação relacionada à utilização de microrganismos para promoção do crescimento de plantas no Brasil é muito rígida. É obrigatória a utilização de somente estirpes recomendadas para inoculantes em formulações comerciais, tornando-se necessário o reconhecimento destas estirpes. Qualquer tentativa de possibilitar identificação segura, rápida e com custo reduzido é válida. As seqüências dos genes da nitrogenase fornecem-nos meio prático de confirmar a classificação e de identificação pelo 16S *rDNA* de microrganismos diazotróficos.

## 5 CONCLUSÃO

O seqüenciamento parcial da região do gene 16S *rDNA* é, na maioria dos casos, suficiente para identificação de estirpes de rizóbios. A consulta de similaridade de nucleotídeos de 16S *rDNA* no Genbank apresentou-se como uma ferramenta muito importante para desvendar identidade de rizóbios.

As árvores filogenéticas, em sua maioria, agruparam as estirpes de maneira semelhante à consulta de similaridade de nucleotídeos ao BLASTn.

Árvores construídas baseadas em genes *nifH* e 16S *rDNA* da mesma estirpe, representadas por ambos genes, geraram árvores muito consistentes. As seqüências dos genes da nitrogenase fornecem-nos meio prático de confirmar a classificação e de identificação pelo 16S *rDNA* de microrganismos diazotróficos

Por haver apresentado, neste trabalho, resultados diferentes da classificação atual, sugerimos que as classificações de algumas estirpes SEMIA devem ser revistas. A coleção SEMIA completa deve ser caracterizada geneticamente para adequada classificação

## REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. e LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- AMGALAN, J.E.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. *NifH* and *NifD* sequences of heliobacteria: a new lineage in the nitrogenase phylogeny. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 73-79, 2005.
- ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial evolution and Biodiversity. In: ATLAS, M. ; BARTHA, R. **Microbial Ecology**. Menlo Park: Benjamin/ Cummings Science, p. 27-57, 1998.
- BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA M.; BARCELLOS, F. G.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. **Microbial Ecol.** doi: 10.1007/s00248-006-9149-2, 2007.
- BERINGER, J.E.R. Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **J.Gen.Microbiol.**, v. 84, p.188-198, 1974.
- BISHOP, P.E.; JARLENSKI, D.M.L.; HETHERINGTON, D.R. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.150, n.3, p.1244-1251, 1980.
- BOUCHER, Y.; NESBO, C. L.; DOOLITTLE, W. F. Microbial genomes: dealing with diversity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 285–289, 2001.
- BOUCHER, Y.; DOUADY, C.J.; PAPKE, R.T.; WALSH, D.A.; BOUDREAU, M.E.R.; NESBO, C.L.; CASE, R.J.; DOOLITTLE, F. Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. **Annu. Rev. Genet.**, v. 37, p. 283–328, 2003.
- BRILL, W. J. 1979. Nitrogen fixation, p. 85-109. In J. R. Sokatch and L. N. Ornston (ed.), *The bacteria, a treatise on structure and function*, vol. 7. Academic Press, Inc., New York.
- BROSIUS, J.; DULL, T.J.; SLEETER, D.D., NOLLER, H.F. (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **J Mol Biol.**, v. 148, p. 107– 127, 1981.

- BROUGHTON, W.J.; JABROURI, S.; PERRET X. Keys to symbiotic harmony. **J. Bacteriol.**, v.182, p.5641-5652, 2000.
- BUCHANAN, R.E. Approved lists of bacterial names. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 30 p. 225-240, 1980.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. 1974 **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 8th edn. Baltimore: Williams & Wilkins.
- BURKS, C. (1997). Molecular Biology Databases. **In: BISHOP, M.J. E RAWLINGS, C.J. (eds.). DNA and protein sequence analysis: A practical approach** IRL Press at Oxford University Press, New York, p.1-30.
- BUSSE, H. J.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 3-38, 1996.
- CALCAGNOTTO, D. Taxas de Evolução e o relógio molecular cap 5, p. 51-63. **In: MATIOLI, S.R. Biologia molecular e evolução**, 202p., 2001
- CANTERA, J.J.L.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. The nitrogen-fixing gene (*nifH*) of *Rodopseudomonas palustris*: a case of lateral gene transfer. **Microbiology**, v. 150, p. 2237-2246, 2004.
- CAPELA, D.; BARLOY-HUBLER, F.; GOUZY, J.; BOTHE, G.; AMPE, F.; BATUT, J.; BOISTART, P.; BECKER, A.; BOUTRY, M.; CADIEU, E.; DRÉANO, S.; GLOUX, S.; GODRIE, T.; GOFFEAU, A.; KAHN, D.; KISS, E.; LELAURE, V.; MASUY, D.; POHL, T.; PRTELLE, D.; PÜHLER, A.; PURNELLE, B.; RAMSPERGER, U.; RERNARD, C.; THÉBAULT, P.; VANDENBOL, M.; WEIDNER, S.; GALIBERT, F. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 9877-9882, 2001 .
- CHEN, S. L. (2000) Genetic Characterization of Soybean Rhizobia in Paraguay, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 5099-5103.
- CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. 2001 *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of cystic fibrosis patients. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 51, p. 1729-1735.

- CHEN, W.M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; MASSON-BOIVIN, C. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by  $\beta$ -Proteobacteria is Widespread in Nature. **J. of Bacteriology**, v. 185, p. 7266-7272, 2003.
- CHOO, Q .C; SAMIAN, M. H.; NAJIMUDIN, N. (2003) Phylogeny and Characterization of Three *nifH*-Homologous genes from Paenibacillus azotofixans. **Appl. and Enviroment Microbiol.** v .69, p.3658-3662.
- CHOTHIA, C. One thousand families for the molecular biologist. **Nature**, v. 357, p. 543-544, 1992.
- CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “oligonucleotídeos iniciadores” aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, Cuiabá, v. 4, p. 80-95, 2000.
- CIAPINA, L.P. **Diferenciação genômica de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas pela análise do gene rDNA 16S e rep-PCR.** 1997. 113f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, , Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.
- COENYE, T.; VANDAMME P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology** v. 5, p. 719–729, 2003.
- DEAN, D.R.; JACOBSON, M.R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY,G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation.** New York: Chapman and Hall, 1992. p.763-834.
- DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G. et al. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 48, p.369-382, 1998.
- DOBERT, R. C.; BREIL, B. T.; TRIPLETT, E. W. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationships to those of other nodulating bacteria. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 7, p. 564-572, 1994.
- DOMINIC, B.; ZANI, S.; CHEN, Y.-B.; MELLON, M.T.; ZEHR, J.P. Organization of the *nif* genes of the nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. IMS101. **J Phycol**, v. 36, p. 693–701, 2000.

- DOOLITTLE, W.F. Lateral genomics. **Trends Biochem Sci**, v. 24, p. M5–M8, 1999.
- EADY, R.R. (1996) Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chem Rev** v. 96, p. 3013–3030, 1996.
- EARDLY, B. D.; YOUNG, J. P. W; SELANDER, R. K. (1992). Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rDNA and *nifH* genes. **Appl Environ Microbiol** v. 58, p.1809-1815, 1992.
- 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.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, n. 3, p.175-85, 1998.
- FANI, R.; GALLO, R.; LIÒ, P. Molecular evolution of nitrogen fixation: the history of the *nifD*, *nifK* and *nifK* genes. **J. Mol. Evol.**, v. 51, p. 1-11, 2000.
- FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária), Culture Collection Catalogue, Eighth ed, FEPAGRO, Porto Alegre, Brazil, 1999.
- FOX, G.E.; WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK JR., P. How close is close: 16S *rDNA* sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.42, p.166-170, 1992.
- FRED E. B.; BALDWIN I. L.; MCCOY E. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. University of Wisconsin Studies in Science, number 5. University of Wisconsin Press, Madison, 1932.
- FREIBERG, C. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v. 387, p. 394-401, 1997.
- GALIBERT, F. *et al.* The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**, v. 293, p. 668-672, 2001.

- GARRITY, G. M.; LILBURN, T. G.; COLE, J. R.; HARRISON, S. H.; ENZEBY, J.; TINDALL, B. J. 2007. Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea (TOBA). Rel 7.7, 6 March 2007. Michigan State University [on-line]. Disponível em [www.taxonomicoutline.org](http://www.taxonomicoutline.org). Acessado em 1 Março 2008.
- GARRITY, G. M. & HOLT, J. G. The road map to the *Manual*. In: BOONE, D.R. & CATENHOLZ, R.W., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. New York, Springer-Verlag, v.1., p.119-166, 2001.
- GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 3, p. 733– 739, 2005.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Res.**, v.8, p. 195-202, 1998.
- GÖTTFERT, M.; RÖTHLISBERGER, S.; KÜNDIG, C.; BECK, C.; MARTY, R.; HENNECKE, H. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410 kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. **J. Bacteriol.**, v.183, p.1405-1412, 2001.
- GRANGE, L. ; HUNGRIA, M. ; GRAHAM, P. H. ; MARTINEZ-ROMERO, E. . New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 867-876, 2007.
- HACKER, J.; CARNIEL, E. 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. **EMBO Rep.** v. 2, p. 376–381, 2001.
- HAUKKA, K.; LINDSTROM, M, K.; YOUNG, J. P. W. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolated from leguminous trees growing in Africa and Latin America. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, p. 419-426, 1998.
- HAUKKA, K.; LIDSTRÖM, K.; YOUNG, P.W. Diversity of partial 16S rDNA sequences among and within strains of african rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 19, p. 352-359, 1996.
- HEAD, I. M., SAUNDERS, J. R.; PICKUP, J. Microbial evolution, diverdity and ecology: a decade of ribosomal RDNA anaylis of uncultivated organisms. **Microb. Ecology**, v. 35, p. 1-21, 1998.

- HENNECKE, H., KALUZA, K., THO\$ NY, B., FUHRMANN, M., LUDWIG, W. & STACKEBRANDT, E. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rDNA in *Rhizobium* species and other nitrogen fixing bacteria. **Arch Microbiol** v. 142, p.342-348, 1985.
- HENTSCHEL, U. et al. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4431-40, 2002.
- HUNGRIA, M. ; CAMPO, R. J. . Inoculantes microbianos: situação no Brasil. In: Izaguirre-Mayoral, M.L.; Labandera, C.; Sanjuan, J.. (Org.). *Uso Y perspectivas de los biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial*. Montevideo, 2007, p. 22-31.
- HUNGRIA, M. ; ARAUJO, R. S. . Relato da VI Reunião de laboratórios para recomendação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: Hungria, M.; Balota, E.L.; Colozzi-Filho, A.; Andrade, D.S.. (Org.). *Microbiologia do solo: Desafios para o século XXI*. Londrina: IAPAR-EMBRAPA/CNPSo, 1995, p. 476-489.
- INNIS, M. A.; MYAMBO, K. B.; GELFAND, D. H.; BROW, M. A. D. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 85, p. 9436-9440, 1988.
- JORDAN, D. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *radyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. **Internacional Journal of Systematic bacteriology**. v.32, p.136-139, 1982.
- JORDAN, D.C. (1984). Family III. Rhizobiaceae Conn 1938, 321 AP, p. 235-244. In: N.R. Kneg and J.G. Holt (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1**. The Willians & Wilkins Co, Baltimore.
- JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BENA, G.; SY, A.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; DE LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-xing bacteria. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 54, p. 2269–2273, 2004.
- JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. evolution of protein molecules. In: JUKES, T.H.;CANTOR ,C .R *Mammalian protein metabolism*. New York : **Academic Press**,1969. p.21-132.
- KANEKO, T.. Complete genomic sequence of nitrogen fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* . **DNA Research**, v. 9, p.189-197, 2002.

- KANEKO, T. Complete genome structure of the nitrogen –fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, v. 7, p. 331-338, 2000.
- KEEN, N.T. Host range determinants in plant pathogens and symbionts. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 42, p. 421-440, 1988.
- KIRCHOFF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biol. Biochem.**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 853-862, 1997.
- KONSTANTINIDIS, K.T.; TIEDJE, J.M. 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 102, p. 2567–2572, 2008.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief. Bioinform.** v. 5, p.150–163, 2004.
- KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. 2005 Genus I. *Rhizobium* Frank 1889, 338AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol. 2, part C. Ed. GM Garrity. p. 325–340. Springer, New York.
- LAGUERRE, G., VAN BERKUM, P., AMARGER, N. PREVOST, D. (1997). Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis* and *Onobrychis*. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, p. 4748-4758, 1997.
- LAGUERRE, G.; MOUR, S .M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of Rhizobia based on nod C and NifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, p.981-993, 2001.
- LINE, M. A. The enigma of the origin of life and its timing. **Microbiology**, v. 148, p. 21-27, 2002.
- LOVELL, C. R.; FRIEZ, M. J.; LONGSHORE, J. W.; BAGWELL, C. E. Recovery and phylogenetic analysis of *nifH* sequences from diazotrophic bacteria associated with dead aboveground biomass of *Spartina alterniflora*. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, p. 5308–5314, 2001.

- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rDNA sequence analysis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 155-173, 1994.
- LUDWIG, W. et al. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam, v. 153, n. 1, p. 181-90, 1997.
- MARTINEZ, E.; PARDO, M. A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M. A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity to *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **J Gen Microbiol**, v. 131, p. 1779-1786, 1985.
- MARTINEZ-ROMERO, E. & CABALLERO-MELLADO, J. (1996). Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. **Crit Rev Plant Sci** v. 15, p. 113-140, 1996.
- MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. Rhizobium tropici, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena sp.* trees. **Int J Syst Bacteriol** v. 41, p. 417-426, 1991.
- MENNA, P., HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rDNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 29, p. 315–332, 2006.
- MINERDI, D.; FANI, R.; GALLO, R.; BOARINO, A.; BONFANTE, P. Nitrogen fixation genes in endosymbiotic Burkholderia strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p.725-732, 2001.
- MOLOUBA, F. (1999) Photosynthetic Bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 16, p. 135-146, 1999.
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total protein. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, p. 135-146, 1993.
- MUSE, S.V. Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. **Plant Mol. Biol.** v. 42, p.25-43, 2000.

- MYAKI, C.Y.; RUSSO, C.A.M.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética . Introdução e o método da máxima parcimônia, cap9, p.97-107.. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**, 202p., 2001.
- NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; TABATA, S. CyanoBase, the genome database for *Synechocystis* sp. strain PCC6803: status for the year 2000 **Nucl. Acids Res.** v. 28, p. 72, 2000.
- NCBI, NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (Bethesda, Estados Unidos). **Blast database**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>. Acesso em: 6 maio 2008.
- NORSE, D. 2003. Fertilizers and world food demand-Implications for environmental stresses. In IFA/FAO. (eds.) *AgoChemical Report*. IFA, Paris. pp. 14-22.
- OKE, V.; LONG, S.R. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 641-646, 1999.
- OLSEN, G.J.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 1-6, 1994.
- PACE, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276: p. 734-740, 1997.
- POLY, F.; RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURBIÈRE, F.; JOCTEUR-MONZORIER, L. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soils microenvironments with contrasting properties. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 2255-2262, 2001.
- POSTGATE, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge: Cam. Univ. Press, 1982.
- POSTGATE, J.R.; EADY, R.R. (1988) The evolution of biological nitrogen fixation. In *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*. Bothe, H., de Bruijn, F.J, and Newton, W.E. (eds). Stuttgart: Gustav Fischer, p. 31-40.
- PUEPPKE, S. G.; BROUGHTON, W. J. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. **Mol. Plant Microbe Interact** v. 12, p. 293-318, 1999.

- RIBBE, M.; GADKARI, D.; MEYER, O. N<sub>2</sub> fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N<sub>2</sub> reduction to the oxidation of superoxide produced from O<sub>2</sub> by a molybdenum-CO dehydrogenase. **J Biol Chem** v. 272, p. 26627–26633, 1997.
- RIVAS, R.; WILLEMS, A.; SUBBA-RAO, N.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELAZQUEZ, E. Description of *Devosia neptunia* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 26, p. 47–53, 2003.
- ROBSON, R.L.; WOODLEY, P.R.; PAU, R.N.; EADY, R.R. Second gene (*nifH\**) coding for a nitrogenase iron-protein in *Azotobacter chroococcum* is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein, **EMBO. J.** v. 5, p. 1159-1163, 1986.
- ROSCH, C.; MERGEL, A.; BOTHE, H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. **Appl Environ Microbiol** v. 68, p. 3818–3829, 2002.
- RUSSO, C.A.M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos, cap12, p.130-136. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**, 202p., 2001.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. 1986. Enzymatic amplification of P-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. **Science** v. 230, p.1350-1354, 1986.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**. Chicago, v. 4, p. 406-25, 1987.
- SAMBA, R.T.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; NEYRA, M.; SPENCER-BARRETO, M. M.; DREYFUS, B. Diversity of rhizobia nodulating *Crotalaria* spp. from Senegal, *Symbiosis* 27 (1999) p. 259–268.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. Molecular cloning: A laboratory manual, 2.ed. New York: Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTINEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol** v. 43, p. 374±377, 1993.
- SOLÉ-CAVA, A. Biodiversidade molecular e genética da conservação, cap.17, p.163-171. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**, 202p., 2001.

- SULLIVAN, J. T.; RONSON, C. W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a *phetRNA* gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 5145-5149, 1998.
- SULLIVAN, J. T.; EARDLY, B. D.; VAN BERKUM, P.; RONSON, C. W. (1996). Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. **Appl Environ Microbiol** v. 62, p. 2818-2825, 1996.
- SULLIVAN, J. T.; TRZEBIATOWSKI, J. R.; CRUICKSHANK, R. W.; GOUZY, J.; BROWN, S. D.; ELLIOT, R. M.; FLEETWOOD, D. J.; MCCALLUM, N. G.; ROSSBACH, U.; STUART, G. S.; WEAVER, J. E.; WEBBY, R. J.; DE BRUIJN, F. J.; RONSON, C. W. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. **J. Bacteriol.** v. 184, p. 3086–3095, 2002.
- SULLIVAN, J. T.; PATRICK, H. N.; LOWTHER, W. L.; SCOTT, D. B.; RONSON, C. W. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 92, p. 8985-8989, 1995.
- SY, A., GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C. DREYFUS, B. 2001. Methylothetic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **J. Bacteriol.** v. 183, p. 214–220, 2001.
- TAN, Z.Y.; HUREK, T.; VINUESA, P.; MULLER, P.; LADHA, J.K.; REINHOLD-HUREK, B. (2001) Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, p. 3655– 3664, 2001.
- TEIXEIRA, K. R. S. **Bases moleculares e genética da Fixação Biológica de nitrogênio.** Seropédica: Embrapa-CNPAB, out. 1997. 26p. (Embrapa-CNPAB.Documentos, 32).
- TETTELIN, H.; MASIGNANI, V.; CIESLEWICZ, M.J.; DONATI, C.; MEDINI, D.; WARD, N.L.; ANGIUOLI, S.V.; CRABTREE, J.; JONES, A.L.; DURKIN, A.S. et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pangenome”. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 102, p. 13950-13955, 2005.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEAN MOUGIN, F. The CLUSTAL\_x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n. 25, p. 4876-4882, 1997.

- TRUJILLO, M. E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A; PLANCHUELO, A-M.; RIVAS, R.; LUDENA, D.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, p. 1318–1327, 2005.
- UEDA, T; SUGA, Y ; MATSUGUCHI ,T. Remarkable N<sub>2</sub> –Fixing Bacterial Diversity in Rice Roots by Molecular Evolutionary Analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology** . v. 177, p. 1414-1417, 1995.
- VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; FERNANDEZ-SANTOS, F.; VIZCAÍNO, N.; RIVAS, R.; GILLIS, M.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 55, p. 1985–1989, 2005.
- VAN BERKUM P.; FUHRMANN J. J. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rDNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence, **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 50, p. 2165–2172, 2000.
- VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, T. A.; EARDLY, B. D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. **Int J Syst Bacteriol**, v. 48, p.13-22, 1998.
- VAN BERKUM, P., Z.; TEREFWORK, L.; PAULIN, S.; SUOMALAINEN, K.; LINDSTROM, M.; EARDLY, B. D. 2003. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. **J. Bacteriol.** v. 185, p. 2988–2998, 2003.
- VANCE, C.P.; GRIFFITH, S.M. (1995). The molecular biology of n metabolism. In: DENNIS, D.T.; TURPIN, D.H.( Ed) **Plant physiology biochemistry and molecular biology**.4.ed.Singapore: Editora. p.371-469.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol. Rev.**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.
- VERMA, S.C.; CHOWDHURY, S.P. ; TRIPATHI, A.K. Phylogeny based on 16s rDNA e *nifH* sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica*, in India. **Can. J. Microbiol.**, v. 50, p. 313-322, 2004.

- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. ICB HandBook, 15, Oxford: Blackwell Scientific, 200p., 1970.
- VINUESA, P. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rDNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16 rDNA sequencing. **Appl. Environ. Microbiol.**v. 64, p. 2096-2104, 1998.
- WANG, E.T.; MARTINEZ-ROMERO, E. Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes, In: E.W. Triplett (Ed.), Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process, Horizon Scientific Press, Madison, USA, p. 177–186, 2000.
- WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study . **J.Bacteriol.**,v. 173, p. 697-703,1991.
- WIDMER, F., SHAFFER, B. T.; PORTEOUS, L. A.; SEIDLER, R. J. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, p.374– 380, 1999.
- WILLEMS, A. (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant Soil** v. 287, p. 3-14, 2006.
- WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. Phylogenetic and DNA: DNA hybridization analyses of Bradyrhizobium species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 51, p. 111–117, 2001.
- WILLEMS, A.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rDNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, p. 305-313, 1993.
- WILSON, K.H., R.B. Blitchington, and R.C. Greene. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** v. 28, p.1942-1946, 1990.
- WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiology Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.
- WOODSON, S.A.; LEONTIS, N.B. Structure and dynamics of ribosomal RNA. **Curr Opin Struct Biol**, v. 8, n. 3, p. 294-300, 1998.

- YOUNG, J. M.; PENNYCOOK, S. R.; WATSON, D. R. W. Proposal that *Agrobacterium radiobacter* has priority over *Agrobacterium tumefaciens*. Request for an Opinion. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 56, p. 491–493, 2006.
- YOUNG, J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen fixing organisms. In *Biological Nitrogen Fixation*, p. 43-86. Edited by G. Stacey, R. H. Burris & H. J. Evans. New York: Chapman & Hall.
- YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTail1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rDNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 2271-2277, 1991.
- ZEHR, J. P.; CAPONE, D. G. 1996. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. **Microb. Ecol.** v. 32, p.263–281, 1996.
- ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F.; Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environ. Microbiol.** v. 5, p. 539–554, 2003.
- ZEHR, J. P.; MELLON, M.; BRAUN, S.; LITAKER, W.; STEPPE, T.; PAERL, H. W. Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 61, p. 2527–2532, 1995.
- ZHANG, L.; THÜNEN, T.; HUREK, T et al. Biodiversity of nitrogen-fixing microorganisms. Relatório (relatório de projeto). German Programme on biodiversity and GlobalChange: Phase I, 2000-2004 (Project ID: 01LC0021). 2001.
- ZINONI, F.; ROBSON, M.; ROBSON, R.L. Organization of potential alternative nitrogenase genes from *Clostridium pasteurianum*. **Biochemica et BiophysicaActa**, Amsterdam, v.1174, p.83-86, 1993.

## APÊNDICE

**Resumo do relatório com os resultados contendo a identificação das seqüências 16S *rDNA* das estirpes obtidas pela direção forward, valores de “score”, “e-value” e alinhamento das seqüências.**

### SEMIA 2002

[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 890 0.0  
[gil1895063|gb|U89824.1|RLU89824](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 890 0.0  
[gil1895064|gb|U89825.1|RLU89825](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 890 0.0  
[gil2801559|gb|AF041443.1](#) Rhizobium sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 890 0.0  
[gil9255925|gb|AF282924.1|AF282924](#) Mesorhizobium sp. N36 16S ribo... 890 0.0

### SEMIA 6158

[gil3724080|emb|Z94821.1](#) Bradyrhizobium genosp. L 16S rDNA gene 753 0.0  
[gil5923809|gb|AF178437.1|AF178437](#) Bradyrhizobium sp. jwc91-2 16S... 753 0.0  
[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 753 0.0  
[gil11494002|gb|AF208512.1|AF208512](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 753 0.0  
[gil11494006|gb|AF208516.1|AF208516](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 753 0.0

### SEMIA 6319

[gil13959081|gb|AF363136.1|AF363136](#) Bradyrhizobium sp. MSDJ G17 1... 757 0.0  
[gil19912805|dbj|AB072412.1](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 757 0.0  
[gil23380438|gb|AY148432.1](#) Rhizobium sp. BA1 16S ribosomal RNA g... 757 0.0  
[gil18874051|dbj|AB070563.1](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 757 0.0  
[gil18874052|dbj|AB070564.1](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 757 0.0

### SEMIA 6159

[gil56553420|gb|AY834756.1](#) Rhodopseudomonas palustris strain 2c ... 581 e-163  
[gil20149127|gb|AF494092.1](#) Burkholderia caryophylli strain YS13 ... 389 e-106  
[gil53774176|gb|AY741354.1](#) Burkholderia cepacia strain ATCC 5379... 389 e-106  
[gil109942149|emb|AM184283.1](#) Burkholderia caryophylli partial 16... 389 e-106  
[gil110451858|gb|DQ674859.1](#) Rhizobium sp. CCNWYC119 16S ribosoma... 389 e-106

## SEMIA 6168

- [gil26024186|gb|AF260274.2|](#) *Rhizobium tropici* strain SEMIA 4080 1... 842 0.0
- [gil28628872|gb|AF484602.1|](#) *Rhizobium* sp. 28c 16S ribosomal RNA g... 842 0.0
- [gil117958353|gb|EF054892.1|](#) *Rhizobium tropici* clone H53 16S ribo... 842 0.0
- [gil28628873|gb|AF484603.1|](#) *Rhizobium* sp. 7b 16S ribosomal RNA ge... 841 0.0
- [gil59002809|gb|AY904776.1|](#) *Rhizobium* sp. SEMIA 6383 16S ribosoma... 835 0.0

## SEMIA 6169

- [gil6063388|gb|AF054930.2|AF054930](#) *Rhizobium* sp. XI96060 16S ribo... 714 0.0
- [gil14009376|embl|AJ300187.1|](#) *Sinorhizobium* sp. ORS1873 16S rDNA g... 714 0.0
- [gil16416322|embl|AJ417086.1|](#) *Sinorhizobium* sp. Rch-9868 partial 1... 714 0.0
- [gil16416324|embl|AJ417088.1|](#) *Sinorhizobium* sp. Rch-9813 partial 1... 714 0.0
- [gil28543667|gb|AY196962.1|](#) *Sinorhizobium meliloti* strain GVPV12 ... 714 0.0

## SEMIA 6192

- [gil21654744|gb|AY039015.1|](#) *Bradyrhizobium* sp. ORS 3259 16S ribos... 791 0.0
- [gil28849768|gb|AF514798.1|](#) *Bradyrhizobium* sp. ORS206 16S ribosom... 783 0.0
- [gil59002724|gb|AY904772.1|](#) *Bradyrhizobium japonicum* strain SEMIA... 783 0.0
- [gil11493995|gb|AF208505.1|AF208505](#) *Bradyrhizobium japonicum* stra... 781 0.0
- [gil19912812|dbj|AB072419.1|](#) *Bradyrhizobium japonicum* gene for 16... 781 0.0

## SEMIA 6209

- [gil12830853|gb|AF321212.1|AF321212](#) *Bradyrhizobium* sp. strain Ec3... 874 0.0
- [gil12830854|gb|AF321213.1|AF321213](#) *Bradyrhizobium* sp. strain Rp2... 874 0.0
- [gil51572645|gb|AY691403.1|](#) *Bradyrhizobium* sp. tpar1.2 16S riboso... 874 0.0
- [gil38201216|embl|AJ303087.1|](#) *Bradyrhizobium* sp. STM259 partial 16... 874 0.0
- [gil32966027|gb|AY329631.1|](#) *Bradyrhizobium* sp. Dr4a.7 16S ribosom... 874 0.0

## SEMIA 806

- [gil1236669|gb|U50166.1|RLU50166](#) *Rhizobium loti* 16S ribosomal RNA... 496 e-138
- [gil3114862|embl|Y14159.1|](#) *Mesorhizobium loti* 16S rDNA gene, strai... 496 e-138
- [gil3114863|embl|Y14160.1|](#) *Mesorhizobium loti* 16S rDNA gene, strai... 496 e-138
- [gil3724151|embl|Z94807.1|](#) *Mesorhizobium* genosp. T 16S rDNA gene 496 e-138
- [gil2801560|gb|AF041444.1|](#) *Mesorhizobium* sp. 'SH 15003' 16S ribos... 496 e-138

## SEMIA 103

[gil464204|dbj|D14509.1|RHM16SRDM](#) Sinorhizobium meliloti gene for... 1201 0.0  
[gil1196895|gb|L39882.1|SNORDNA](#) Sinorhizobium sp. ribosomal RNA (... 1195 0.0  
[gil1707847|emb|Z78204.1](#) Sinorhizobium sp. 16S rDNA gene, strain... 1195 0.0  
[gil59001709|gb|AY904726.1](#) Sinorhizobium meliloti strain SEMIA 1... 1195 0.0  
[gil113725780|gb|AATG01000001.1](#) Sinorhizobium medicae WSM419 ctg... 1195 0.0

## SEMIA 344

[gil1895063|gb|U89824.1|RLU89824](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 1166 0.0  
[gil1895066|gb|U89827.1|RLU89827](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 1166 0.0  
[gil1895067|gb|U89828.1|RLU89828](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 1166 0.0  
[gil2801559|gb|AF041443.1](#) Rhizobium sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 1166 0.0  
[gil9255925|gb|AF282924.1|AF282924](#) Mesorhizobium sp. N36 16S ribo... 1166 0.0

## SEMIA 6070

[gil40737824|gb|AY507977.1](#) Bradyrhizobium sp. ML49 16S ribosomal... 965 0.0  
[gil118420583|emb|AM412315.1](#) Burkholderia cepacia partial 16S rR... 462 e-128  
[gil46367727|dbj|AB126767.1](#) Agrobacterium tumefaciens gene for 1... 454 e-125  
[gil37549265|gb|AY391283.1](#) Burkholderia unamae isolate TR3.4 16S... 206 6e-51  
[gil55669130|gb|AY773192.1](#) Burkholderia sp. Br3461 16S ribosomal... 206 6e-51

## SEMIA 6145

[gil59001836|gb|AY904732.1](#) Bradyrhizobium japonicum strain SEMIA... 934 0.0  
[gil1434921|dbj|D86354.1](#) Bradyrhizobium sp. gene for 16S rDNA 926 0.0  
[gil5306104|gb|AF159436.1|AF159436](#) Bradyrhizobium sp. Pe1-3 16S r... 926 0.0  
[gil16033706|gb|AF417550.1|AF417550](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 926 0.0  
[gil19912812|dbj|AB072419.1](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 926 0.0

## SEMIA 6152

[gil3550797|dbj|AB003457.1](#) Soil DNB bacterium G14130 gene for 16... 381 e-103  
[gil3550798|dbj|AB003458.1](#) Soil DNB bacterium G14003 gene for 16... 381 e-103  
[gil3550799|dbj|AB003459.1](#) Soil DNB bacterium G14127 gene for 16... 381 e-103  
[gil3550800|dbj|AB003460.1](#) Soil DNB bacterium G14109 gene for 16... 381 e-103  
[gil3724065|emb|Z94804.1](#) Bradyrhizobium genosp. G 16S rDNA gene 381 e-103

## SEMIA 6153

[gil9789491|gb|AF250377.1](#) Sinorhizobium xinjiangensis 16S riboso... 605 e-171  
[gil15147889|gb|AF250355.1](#) Sinorhizobium xinjiangensis strain CC... 605 e-171

[gil16416322|emblAJ417086.1|](#) Sinorhizobium sp. Rch-9868 partial 1... 603 e-170  
[gil16416324|emblAJ417088.1|](#) Sinorhizobium sp. Rch-9813 partial 1... 603 e-170  
[gil4029366|emblAJ004860.1|](#) Sinorhizobium sp. MSMC310 16S rDNA gene 597 e-168

## SEMIA 6154

[gil1434921|dbj|D86354.1|](#) Bradyrhizobium sp. gene for 16S rDNA 1146 0.0  
[gil28849768|gblAF514798.1|](#) Bradyrhizobium sp. ORS206 16S ribosom... 1146 0.0  
[gil13447985|gblAF338176.1|](#) Blastobacter denitrificans 16S riboso... 1146 0.0  
[gil39465|emblX66025.1|](#) Blastobacter denitrificans partial 16S rR... 1146 0.0  
[gil48734360|gblAY628222.1|](#) Bradyrhizobium sp. PAC40 16S ribosoma... 1146 0.0

## SEMIA 4077

[gil117582545|gblEF035059.1|](#) Rhizobium sp. CCBAU 83345 16S riboso... 365 1e-98  
[gil117582551|gblEF035065.1|](#) Rhizobium sp. CCBAU 83375 16S riboso... 365 1e-98  
[gil117582548|gblEF035062.1|](#) Rhizobium sp. CCBAU 83333 16S riboso... 363 4e-98  
[gil1055273|gblU38469.1|RTU38469](#) Rhizobium tropici 16S ribosomal ... 361 2e-97  
[gil443967|emblX77125.1|](#) R.tropici (LMG 9503) 16S rDNA gene 361 2e-97

## SEMIA 587

[gil11494000|gblAF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1063 0.0  
[gil11494008|gblAF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1063 0.0  
[gil13959057|gblAF363116.1|AF363116](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1063 0.0  
[gil13959063|gblAF363122.1|AF363122](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1063 0.0  
[gil12830856|gblAF321215.1|AF321215](#) Bradyrhizobium sp. strain Cj3... 1063 0.0

## SEMIA 816

[gil45548922|gblAY491075.1|](#) Mesorhizobium sp. ICMP 12635 16S ribo... 1197 0.0  
[gil3114862|emblY14159.1|](#) Mesorhizobium loti 16S rDNA gene, strai... 1193 0.0  
[gil9255929|gblAF282928.1|AF282928](#) Mesorhizobium sp. USDA 3466 16... 1193 0.0  
[gil45686229|gblAY490111.1|](#) Mesorhizobium sp. puth-1 16S ribosoma... 1193 0.0  
[gil31323721|gblAF509927.1|](#) Mesorhizobium sp. Put-2 16S ribosomal... 1193 0.0

## SEMIA 830

[gil46175|emblX63825.1|](#) R.loti gene for 16S ribosomal RNA (partial) 371 e-100  
[gil1236667|gblU50164.1|RLU50164](#) Rhizobium loti 16S ribosomal RNA... 371 e-100  
[gil3114862|emblY14159.1|](#) Mesorhizobium loti 16S rDNA gene, strai... 371 e-100

[gil3724152|embl|Z94817.1|](#) Mesorhizobium genosp. S 16S rDNA gene 371 e-100  
[gil2801561|gbl|AF041445.1|](#) Mesorhizobium sp. HL56 16S ribosomal R... 371 e-100

## SEMIA 928

[gil13959093|gbl|AF363148.1|AF363148](#) Bradyrhizobium sp. MSDJ 5725 ... 1072 0.0  
[gil37961740|gbl|AY234583.1|](#) Bacterium Ellin5232 16S ribosomal RNA... 1072 0.0  
[gil62361065|gbl|AY876603.1|](#) Uncultured Bradyrhizobiaceae bacteriu... 1072 0.0  
[gil13959087|gbl|AF363142.1|AF363142](#) Bradyrhizobium sp. MSDJ 5728 ... 1068 0.0  
[gil37693284|embl|AJ558029.1|](#) Bradyrhizobium sp. ISLU65 partial 16... 1065 0.0

## SEMIA 929

[gil3724073|embl|Z94812.1|](#) Bradyrhizobium genosp. B 16S rDNA gene 662 0.0  
[gil431440|gbl|L23405.1|PZIRR16S](#) Photorhizobium thompsonianum 16S ... 662 0.0  
[gil1434921|dbj|D86354.1|](#) Bradyrhizobium sp. gene for 16S rDNA 662 0.0  
[gil11493995|gbl|AF208505.1|AF208505](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 662 0.0  
[gil5306104|gbl|AF159436.1|AF159436](#) Bradyrhizobium sp. Pe1-3 16S r... 662 0.0

## SEMIA 938

[gil431440|gbl|L23405.1|PZIRR16S](#) Photorhizobium thompsonianum 16S ... 1130 0.0  
[gil1434921|dbj|D86354.1|](#) Bradyrhizobium sp. gene for 16S rDNA 1130 0.0  
[gil11493995|gbl|AF208505.1|AF208505](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1130 0.0  
[gil5306104|gbl|AF159436.1|AF159436](#) Bradyrhizobium sp. Pe1-3 16S r... 1130 0.0  
[gil14326091|gbl|AF362944.1|AF362944](#) Bradyrhizobium sp. PFAG5100 1... 1130 0.0

## SEMIA 4080

[gil117582545|gbl|EF035059.1|](#) Rhizobium sp. CCBAU 83345 16S riboso... 1160 0.0  
[gil117582551|gbl|EF035065.1|](#) Rhizobium sp. CCBAU 83375 16S riboso... 1160 0.0  
[gil3724150|embl|Z94806.1|](#) Rhizobium genosp. Q 16S rDNA gene 1158 0.0  
[gil16033724|gbl|AF417562.1|AF417562](#) Rhizobium leguminosarum strai... 1158 0.0  
[gil296479|embl|X67233.1|](#) Rhizobium tropici subgroup IIB partial 1... 1158 0.0

## SEMIA 5019

[gil11494000|gbl|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1193 0.0  
[gil11494008|gbl|AF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1193 0.0  
[gil13959057|gbl|AF363116.1|AF363116](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1193 0.0  
[gil13959063|gbl|AF363122.1|AF363122](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1193 0.0

[gil13959097|gb|AF363152.1|AF363152](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1193 0.0

#### SEMIA 5079

[gil83630176|gb|DQ303326.1](#) Uncultured Bradyrhizobium sp. clone T... 327 2e-87

[gil50261807|gb|AY649439.1](#) Bradyrhizobium japonicum strain BR326... 321 1e-85

[gil55420405|gb|AY776224.1](#) Rhizobium sp. AC86b2 16S ribosomal RN... 321 1e-85

[gil175836|gb|M55489.1|RHBRR16SE](#) Bradyrhizobium japonicum (USDA 5... 319 6e-85

[gil767686|gb|L41525.1|RHBARG16SC](#) (Bradyrhizobium sp. (strain T-1... 319 6e-85

#### SEMIA 5080

[gil11321095|gb|AF293381.1](#) Bradyrhizobium japonicum strain USDA ... 504 e-140

[gil431454|gb|L23330.1|RHB1RR16SA](#) Bradyrhizobium japonicum (USDA ... 494 e-137

[gil431455|gb|L23331.1|RHB1RR16SB](#) Bradyrhizobium japonicum (USDA ... 494 e-137

[gil515768|emb|Z35330.1](#) B.japonicum (110) genes for 16S, 23S, 5S... 494 e-137

[gil1165003|emb|X87272.1](#) B.japonicum 16S rDNA gene 494 e-137

#### SEMIA 6156

[gil38201213|emb|AJ301630.1](#) Bradyrhizobium sp. ORS135 partial 16... 1063 0.0

[gil32966028|gb|AY329632.1](#) Bradyrhizobium sp. Pp2.4 16S ribosoma... 1063 0.0

[gil59001906|gb|AY904735.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain SEMIA 6... 1063 0.0

[gil59002011|gb|AY904739.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain SEMIA 9... 1063 0.0

[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1047 0.0

#### SEMIA 6157

[gil28436387|gb|U35000.3|BEU35000](#) Bradyrhizobium elkanii 16S ribo... 1041 0.0

[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1033 0.0

[gil11494008|gb|AF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1033 0.0

[gil13959057|gb|AF363116.1|AF363116](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1033 0.0

[gil13959063|gb|AF363122.1|AF363122](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1033 0.0

#### LMG 6346

[gil2385389|emb|Y12355.1](#) Rhizobium galegae 16S rDNA gene, partia... 1213 0.0

[gil2385390|emb|Y12356.1](#) Rhizobium galegae 16S rDNA gene, partia... 1213 0.0

[gil46389638|emb|X67226.2](#) Rhizobium galegae partial 16S rDNA gen... 1213 0.0

[gil303825|dbj|D12793.1|RHM16SRRNE](#) Rhizobium galegae gene for 16S... 1213 0.0

[gil2385392|emb|Y12358.1](#) Rhizobium galegae 16S rDNA gene, partia... 1205 0.0

## LMG 8819

[gil21898755|gb|AY117635.1](#) Rhizobium etli strain PRF206 16S ribo... 924 0.0  
[gil21898784|gb|AY117664.1](#) Sinorhizobium sp. PRF129 16S ribosoma... 916 0.0  
[gil12667223|gb|AF313904.1|AF313904](#) Rhizobium etli strain CIAT151... 914 0.0  
[gil29122902|gb|AY210706.1](#) Rhizobium sp. Am4-1 16S ribosomal RNA... 914 0.0  
[gil29122910|gb|AY210714.1](#) Rhizobium sp. Dz8-2 16S ribosomal RNA... 914 0.0

## LMG 14107

[gil464209|dbj|D13431.1|RHM16SRDE](#) Mesorhizobium huakuii gene for ... 803 0.0  
[gil28849770|gb|AF514800.1](#) Mesorhizobium sp. ORS207 16S ribosoma... 795 0.0  
[gil1236668|gb|U50165.1|RLU50165](#) Rhizobium loti 16S ribosomal RNA... 793 0.0  
[gil1236671|gb|U50168.1|RSU50168](#) Rhizobium sp. CJ5 16S ribosomal ... 793 0.0  
[gil37960122|gb|AY225391.1](#) Mesorhizobium sp. 90 16S ribosomal RN... 793 0.0

## LMG 14919

[gil110623080|embl|AM284998.1](#) Sinorhizobium sp. A16 partial 16S r... 692 0.0  
[gil1196895|gb|L39882.1|SNORDNA](#) Sinorhizobium sp. ribosomal RNA (... 686 0.0  
[gil2385400|embl|Y12353.1](#) Rhizobium sp. 16S rDNA gene, partial, s... 686 0.0  
[gil1707847|embl|Z78204.1](#) Sinorhizobium sp. 16S rDNA gene, strain... 686 0.0  
[gil10945136|embl|AJ012211.1](#) Sinorhizobium sp. 16S rDNA gene, str... 686 0.0

## LMG 14989

[gil1839225|gb|U86343.1|RGU86343](#) Rhizobium gallicum 16S ribosomal... 957 0.0  
[gil1895071|gb|U89816.1|RMU89816](#) Rhizobium mongolense 16S ribosom... 957 0.0  
[gil17025875|gb|AY056831.1](#) Rhizobium sp. CA8561 16S ribosomal RN... 957 0.0  
[gil13591724|gb|AF345541.1|AF345541](#) Rhizobium sp. ca8593 16S ribo... 957 0.0  
[gil13591738|gb|AF345555.1|AF345555](#) Rhizobium sp. X59 16S ribosom... 957 0.0

## LMG 17148

[gil16416321|embl|AJ417085.1](#) Mesorhizobium sp. Rch-984 partial 16... 880 0.0  
[gil16416327|embl|AJ417091.1](#) Mesorhizobium sp. Rch-9865 partial 1... 880 0.0  
[gil13591730|gb|AF345547.1|AF345547](#) Rhizobium sp. SDW018 16S ribo... 880 0.0  
[gil24251135|gb|AY141983.1](#) Mesorhizobium sp. SH2851 16S ribosoma... 880 0.0  
[gil37960112|gb|AY225381.1](#) Mesorhizobium sp. 6b 16S ribosomal RN... 880 0.0

## LMG 18254

[gil2385399|emb|Y12352.1|](#) Rhizobium sp. 16S rDNA gene, partial, s... 1132 0.0  
[gil2558997|gb|AF025852.1|AF025852](#) Rhizobium huatlense 16S ribos... 1132 0.0  
[gil9789563|gb|AF285965.1|AF285965](#) Sinorhizobium sp. S009 16S rib... 1132 0.0  
[gil464205|dbj|D14510.1|RHM16SRDN](#) Rhizobium sp. OK-55 gene for 16... 1132 0.0  
[gil119874434|gb|EF070127.1|](#) Rhizobium sp. CCBAU 25179 16S riboso... 1132 0.0

#### LMG 18864

[gil110623080|emb|AM284998.1|](#) Sinorhizobium sp. A16 partial 16S r... 551 e-155  
[gil1196895|gb|L39882.1|SNORDNA](#) Sinorhizobium sp. ribosomal RNA (... 545 e-153  
[gil2385400|emb|Y12353.1|](#) Rhizobium sp. 16S rDNA gene, partial, s... 545 e-153  
[gil1707847|emb|Z78204.1|](#) Sinorhizobium sp. 16S rDNA gene, strain... 545 e-153  
[gil10945136|emb|AJ012211.1|](#) Sinorhizobium sp. 16S rDNA gene, str... 545 e-153

#### LMG 6133

[gil4029366|emb|AJ004860.1|](#) Sinorhizobium sp. MSMC310 16S rDNA gene 490 e-136  
[gil4029374|emb|AJ004861.1|](#) Sinorhizobium sp. MSMC411 16S rDNA gene 490 e-136  
[gil4850254|emb|AJ238927.1|](#) Rhizobium sp. partial 16S rDNA gene, ... 490 e-136  
[gil8133105|gb|AF268072.1|AF268072](#) Sinorhizobium sp. 15C-4 16S ri... 490 e-136  
[gil9789561|gb|AF285963.1|AF285963](#) Sinorhizobium sp. S005 16S rib... 490 e-136

#### LMG 6134

[gil46367727|dbj|AB126767.1|](#) Agrobacterium tumefaciens gene for 1... 115 2e-23  
[gil118420583|emb|AM412315.1|](#) Burkholderia cepacia partial 16S rR... 115 2e-23  
[gil40737824|gb|AY507977.1|](#) Bradyrhizobium sp. ML49 16S ribosomal... 92 2e-16  
[gil52083010|gb|AY743366.1|](#) Uncultured Bosea sp. clone 42 16S rib... 76 1e-11  
[gil83281432|gb|DQ294768.1|](#) Uncultured Bradyrhizobium sp. clone P... 72 2e-10

#### LMG 6217

[gil118420583|emb|AM412315.1|](#) Burkholderia cepacia partial 16S rR... 250 4e-64  
[gil89953753|gb|DQ419569.1|](#) Rhizobium sp. As-1 16S ribosomal RNA ... 200 4e-49  
[gil89953754|gb|DQ419570.1|](#) Rhizobium sp. As-2 16S ribosomal RNA ... 200 4e-49  
[gil89953755|gb|DQ419571.1|](#) Rhizobium sp. As-3 16S ribosomal RNA ... 200 4e-49  
[gil3702621|emb|Z94803.1|](#) Rhizobium genosp. R 16S rDNA gene 190 4e-46

#### LMG 18977

[gil902059|gb|U29386.1|RLU29386](#) Rhizobium leguminosarum bv. vicia... 394 e-107  
[gil15186744|dbj|AB069656.1|](#) Rhizobium sp. EC201-1 gene for 16S r... 394 e-107

[gil4205887|gb|AF063982.1|AF063982](#) Rhizobium sp. USDA 2370 16S ri... 389 e-106

[gil1628625|gb|U72626.1|RLU72626](#) Rhizobium leguminosarum 16S ribo... 387 e-105

[gil1628626|gb|U72627.1|RLU72627](#) Rhizobium leguminosarum 16S ribo... 387 e-105

#### LMG 19227

[gil31323787|gb|AF511501.1](#) Rhizobium sp. Trp-5 16S ribosomal RNA... 680 0.0

[gil31323860|gb|AF510628.1](#) Rhizobium sp. Trp-4 16S ribosomal RNA... 680 0.0

[gil83630153|gb|DQ303303.1](#) Uncultured Rhizobium sp. clone TM18\_2... 680 0.0

[gil1895063|gb|U89824.1|RLU89824](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 672 0.0

[gil1895066|gb|U89827.1|RLU89827](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 672 0.0

#### LMG 19592

[gil1839225|gb|U86343.1|RGU86343](#) Rhizobium gallicum 16S ribosomal... 765 0.0

[gil1895071|gb|U89816.1|RMU89816](#) Rhizobium mongolense 16S ribosom... 765 0.0

[gil1895078|gb|U89823.1|RSU89823](#) Rhizobium sp. 'USDA 1920' 16S ri... 765 0.0

[gil17025875|gb|AY056831.1](#) Rhizobium sp. CA8561 16S ribosomal RN... 765 0.0

[gil13591724|gb|AF345541.1|AF345541](#) Rhizobium sp. ca8593 16S ribo... 765 0.0

#### R602

[gil62084747|gb|AY873982.1](#) Burkholderia sp. HOT13 16S ribosomal ... 848 0.0

[gil2290259|gb|U87785.1|AGU87785](#) Afipia genosp. 14 16S ribosomal ... 646 0.0

[gil27805068|gb|AY177780.1](#) Uncultured Afipia sp. 16S ribosomal R... 636 e-180

[gil73349914|gb|DQ145574.1](#) Uncultured Afipia sp. clone IAFIL65 1... 636 e-180

[gil77819262|gb|DQ188349.1](#) Uncultured Afipia sp. clone BL032B60 ... 634 e-180

#### SEMIA 134

[gil1236668|gb|U50165.1|RLU50165](#) Rhizobium loti 16S ribosomal RNA... 617 e-174

[gil1236671|gb|U50168.1|RSU50168](#) Rhizobium sp. CJ5 16S ribosomal ... 617 e-174

[gil37960122|gb|AY225391.1](#) Mesorhizobium sp. 90 16S ribosomal RN... 617 e-174

[gil37960124|gb|AY225393.1](#) Mesorhizobium sp. 94 16S ribosomal RN... 617 e-174

[gil33309371|gb|AF408971.1](#) Mesorhizobium sp. Ellin129 16S riboso... 617 e-174

#### SEMIA 135

[gil117582547|gb|EF035061.1](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 83493 16S ri... 1037 0.0

[gil9789562|gb|AF285964.1|AF285964](#) Sinorhizobium sp. S007 16S rib... 1029 0.0

[gil6063388|gb|AF054930.2|AF054930](#) Rhizobium sp. XJ96060 16S ribo... 1029 0.0

[gil6063389|gb|AF054931.2|AF054931](#) Rhizobium sp. XJ96408 16S ribo... 1029 0.0  
[gil14009376|embl|AJ300187.1](#) Sinorhizobium sp. ORS1873 16S rDNA g... 1029 0.0

## SEMIA 265

[gil83630154|gb|DQ303304.1](#) Uncultured Rhizobium sp. clone TM18\_1... 759 0.0  
[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 757 0.0  
[gil122939173|gb|DQ835291.2](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae s... 757 0.0  
[gil122939174|gb|DQ835292.2](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae s... 757 0.0  
[gil122939175|gb|DQ835293.2](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae s... 757 0.0

## SEMIA 384

[gil1895075|gb|U89820.1|RMU89820](#) Rhizobium mongolense 16S ribosom... 1178 0.0  
[gil12667224|gb|AF313905.1|AF313905](#) Rhizobium sp. CIAT613 16S rib... 1178 0.0  
[gil12667225|gb|AF313906.1|AF313906](#) Rhizobium sp. CIAT652 16S rib... 1178 0.0  
[gil29122900|gb|AY210704.1](#) Rhizobium sp. Ad2 16S ribosomal RNA g... 1178 0.0  
[gil29122901|gb|AY210705.1](#) Rhizobium sp. Ak3-1 16S ribosomal RNA... 1178 0.0

## SEMIA 388

[gil3550798|dbj|AB003458.1](#) Soil DNB bacterium G14003 gene for 16... 854 0.0  
[gil3550799|dbj|AB003459.1](#) Soil DNB bacterium G14127 gene for 16... 854 0.0  
[gil3550800|dbj|AB003460.1](#) Soil DNB bacterium G14109 gene for 16... 854 0.0  
[gil3724073|embl|Z94812.1](#) Bradyrhizobium genosp. B 16S rDNA gene 854 0.0  
[gil431440|gb|L23405.1|PZIRR16S](#) Photorhizobium thompsonianum 16S ... 854 0.0

## SEMIA 396

[gil117582544|gb|EF035058.1](#) Mesorhizobium sp. CCBAU 83306 16S ri... 500 e-139  
[gil780370|gb|U07934.1|RCU07934](#) Rhizobium ciceri 16S ribosomal RN... 498 e-138  
[gil1050333|gb|L38825.1|RHMRGD](#) Rhizobium mediterraneum 16S riboso... 498 e-138  
[gil16416318|embl|AJ417082.1](#) Mesorhizobium sp. Rch-981 partial 16... 498 e-138  
[gil16416319|embl|AJ417083.1](#) Mesorhizobium sp. Rch-19B partial 16... 498 e-138

## SEMIA 656

[gil38201213|embl|AJ301630.1](#) Bradyrhizobium sp. ORS135 partial 16... 1021 0.0  
[gil32966028|gb|AY329632.1](#) Bradyrhizobium sp. Pp2.4 16S ribosoma... 1021 0.0  
[gil59001906|gb|AY904735.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain SEMIA 6... 1021 0.0  
[gil59002011|gb|AY904739.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain SEMIA 9... 1021 0.0  
[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1005 0.0

## SEMIA 662

- [gil50261800|gb|AY649432.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain BR3278 ... 337 3e-90  
[gil15080877|gb|AF271638.1|AF271638](#) Bradyrhizobium sp. IRBG 271 1... 333 4e-89  
[gil3724080|emb|Z94821.1](#) Bradyrhizobium genosp. L 16S rDNA gene 329 6e-88  
[gil5923809|gb|AF178437.1|AF178437](#) Bradyrhizobium sp. jwc91-2 16S... 329 6e-88  
[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 329 6e-88

## SEMIA 695

- [gil70721018|dbj|AB220167.1](#) Bradyrhizobium sp. F4b gene for 16S ... 652 0.0  
[gil31323821|gb|AF510589.1](#) Bradyrhizobium sp. vga-1 16S ribosoma... 650 0.0  
[gil3724080|emb|Z94821.1](#) Bradyrhizobium genosp. L 16S rDNA gene 644 0.0  
[gil5923809|gb|AF178437.1|AF178437](#) Bradyrhizobium sp. jwc91-2 16S... 644 0.0  
[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 644 0.0

## SEMIA 2050

- [gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 646 0.0  
[gil122939173|gb|DQ835291.2](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae s... 644 0.0  
[gil122939174|gb|DQ835292.2](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae s... 644 0.0  
[gil122939175|gb|DQ835293.2](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae s... 644 0.0  
[gil122939176|gb|DQ835294.2](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae s... 644 0.0

## SEMIA 2051

- [gil117582557|gb|EF035071.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 83526 16S riboso... 583 e-164  
[gil116177464|gb|DQ993268.1](#) Rhizobium leguminosarum strain CCBAU... 577 e-162  
[gil117582560|gb|EF035075.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 83309 16S riboso... 577 e-162  
[gil1895063|gb|U89824.1|RLU89824](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 575 e-162  
[gil1895066|gb|U89827.1|RLU89827](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 575 e-162

## SEMIA 3007

- [gil21070106|gb|AF506053.1](#) Rhizobium sp. LCSAOTU24 16S ribosomal... 684 0.0  
[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 678 0.0  
[gil1895063|gb|U89824.1|RLU89824](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 678 0.0  
[gil1895064|gb|U89825.1|RLU89825](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 678 0.0  
[gil2801559|gb|AF041443.1](#) Rhizobium sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 678 0.0

## SEMIA 3012

[gil117582544|gb|EF035058.1](#) Mesorhizobium sp. CCBAU 83306 16S ri... 844 0.0  
[gil1050333|gb|L38825.1|RHMRGD](#) Rhizobium mediterraneum 16S riboso... 842 0.0  
[gil16416321|emb|AJ417085.1](#) Mesorhizobium sp. Rch-984 partial 16... 842 0.0  
[gil16416327|emb|AJ417091.1](#) Mesorhizobium sp. Rch-9865 partial 1... 842 0.0  
[gil13591730|gb|AF345547.1|AF345547](#) Rhizobium sp. SDW018 16S ribo... 842 0.0

## SEMIA 6424

[gil118420583|emb|AM412315.1](#) Burkholderia cepacia partial 16S rR... 529 e-148  
[gil46367727|dbj|AB126767.1](#) Agrobacterium tumefaciens gene for 1... 521 e-146  
[gil40737824|gb|AY507977.1](#) Bradyrhizobium sp. ML49 16S ribosomal... 347 3e-93  
[gil62084747|gb|AY873982.1](#) Burkholderia sp. HOT13 16S ribosomal ... 208 2e-51  
[gil2290259|gb|U87785.1|AGU87785](#) Afipia genosp. 14 16S ribosomal ... 200 4e-49

## SEMIA 3025

[gil117582557|gb|EF035071.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 83526 16S riboso... 1174 0.0  
[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 1168 0.0  
[gil116177464|gb|DQ993268.1](#) Rhizobium leguminosarum strain CCBAU... 1168 0.0  
[gil1895063|gb|U89824.1|RLU89824](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 1166 0.0  
[gil1895066|gb|U89827.1|RLU89827](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 1166 0.0

## SEMIA 3026

[gil46367727|dbj|AB126767.1](#) Agrobacterium tumefaciens gene for 1... 383 e-104  
[gil118420583|emb|AM412315.1](#) Burkholderia cepacia partial 16S rR... 383 e-104  
[gil40737824|gb|AY507977.1](#) Bradyrhizobium sp. ML49 16S ribosomal... 343 4e-92  
[gil62084747|gb|AY873982.1](#) Burkholderia sp. HOT13 16S ribosomal ... 210 4e-52  
[gil82940825|dbj|AB242723.1](#) Methylobacterium sp. 52AD16 gene for... 204 2e-50

## SEMIA 6069

[gil28894114|gb|AY206687.1](#) Rhizobium rhizogenes strain 163C 16S ... 1033 0.0  
[gil296410|emb|X67224.1](#) Agrobacterium rhizogenes partial 16S rRN... 1033 0.0  
[gil296486|emb|X67232.1](#) Agrobacterium rhizogenes partial 16S rRN... 1033 0.0  
[gil45686237|gb|AY490119.1](#) Rhizobium sp. lebi-5 16S ribosomal RN... 1033 0.0  
[gil303495|dbj|D12788.1|ATURDNAA](#) Agrobacterium rhizogenes gene fo... 1033 0.0

## SEMIA 6144

[gil11321095|gblAF293381.1](#) Bradyrhizobium japonicum strain USDA ... 771 0.0  
[gil3550798|dbj|AB003458.1](#) Soil DNB bacterium G14003 gene for 16... 767 0.0  
[gil3550799|dbj|AB003459.1](#) Soil DNB bacterium G14127 gene for 16... 767 0.0  
[gil3550800|dbj|AB003460.1](#) Soil DNB bacterium G14109 gene for 16... 767 0.0  
[gil3724073|embl|Z94812.1](#) Bradyrhizobium genosp. B 16S rDNA gene 767 0.0

## SEMIA 6150

[gil56553420|gblAY834756.1](#) Rhodopseudomonas palustris strain 2c ... 476 e-132  
[gil3492828|dbj|D88521.1](#) Agrobacterium agile gene for 16S rDNA, ... 309 5e-82  
[gil110451858|gblDQ674859.1](#) Rhizobium sp. CCNWYC119 16S ribosoma... 301 1e-79  
[gil109942149|emblAM184283.1](#) Burkholderia caryophylli partial 16... 293 3e-77  
[gil114796525|emblAM397047.1](#) Burkholderia sp. SP4MA1 partial 16S... 289 5e-76

## SEMIA 6162

[gil9789561|gblAF285963.1|AF285963](#) Sinorhizobium sp. S005 16S rib... 529 e-148  
[gil55420358|gblAY776177.1](#) Rhizobium sp. AC10a1 16S ribosomal RN... 529 e-148  
[gil59002519|gblAY904763.1](#) Sinorhizobium sp. SEMIA 6161 16S ribo... 529 e-148  
[gil55420371|gblAY776190.1](#) Rhizobium sp. AC38b2 16S ribosomal RN... 527 e-147  
[gil69219369|gblDQ100067.1](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 35204 16S rib... 527 e-147

## SEMIA 6165

[gil13776418|gblAZ934358.1|AZ934358](#) BJ\_\_Ba0002C02r B. japonicum B... 70 9e-10  
[gil83750266|reflNZ\\_AAKL01000365.1](#) Ralstonia solanacearum UW551 ... 68 4e-09  
[gil1916985|gblU91838.1|BSU91838](#) Burkholderia thailandensis strai... 66 1e-08  
[gil5139344|emblAJ238360.1](#) Burkholderia brasiliensis 16S rDNA gen... 66 1e-08  
[gil6018161|gblAF074711.1|AF074711](#) Burkholderia sp. EN-B3 16S rib... 66 1e-08

## SEMIA 6175

[gil11494000|gblAF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 914 0.0  
[gil11494008|gblAF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 914 0.0  
[gil13959057|gblAF363116.1|AF363116](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 914 0.0  
[gil13959063|gblAF363122.1|AF363122](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 914 0.0  
[gil13959097|gblAF363152.1|AF363152](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 914 0.0

## SEMIA 6161

[gil46389593|emblX68390.2](#) Sinorhizobium saheli partial 16S rDNA ... 684 0.0  
[gil59002519|gblAY904763.1](#) Sinorhizobium sp. SEMIA 6161 16S ribo... 684 0.0

[gil110002848|emblAM181742.1|](#) Sinorhizobium saheli partial 16S rR... 684 0.0  
[gil110002859|emblAM181753.1|](#) Sinorhizobium saheli partial 16S rR... 684 0.0  
[gil13872802|emblAJ295077.1|](#) Sinorhizobium sp. ORS1236 16S rDNA g... 680 0.0

#### LMG 11892

[gil6960202|gb|AF227754.1|AF227754](#) Sinorhizobium sp. C2 16S ribos... 272 1e-70  
[gil1196895|gb|L39882.1|SNORDNA](#) Sinorhizobium sp. ribosomal RNA (... 270 5e-70  
[gil8133105|gb|AF268072.1|AF268072](#) Sinorhizobium sp. 15C-4 16S ri... 270 5e-70  
[gil9789562|gb|AF285964.1|AF285964](#) Sinorhizobium sp. S007 16S rib... 270 5e-70  
[gil6063388|gb|AF054930.2|AF054930](#) Rhizobium sp. XJ96060 16S ribo... 270 5e-70

#### LMG 14904

[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 835 0.0  
[gil1895063|gb|U89824.1|RLU89824](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 835 0.0  
[gil1895064|gb|U89825.1|RLU89825](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 835 0.0  
[gil2801559|gb|AF041443.1|](#) Rhizobium sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 835 0.0  
[gil9255925|gb|AF282924.1|AF282924](#) Mesorhizobium sp. N36 16S ribo... 835 0.0

#### LMG 11875

[gil3387374|emblY17047.1|](#) Allorhizobium undicola 16S rDNA gene 603 e-170  
[gil109706855|gb|DQ648578.1|](#) Rhizobium undicola strain Liujia-1 1... 587 e-165  
[gil109706856|gb|DQ648579.1|](#) Rhizobium undicola strain Liujia-81 ... 587 e-165  
[gil51988937|gb|AY626398.1|](#) Agrobacterium vitis strain ICMP 10753... 563 e-158  
[gil51988938|gb|AY626399.1|](#) Agrobacterium vitis strain ICMP 10756... 563 e-158

#### LMG 17827

[gil38256822|emblAJ505300.1|](#) Rhizobium sp. TJ173 partial 16S rDNA... 692 0.0  
[gil86279771|gb|CP000133.1|](#) Rhizobium etli CFN 42, complete genome 684 0.0  
[gil86355669|ref|NC\\_007761.1|](#) Rhizobium etli CFN 42, complete genome 684 0.0  
[gil109706852|gb|DQ648575.1|](#) Rhizobium etli bv. mimosae strain Mi... 684 0.0  
[gil94962108|gb|DQ499529.1|](#) Rhizobium sp. 50.12 16S ribosomal RNA... 684 0.0

#### LMG 6138

[gil16033704|gb|AF417549.1|AF417549](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 626 e-177  
[gil402732|gb|L11664.1|RBLRGDR](#) Rhodopseudomonas palustris 16S rib... 613 e-173  
[gil1572650|gb|U69637.1|BLU69637](#) Bradyrhizobium lupini 16S riboso... 613 e-173

[gil9087296|gb|AF236086.2|AF236086](#) Bradyrhizobium japonicum strai... 613 e-173

[gil10336500|dbj|AB027692.2](#) Rhodopseudomonas sp. B29 gene for 16... 613 e-173

#### LMG 6465

[gil1313917|embl|X94200.1](#) A.caulinodans 16S ribosomal RNA 682 0.0

[gil870816|dbj|D13948.1|RHARDNA](#) Azorhizobium caulinodans 16S rDNA... 672 0.0

[gil296406|embl|X67221.1](#) Azorhizobium caulinodans partial 16S rRN... 666 0.0

[gil464201|dbj|D11342.1|RHA16SRDA](#) Azorhizobium caulinodans gene f... 666 0.0

[gil31580809|gb|AY301011.1](#) Azorhizobium sp. F1 16S ribosomal RNA... 634 e-180

#### LMG 7834

[gil14029731|gb|AF364853.1|AF364853](#) Sinorhizobium sp. L38 92 16S ... 807 0.0

[gil46389592|embl|X68388.2](#) Sinorhizobium terangae partial 16S rRN... 807 0.0

[gil38201469|embl|AJ301629.1](#) Sinorhizobium sp. BR816 partial 16S ... 807 0.0

[gil58294524|gb|AY875976.1](#) Sinorhizobium sp. ORS3180 16S ribosom... 807 0.0

[gil13872798|embl|AJ295073.1](#) Sinorhizobium terangae 16S rDNA gene... 807 0.0

#### LMG 8820

[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 745 0.0

[gil1895063|gb|U89824.1|RLU89824](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 745 0.0

[gil1895064|gb|U89825.1|RLU89825](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 745 0.0

[gil2801559|gb|AF041443.1](#) Rhizobium sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 745 0.0

[gil9255925|gb|AF282924.1|AF282924](#) Mesorhizobium sp. N36 16S ribo... 745 0.0

2. Resumo do relatório com os resultados contendo a identificação das seqüências 16S *rDNA* das estirpes obtidas pela direção reverse, valores de “score”, “e-value” e alinhamento das seqüências.

#### SEMIA 2002

[gil117582558|gb|EF035072.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 83482 16S riboso... 1003 0.0

[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 1001 0.0

[gil899453|gb|U28939.1|REU28939](#) Rhizobium etli TAL 182 16S riboso... 1001 0.0

[gil902059|gb|U29386.1|RLU29386](#) Rhizobium leguminosarum bv. vicia... 1001 0.0

[gil902061|gb|U29388.1|RLU29388](#) Rhizobium leguminosarum bv. phase... 1001 0.0

#### SEMIA 6158

[gil3724080|embl|Z94821.1|](#) Bradyrhizobium genosp. L 16S rDNA gene 997 0.0  
[gil5923809|gb|AF178437.1|AF178437](#) Bradyrhizobium sp. jwc91-2 16S... 997 0.0  
[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 997 0.0  
[gil11494002|gb|AF208512.1|AF208512](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 997 0.0  
[gil11494008|gb|AF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 997 0.0

## SEMIA 6319

[gil13959081|gb|AF363136.1|AF363136](#) Bradyrhizobium sp. MSDJ G17 1... 1370 0.0  
[gil19912805|dbj|AB072412.1|](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 1370 0.0  
[gil23380438|gb|AY148432.1|](#) Rhizobium sp. BA1 16S ribosomal RNA g... 1370 0.0  
[gil18874051|dbj|AB070563.1|](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 1370 0.0  
[gil18874052|dbj|AB070564.1|](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 1370 0.0

## SEMIA 6159

[gil56553420|gb|AY834756.1|](#) Rhodopseudomonas palustris strain 2c ... 944 0.0  
[gil20149127|gb|AF494092.1|](#) Burkholderia caryophylli strain YS13 ... 462 e-128  
[gil53774176|gb|AY741354.1|](#) Burkholderia cepacia strain ATCC 5379... 462 e-128  
[gil109942149|embl|AM184283.1|](#) Burkholderia caryophylli partial 16... 462 e-128  
[gil110451858|gb|DQ674859.1|](#) Rhizobium sp. CCNWYC119 16S ribosoma... 462 e-128

## SEMIA 6161

[gil9789561|gb|AF285963.1|AF285963](#) Sinorhizobium sp. S005 16S rib... 1088 0.0  
[gil59002519|gb|AY904763.1|](#) Sinorhizobium sp. SEMIA 6161 16S ribo... 1088 0.0  
[gil13872802|embl|AJ295077.1|](#) Sinorhizobium sp. ORS1236 16S rDNA g... 1084 0.0  
[gil46389593|embl|X68390.2|](#) Sinorhizobium saheli partial 16S rDNA ... 1080 0.0  
[gil13872801|embl|AJ295076.1|](#) Sinorhizobium sp. ORS1231 16S rDNA g... 1080 0.0

## SEMIA 6168

[gil26024186|gb|AF260274.2|](#) Rhizobium tropici strain SEMIA 4080 1... 997 0.0  
[gil117958353|gb|EF054892.1|](#) Rhizobium tropici clone H53 16S ribo... 997 0.0  
[gil59002809|gb|AY904776.1|](#) Rhizobium sp. SEMIA 6383 16S ribosoma... 989 0.0  
[gil28628872|gb|AF484602.1|](#) Rhizobium sp. 28c 16S ribosomal RNA g... 987 0.0  
[gil26024187|gb|AF260275.2|](#) Rhizobium tropici strain PRF54 16S ri... 983 0.0

## SEMIA 6169

[gil6063388|gb|AF054930.2|AF054930](#) Rhizobium sp. XJ96060 16S ribo... 527 e-147  
[gil14009376|embl|AJ300187.1|](#) Sinorhizobium sp. ORS1873 16S rDNA g... 527 e-147

[gil16416322|emblAJ417086.1|](#) Sinorhizobium sp. Rch-9868 partial 1... 527 e-147  
[gil16416324|emblAJ417088.1|](#) Sinorhizobium sp. Rch-9813 partial 1... 527 e-147  
[gil28543667|gb|AY196962.1|](#) Sinorhizobium meliloti strain GVPV12 ... 527 e-147

## SEMIA 6192

[gil1572650|gb|U69637.1|BLU69637](#) Bradyrhizobium lupini 16S riboso... 831 0.0  
[gil28849768|gb|AF514798.1|](#) Bradyrhizobium sp. ORS206 16S ribosom... 831 0.0  
[gil59002724|gb|AY904772.1|](#) Bradyrhizobium japonicum strain SEMIA... 831 0.0  
[gil11493995|gb|AF208505.1|AF208505](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 827 0.0  
[gil19912812|dbj|AB072419.1|](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 827 0.0

## SEMIA 6209

[gil12830853|gb|AF321212.1|AF321212](#) Bradyrhizobium sp. strain Ec3... 890 0.0  
[gil12830854|gb|AF321213.1|AF321213](#) Bradyrhizobium sp. strain Rp2... 890 0.0  
[gil51572645|gb|AY691403.1|](#) Bradyrhizobium sp. tpar1.2 16S riboso... 890 0.0  
[gil38201216|emblAJ303087.1|](#) Bradyrhizobium sp. STM259 partial 16... 890 0.0  
[gil32966027|gb|AY329631.1|](#) Bradyrhizobium sp. Dr4a.7 16S ribosom... 890 0.0

## SEMIA 103

[gil1196895|gb|L39882.1|SNORDNA](#) Sinorhizobium sp. ribosomal RNA (... 1296 0.0  
[gil59001709|gb|AY904726.1|](#) Sinorhizobium meliloti strain SEMIA 1... 1296 0.0  
[gil110002852|emblAM181746.1|](#) Sinorhizobium medicae partial 16S r... 1296 0.0  
[gil110002860|emblAM181754.1|](#) Sinorhizobium medicae partial 16S r... 1296 0.0  
[gil90568984|gb|DQ423247.1|](#) Sinorhizobium medicae strain M7 16S r... 1296 0.0

## SEMIA 344

[gil902059|gb|U29386.1|RLU29386](#) Rhizobium leguminosarum bv. vicia... 1328 0.0  
[gil40891555|gb|AY509900.1|](#) Rhizobium leguminosarum strain ATCC 1... 1320 0.0  
[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 1318 0.0  
[gil1895064|gb|U89825.1|RLU89825](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 1318 0.0  
[gil2801559|gb|AF041443.1|](#) Rhizobium sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 1318 0.0

## SEMIA 6070

[gil40737816|gb|AY507969.1|](#) Bradyrhizobium sp. AM37 16S ribosomal... 599 e-169  
[gil121584165|gb|EF173322.1|](#) Sinorhizobium sp. MKI8 16S ribosomal... 480 e-133  
[gil118420583|emblAM412315.1|](#) Burkholderia cepacia partial 16S rR... 448 e-124  
[gil28865694|emblAJ548823.1|](#) Candidatus devosia euplotis partial ... 331 1e-88

[gil28865695|embl|AJ548824.1|](#) Candidatus devosia euplotis partial ... 331 1e-88

#### SEMIA 6145

[gil16033706|gb|AF417550.1|AF417550](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1219 0.0

[gil11493995|gb|AF208505.1|AF208505](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1217 0.0

[gil19912812|dbj|AB072419.1|](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 1217 0.0

[gil19912813|dbj|AB072420.1|](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 1217 0.0

[gil31323813|gb|AF510581.1|](#) Bradyrhizobium sp. Gln-7 16S ribosoma... 1217 0.0

#### SEMIA 6152

[gil3724077|embl|Z94816.1|](#) Bradyrhizobium genosp. H 16S rDNA gene 1368 0.0

[gil11494005|gb|AF208515.1|AF208515](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1368 0.0

[gil13959071|gb|AF363126.1|AF363126](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1368 0.0

[gil19912806|dbj|AB072413.1|](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 1368 0.0

[gil19912807|dbj|AB072414.1|](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 1368 0.0

#### SEMIA 6153

[gil8133105|gb|AF268072.1|AF268072](#) Sinorhizobium sp. 15C-4 16S ri... 1354 0.0

[gil15147887|gb|AF250353.1|](#) Sinorhizobium xinjiangensis strain Rx... 1354 0.0

[gil15147889|gb|AF250355.1|](#) Sinorhizobium xinjiangensis strain CC... 1354 0.0

[gil23380440|gb|AY148434.1|](#) Rhizobium sp. JH1 16S ribosomal RNA g... 1354 0.0

[gil30144672|gb|AY260144.1|](#) Sinorhizobium fredii strain HH003 16S... 1354 0.0

#### SEMIA 6154

[gil21361022|gb|AF514704.1|](#) Bradyrhizobium sp. Pp3a-10 16S riboso... 1427 0.0

[gil32966026|gb|AY329630.1|](#) Bradyrhizobium sp. Pp3a.1 16S ribosom... 1427 0.0

[gil12830855|gb|AF321214.1|AF321214](#) Bradyrhizobium sp. strain Da3... 1419 0.0

[gil69219220|gb|DQ100059.1|](#) Bradyrhizobium sp. CCBAU 61178 16S ri... 1415 0.0

[gil11493995|gb|AF208505.1|AF208505](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1411 0.0

#### SEMIA 4077

[gil21898743|gb|AY117623.1|](#) Rhizobium tropici strain PRF34 16S ri... 1128 0.0

[gil27261750|gb|AY166841.1|](#) Rhizobium tropici UPRM8033 16S riboso... 1128 0.0

[gil109706853|gb|DQ648576.1|](#) Rhizobium tropici strain UPRM 8021 1... 1128 0.0

[gil117958350|gb|EF054889.1|](#) Rhizobium tropici clone H12 16S ribo... 1128 0.0

[gil11795835|gb|EF054890.1|](#) *Rhizobium tropici* clone H20 16S ribo... 1128 0.0

#### SEMIA 135

[gil6063388|gb|AF054930.2|AF054930](#) *Rhizobium* sp. XJ96060 16S ribo... 1405 0.0  
[gil14009376|embl|AJ300187.1|](#) *Sinorhizobium* sp. ORS1873 16S rDNA g... 1405 0.0  
[gil28543667|gb|AY196962.1|](#) *Sinorhizobium meliloti* strain GVPV12 ... 1405 0.0  
[gil46389636|embl|X67222.2|](#) *Sinorhizobium meliloti* partial 16S rRN... 1405 0.0  
[gil30407155|embl|AL591688.1|SME591688](#) *Sinorhizobium meliloti* 1021... 1405 0.0

#### SEMIA 265

[gil117582558|gb|EF035072.1|](#) *Rhizobium* sp. CCBAU 83482 16S riboso... 1245 0.0  
[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) *Rhizobium leguminosarum* bv. trif... 1241 0.0  
[gil1895064|gb|U89825.1|RLU89825](#) *Rhizobium leguminosarum* bv. vici... 1241 0.0  
[gil2801559|gb|AF041443.1|](#) *Rhizobium* sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 1241 0.0  
[gil9255925|gb|AF282924.1|AF282924](#) *Mesorhizobium* sp. N36 16S ribo... 1241 0.0

#### SEMIA 384

[gil1895068|gb|U89829.1|RLU89829](#) *Rhizobium leguminosarum* bv. vici... 1082 0.0  
[gil29122900|gb|AY210704.1|](#) *Rhizobium* sp. Ad2 16S ribosomal RNA g... 1082 0.0  
[gil29122903|gb|AY210707.1|](#) *Rhizobium* sp. Am4-4 16S ribosomal RNA... 1082 0.0  
[gil29122908|gb|AY210712.1|](#) *Rhizobium* sp. Dz6-4 16S ribosomal RNA... 1082 0.0  
[gil46361661|gb|AY500265.1|](#) *Rhizobium* sp. ORS 1462 16S ribosomal ... 1082 0.0

#### SEMIA 388

[gil38046141|gb|AY437439.1|](#) Uncultured *Bradyrhizobium* sp. isolate... 979 0.0  
[gil45548929|gb|AY491082.1|](#) *Bradyrhizobium* sp. ICMP 14753 16S rib... 979 0.0  
[gil3724077|embl|Z94816.1|](#) *Bradyrhizobium* genosp. H 16S rDNA gene 975 0.0  
[gil5923806|gb|AF178434.1|AF178434](#) *Bradyrhizobium* sp. ApB16 16S r... 975 0.0  
[gil11494004|gb|AF208514.1|AF208514](#) *Bradyrhizobium japonicum* stra... 975 0.0

#### SEMIA 396

[gil16416318|embl|AJ417082.1|](#) *Mesorhizobium* sp. Rch-981 partial 16... 1417 0.0  
[gil16416320|embl|AJ417084.1|](#) *Mesorhizobium* sp. Rch-7B partial 16S... 1417 0.0  
[gil59001816|gb|AY904731.1|](#) *Mesorhizobium ciceri* strain SEMIA 396... 1417 0.0  
[gil1236670|gb|U50167.1|RSU50167](#) *Rhizobium* sp. CJ2 16S ribosomal ... 1415 0.0  
[gil780370|gb|U07934.1|RCU07934](#) *Rhizobium ciceri* 16S ribosomal RN... 1409 0.0

#### SEMIA 587

[gil11494000|gblAF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1398 0.0  
[gil11494002|gblAF208512.1|AF208512](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1398 0.0  
[gil11494008|gblAF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1398 0.0  
[gil12830856|gblAF321215.1|AF321215](#) Bradyrhizobium sp. strain Cj3... 1398 0.0  
[gil11321087|gblAF293373.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 10... 1398 0.0

## SEMIA 3007

[gil1463031|gblU31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 1243 0.0  
[gil1895064|gblU89825.1|RLU89825](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 1243 0.0  
[gil2801559|gblAF041443.1](#) Rhizobium sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 1243 0.0  
[gil9255925|gblAF282924.1|AF282924](#) Mesorhizobium sp. N36 16S ribo... 1243 0.0  
[gil12667223|gblAF313904.1|AF313904](#) Rhizobium etli strain CIAT151... 1243 0.0

## SEMIA 3012

[gil16416321|emblAJ417085.1](#) Mesorhizobium sp. Rch-984 partial 16... 1386 0.0  
[gil16416327|emblAJ417091.1](#) Mesorhizobium sp. Rch-9865 partial 1... 1386 0.0  
[gil24251135|gblAY141983.1](#) Mesorhizobium sp. SH2851 16S ribosoma... 1386 0.0  
[gil110002851|emblAM181745.1](#) Mesorhizobium mediterraneum partial... 1386 0.0  
[gil1050333|gblL38825.1|RHMRGD](#) Rhizobium mediterraneum 16S riboso... 1378 0.0

## SEMIA 3025

[gil1463031|gblU31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 1291 0.0  
[gil1895064|gblU89825.1|RLU89825](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 1291 0.0  
[gil2801559|gblAF041443.1](#) Rhizobium sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 1291 0.0  
[gil9255925|gblAF282924.1|AF282924](#) Mesorhizobium sp. N36 16S ribo... 1291 0.0  
[gil12667223|gblAF313904.1|AF313904](#) Rhizobium etli strain CIAT151... 1291 0.0

## SEMIA 3026

[gil118420583|emblAM412315.1](#) Burkholderia cepacia partial 16S rR... 724 0.0  
[gil121584165|gblEF173322.1](#) Sinorhizobium sp. MKI8 16S ribosomal... 515 e-144  
[gil40737816|gblAY507969.1](#) Bradyrhizobium sp. AM37 16S ribosomal... 440 e-121  
[gil1143912|gblU28505.1|AVU28505](#) Agrobacterium vitis ribosomal RN... 373 e-101  
[gil1263039|gblU45329.1|AVU45329](#) Agrobacterium vitis ribosomal op... 373 e-101

## SEMIA 4080

[gil3724150|emblZ94806.1](#) Rhizobium genosp. Q 16S rDNA gene 1394 0.0  
[gil9837365|gblAF286362.1](#) Rhizobium sp. PRY71 16S ribosomal RNA ... 1394 0.0

[gil9837366|gb|AF286363.1|](#) Rhizobium sp. PRY73 16S ribosomal RNA ... 1394 0.0

[gil51988929|gb|AY626390.1|](#) Agrobacterium rhizogenes strain ICMP ... 1394 0.0

[gil45686236|gb|AY490118.1|](#) Rhizobium sp. lebia-1 16S ribosomal R... 1394 0.0

#### SEMIA 5019

[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1459 0.0

[gil11494002|gb|AF208512.1|AF208512](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1459 0.0

[gil11494008|gb|AF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1459 0.0

[gil13959057|gb|AF363116.1|AF363116](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1459 0.0

[gil13959063|gb|AF363122.1|AF363122](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1459 0.0

#### SEMIA 5079

[gil13959056|gb|AF363115.1|AF363115](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1253 0.0

[gil9087296|gb|AF236086.2|AF236086](#) Bradyrhizobium japonicum strai... 1249 0.0

[gil13959064|gb|AF363123.1|AF363123](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1249 0.0

[gil16024924|gb|AY050540.1|](#) Bradyrhizobium japonicum strain MSDJ ... 1249 0.0

[gil11321091|gb|AF293377.1|](#) Bradyrhizobium japonicum strain USDA ... 1249 0.0

#### SEMIA 5080

[gil11493993|gb|AF208503.1|AF208503](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1201 0.0

[gil11493996|gb|AF208506.1|AF208506](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1201 0.0

[gil11493997|gb|AF208507.1|AF208507](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1201 0.0

[gil11494007|gb|AF208517.1|AF208517](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1201 0.0

[gil11321095|gb|AF293381.1|](#) Bradyrhizobium japonicum strain USDA ... 1201 0.0

#### SEMIA 656

[gil59002205|gb|AY904748.1|](#) Bradyrhizobium elkanii strain SEMIA 6... 807 0.0

[gil77456200|gb|DQ222225.1|](#) Bradyrhizobium sp. CCBAU 23151 16S ri... 801 0.0

[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 799 0.0

[gil11494002|gb|AF208512.1|AF208512](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 799 0.0

[gil11494008|gb|AF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 799 0.0

#### SEMIA 662

[gil563848|embl|X70402.1|](#) Bradyrhizobium spec. (LMG 9520) gene for... 1223 0.0

[gil563849|embl|X70403.1|](#) Bradyrhizobium spec. (LMG 9966) gene for... 1223 0.0

[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1217 0.0

[gil11494002|gblAF208512.1|AF208512](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1217 0.0  
[gil11494008|gblAF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1217 0.0

## SEMIA 695

[gil11494000|gblAF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 874 0.0  
[gil11494002|gblAF208512.1|AF208512](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 874 0.0  
[gil11494008|gblAF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 874 0.0  
[gil13959057|gblAF363116.1|AF363116](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 874 0.0  
[gil13959063|gblAF363122.1|AF363122](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 874 0.0

## SEMIA 806

[gil3114862|lemb|Y14159.1](#) Mesorhizobium loti 16S rDNA gene, strai... 1263 0.0  
[gil3114863|lemb|Y14160.1](#) Mesorhizobium loti 16S rDNA gene, strai... 1263 0.0  
[gil2801560|gblAF041444.1](#) Mesorhizobium sp. 'SH 15003' 16S ribos... 1263 0.0  
[gil9255929|gblAF282928.1|AF282928](#) Mesorhizobium sp. USDA 3466 16... 1263 0.0  
[gil17932835|lemb|AJ315352.1](#) Mesorhizobium loti 16S rDNA gene, st... 1263 0.0

## SEMIA 816

[gil3114862|lemb|Y14159.1](#) Mesorhizobium loti 16S rDNA gene, strai... 1088 0.0  
[gil3114863|lemb|Y14160.1](#) Mesorhizobium loti 16S rDNA gene, strai... 1088 0.0  
[gil3724151|lemb|Z94807.1](#) Mesorhizobium genosp. T 16S rDNA gene 1088 0.0  
[gil2801560|gblAF041444.1](#) Mesorhizobium sp. 'SH 15003' 16S ribos... 1088 0.0  
[gil9255929|gblAF282928.1|AF282928](#) Mesorhizobium sp. USDA 3466 16... 1088 0.0

## SEMIA 830

[gil3114862|lemb|Y14159.1](#) Mesorhizobium loti 16S rDNA gene, strai... 866 0.0  
[gil3114863|lemb|Y14160.1](#) Mesorhizobium loti 16S rDNA gene, strai... 866 0.0  
[gil3724151|lemb|Z94807.1](#) Mesorhizobium genosp. T 16S rDNA gene 866 0.0  
[gil2801560|gblAF041444.1](#) Mesorhizobium sp. 'SH 15003' 16S ribos... 866 0.0  
[gil9255929|gblAF282928.1|AF282928](#) Mesorhizobium sp. USDA 3466 16... 866 0.0

## SEMIA 928

[gil45548927|gblAY491080.1](#) Bradyrhizobium sp. ICMP 12674 16S rib... 1219 0.0  
[gil45548939|gblAY491092.1](#) Bradyrhizobium sp. ICMP 14320 16S rib... 1219 0.0  
[gil46399151|gblAY577427.1](#) Bradyrhizobium canariense 16S ribosom... 1219 0.0  
[gil97955066|lemb|AJ810374.1](#) Bradyrhizobium genosp. AD 16S rDNA g... 1219 0.0  
[gil85740453|gblDQ354605.1](#) Bradyrhizobium sp. DcE2.8 16S ribosom... 1219 0.0

## SEMIA 929

[gil9087296|gb|AF236086.2|AF236086](#) Bradyrhizobium japonicum strai... 1207 0.0  
[gil16024924|gb|AY050540.1](#) Bradyrhizobium japonicum strain MSDJ ... 1207 0.0  
[gil11321091|gb|AF293377.1](#) Bradyrhizobium japonicum strain USDA ... 1207 0.0  
[gil11321092|gb|AF293378.1](#) Bradyrhizobium japonicum strain USDA ... 1207 0.0  
[gil9837364|gb|AF286361.1](#) Bradyrhizobium japonicum 16S ribosomal... 1207 0.0

## SEMIA 938

[gil13959056|gb|AF363115.1|AF363115](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1144 0.0  
[gil9087296|gb|AF236086.2|AF236086](#) Bradyrhizobium japonicum strai... 1138 0.0  
[gil13959064|gb|AF363123.1|AF363123](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1138 0.0  
[gil16024924|gb|AY050540.1](#) Bradyrhizobium japonicum strain MSDJ ... 1138 0.0  
[gil11321091|gb|AF293377.1](#) Bradyrhizobium japonicum strain USDA ... 1138 0.0

## SEMIA 6069

[gil3724150|emb|Z94806.1](#) Rhizobium genosp. Q 16S rDNA gene 1193 0.0  
[gil9837365|gb|AF286362.1](#) Rhizobium sp. PRY71 16S ribosomal RNA ... 1193 0.0  
[gil9837366|gb|AF286363.1](#) Rhizobium sp. PRY73 16S ribosomal RNA ... 1193 0.0  
[gil51988929|gb|AY626390.1](#) Agrobacterium rhizogenes strain ICMP ... 1193 0.0  
[gil51988930|gb|AY626391.1](#) Agrobacterium rhizogenes strain ICMP ... 1193 0.0

## SEMIA 6150

[gil56553420|gb|AY834756.1](#) Rhodopseudomonas palustris strain 2c ... 1213 0.0  
[gil83630169|gb|DQ303319.1](#) Uncultured Sinorhizobium sp. clone TM... 642 0.0  
[gil20149127|gb|AF494092.1](#) Burkholderia caryophylli strain YS13 ... 458 e-126  
[gil53774176|gb|AY741354.1](#) Burkholderia cepacia strain ATCC 5379... 458 e-126  
[gil109942149|emb|AM184283.1](#) Burkholderia caryophylli partial 16... 458 e-126

## SEMIA 6156

[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1316 0.0  
[gil11494002|gb|AF208512.1|AF208512](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1316 0.0  
[gil11494008|gb|AF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1316 0.0  
[gil12830856|gb|AF321215.1|AF321215](#) Bradyrhizobium sp. strain Cj3... 1316 0.0  
[gil11321087|gb|AF293373.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 10... 1316 0.0

## SEMIA 6157

[gil59002435|gb|AY904759.1|](#) Bradyrhizobium elkanii strain SEMIA 6... 1205 0.0  
[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1197 0.0  
[gil11494002|gb|AF208512.1|AF208512](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1197 0.0  
[gil11494008|gb|AF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1197 0.0  
[gil12830856|gb|AF321215.1|AF321215](#) Bradyrhizobium sp. strain Cj3... 1197 0.0

## SEMIA 6165

[gil55669134|gb|AY773196.1|](#) Burkholderia sp. BR3467 16S ribosomal... 1330 0.0  
[gil46909138|gb|AY533860.1|](#) Burkholderia sp. Br3454 16S ribosomal... 1330 0.0  
[gil58826584|gb|AY752951.1|](#) Burkholderia sp. PTK47 16S ribosomal ... 1330 0.0  
[gil58826599|gb|AY752952.1|](#) Burkholderia sp. PTU68 16S ribosomal ... 1330 0.0  
[gil58826648|gb|AY752955.1|](#) Burkholderia sp. PTK1 16S ribosomal R... 1330 0.0

## SEMIA 6175

[gil11494000|gb|AF208510.1|AF208510](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1181 0.0  
[gil11494002|gb|AF208512.1|AF208512](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1181 0.0  
[gil11494008|gb|AF208518.1|AF208518](#) Bradyrhizobium elkanii strain... 1181 0.0  
[gil12830856|gb|AF321215.1|AF321215](#) Bradyrhizobium sp. strain Cj3... 1181 0.0  
[gil11321087|gb|AF293373.1|](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 10... 1181 0.0

## SEMIA 6424

[gil118420583|emb|AM412315.1|](#) Burkholderia cepacia partial 16S rR... 761 0.0  
[gil121584165|gb|EF173322.1|](#) Sinorhizobium sp. MKI8 16S ribosomal... 525 e-147  
[gil32351725|gb|AY307924.1|](#) Aminobacter sp. COX 16S ribosomal RNA... 406 e-111  
[gil1261856|dbj|D49423.1|PSE16SRDNA](#) Pseudomonas riboflavina gene ... 400 e-109  
[gil56553501|gb|AY835643.1|](#) Agrobacterium tumefaciens 16S ribosom... 400 e-109

## SEMIA 2050

[gil117582558|gb|EF035072.1|](#) Rhizobium sp. CCBAU 83482 16S riboso... 864 0.0  
[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 862 0.0  
[gil899453|gb|U28939.1|REU28939](#) Rhizobium etli TAL 182 16S riboso... 862 0.0  
[gil902059|gb|U29386.1|RLU29386](#) Rhizobium leguminosarum bv. vicia... 862 0.0  
[gil902061|gb|U29388.1|RLU29388](#) Rhizobium leguminosarum bv. phase... 862 0.0

## SEMIA 6144

[gil11493995|gb|AF208505.1|AF208505](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 1094 0.0

[gil19912812|dbj|AB072419.1](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 1094 0.0  
[gil19912813|dbj|AB072420.1](#) Bradyrhizobium japonicum gene for 16... 1094 0.0  
[gil31323813|gb|AF510581.1](#) Bradyrhizobium sp. Gln-7 16S ribosoma... 1094 0.0  
[gil59002102|gb|AY904743.1](#) Bradyrhizobium japonicum strain SEMIA... 1094 0.0

## SEMIA 6146

[gil56553420|gb|AY834756.1](#) Rhodopseudomonas palustris strain 2c ... 714 0.0  
[gil83630169|gb|DQ303319.1](#) Uncultured Sinorhizobium sp. clone TM... 519 e-145  
[gil20149127|gb|AF494092.1](#) Burkholderia caryophylli strain YS13 ... 329 6e-88  
[gil53774176|gb|AY741354.1](#) Burkholderia cepacia strain ATCC 5379... 329 6e-88  
[gil56684772|gb|AY839565.1](#) Burkholderia sp. CCBAU23014 16S ribos... 329 6e-88

## SEMIA 6162

[gil9789561|gb|AF285963.1|AF285963](#) Sinorhizobium sp. S005 16S rib... 1112 0.0  
[gil59002519|gb|AY904763.1](#) Sinorhizobium sp. SEMIA 6161 16S ribo... 1110 0.0  
[gil13872802|embl|AJ295077.1](#) Sinorhizobium sp. ORS1236 16S rDNA g... 1108 0.0  
[gil46389593|embl|X68390.2](#) Sinorhizobium saheli partial 16S rDNA ... 1104 0.0  
[gil13872801|embl|AJ295076.1](#) Sinorhizobium sp. ORS1231 16S rDNA g... 1104 0.0

## SEMIA 2051

[gb|U29386.1|RLU29386](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 1423 0.0  
[gb|EF549395.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 83517 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1364 0.0  
[gb|EF035072.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 83482 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1392 0.0  
[gb|EF549393.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 83514 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1358 0.0  
[gb|EF549390.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 83530 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1373 0.0

## LMG 18254

[gb|EF100525.1|](#) Rhizobium sp. STM 4029 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1066 0.0

[gb|EF638791.1|](#) Rhizobium sp. LAR-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1522 0.0

[gb|EF638790.1|](#) Rhizobium sp. LAR-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1497 0.0

[gb|EF638788.1|](#) Rhizobium sp. LAR-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1485 0.0

[gb|AF285965.1|AF285965](#) Sinorhizobium sp. S009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1506 0.0

## LMG 18864

[gb|CP000738.1|](#)  Sinorhizobium medicae WSM419, complete genome Length=3781904 0.0

[gb|EF201801.1|](#) Sinorhizobium medicae isolate RPA20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1479 0.0

[gb|EF201800.1|](#) Sinorhizobium medicae isolate RPA18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1479 0.0

[gb|EF201799.1|](#) Sinorhizobium medicae isolate RPA11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1479 0.0

## LMG 18977

[gb|EF525232.1|](#) Rhizobium leguminosarum strain PB194 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1402 0.0

[gb|EF525214.1|](#) Rhizobium leguminosarum strain PB131 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1402 0.0

[gb|AY946012.1|](#) Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli strain RRE6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1457 0.0

[gb|U29388.1|RLU29388](#) Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1458 0.0

## LMG 11875

[gil3387374|emb|Y17047.1|](#) Allorhizobium undicola 16S rDNA gene 791 0.0

[gil109706855|gb|DQ648578.1|](#) Rhizobium undicola strain Liujia-1 1... 775 0.0

[gil109706856|gb|DQ648579.1|](#) Rhizobium undicola strain Liujia-81 ... 775 0.0

[gil51988937|gb|AY626398.1|](#) Agrobacterium vitis strain ICMP 10753... 735 0.0

[gil51988938|gb|AY626399.1|](#) Agrobacterium vitis strain ICMP 10756... 735 0.0

## LMG 17827

[gil86279771|gb|CP000133.1|](#) Rhizobium etli CFN 42, complete genome 981 0.0

[gil86355669|reflNC\\_007761.1|](#) Rhizobium etli CFN 42, complete genome 981 0.0  
[gil89242671|gb|DQ406696.1|](#) Rhizobium etli strain RP218 16S ribos... 981 0.0  
[gil89242680|gb|DQ406705.1|](#) Rhizobium etli strain RP346 16S ribos... 981 0.0  
[gil109706852|gb|DQ648575.1|](#) Rhizobium etli bv. mimosae strain Mi... 981 0.0

#### LMG 6138

[gil9087296|gb|AF236086.2|AF236086](#) Bradyrhizobium japonicum strai... 952 0.0  
[gil13959056|gb|AF363115.1|AF363115](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 952 0.0  
[gil13959064|gb|AF363123.1|AF363123](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 952 0.0  
[gil13959070|gb|AF363125.1|AF363125](#) Bradyrhizobium japonicum stra... 952 0.0  
[gil16024924|gb|AY050540.1|](#) Bradyrhizobium japonicum strain MSDJ ... 952 0.0

#### LMG 6217

[gil56553501|gb|AY835643.1|](#) Agrobacterium tumefaciens 16S ribosom... 323 4e-86  
[gil89953755|gb|DQ419571.1|](#) Rhizobium sp. As-3 16S ribosomal RNA ... 289 5e-76  
[gil89953753|gb|DQ419569.1|](#) Rhizobium sp. As-1 16S ribosomal RNA ... 287 2e-75  
[gil89953756|gb|DQ419572.1|](#) Agrobacterium sp. Ag-1 16S ribosomal ... 287 2e-75  
[gil118420583|embl|AM412315.1|](#) Burkholderia cepacia partial 16S rR... 287 2e-75

#### LMG 6465

[gil1313917|embl|X94200.1|](#) A.caulinodans 16S ribosomal RNA 793 0.0  
[gil870816|dbj|D13948.1|RHARDNA](#) Azorhizobium caulinodans 16S rDNA... 779 0.0  
[gil296406|embl|X67221.1|](#) Azorhizobium caulinodans partial 16S rRN... 777 0.0  
[gil464201|dbj|D11342.1|RHA16SRDA](#) Azorhizobium caulinodans gene f... 777 0.0  
[gil31580809|gb|AY301011.1|](#) Azorhizobium sp. F1 16S ribosomal RNA... 722 0.0

#### LMG 7834

[gil14029731|gb|AF364853.1|AF364853](#) Sinorhizobium sp. L38 92 16S ... 904 0.0  
[gil46389592|embl|X68388.2|](#) Sinorhizobium terangae partial 16S rRN... 904 0.0  
[gil38201469|embl|AJ301629.1|](#) Sinorhizobium sp. BR816 partial 16S ... 904 0.0  
[gil13872798|embl|AJ295073.1|](#) Sinorhizobium terangae 16S rDNA gene... 904 0.0  
[gil13872799|embl|AJ295074.1|](#) Sinorhizobium terangae 16S rDNA gene... 904 0.0

#### LMG 8820

[gil62912117|gb|AY999325.1|](#) Rhizobium etli strain KJ2 16S ribosom... 680 0.0  
[gil62912125|gb|AY999333.1|](#) Rhizobium leguminosarum strain KB11 1... 680 0.0  
[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 674 0.0

[gil1895063|gb|U89824.1|RLU89824](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 674 0.0

[gil1895064|gb|U89825.1|RLU89825](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 674 0.0

#### LMG 11892

[gil55166749|dbj|AB167207.1](#) Sinorhizobium sp. c37 gene for 16S r... 345 1e-92

[gil1196895|gb|L39882.1|SNORDNA](#) Sinorhizobium sp. ribosomal RNA (... 339 6e-91

[gil6319184|gb|AF195069.1|AF195069](#) Rhizobium sp. N220 16S ribosom... 339 6e-91

[gil3549138|gb|AF084540.1|AF084540](#) Sinorhizobium meliloti strain ... 339 6e-91

[gil1707847|emb|Z78204.1](#) Sinorhizobium sp. 16S rDNA gene, strain... 339 6e-91

#### LMG 14107

[gil3724151|emb|Z94807.1](#) Mesorhizobium genosp. T 16S rDNA gene 1255 0.0

[gil3724153|emb|Z94819.1](#) Mesorhizobium genosp. U 16S rDNA gene 1255 0.0

[gil45686224|gb|AY490106.1](#) Mesorhizobium sp. rops-6 16S ribosoma... 1255 0.0

[gil45686225|gb|AY490107.1](#) Mesorhizobium sp. rops-5 16S ribosoma... 1255 0.0

[gil3114862|emb|Y14159.1](#) Mesorhizobium loti 16S rDNA gene, strai... 1247 0.0

#### LMG 14919

[gil110002844|emb|AM181738.1](#) Sinorhizobium arboris partial 16S r... 1181 0.0

[gil110002850|emb|AM181744.1](#) Sinorhizobium arboris partial 16S r... 1181 0.0

[gil1707847|emb|Z78204.1](#) Sinorhizobium sp. 16S rDNA gene, strain... 1174 0.0

[gil30144675|gb|AY260147.1](#) Rhizobium sp. NGR234 16S ribosomal RN... 1174 0.0

[gil38201468|emb|AJ301628.1](#) Sinorhizobium sp. NGR234 partial 16S... 1174 0.0

#### LMG14989

[gil24414629|gb|AY161164.1](#) Rhizobium etli 16S ribosomal RNA gene... 549 e-154

[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 547 e-153

[gil1197851|gb|U47303.1|REU47303](#) Rhizobium etli 16S ribosomal RNA... 547 e-153

[gil1839225|gb|U86343.1|RGU86343](#) Rhizobium gallicum 16S ribosomal... 547 e-153

[gil899446|gb|U28916.1|REU28916](#) Rhizobium etli CFN 42 16S ribosom... 547 e-153

#### LMG 17148

[gil1050333|gb|L38825.1|RHMRGD](#) Rhizobium mediterraneum 16S riboso... 1241 0.0

[gil16416321|emb|AJ417085.1](#) Mesorhizobium sp. Rch-984 partial 16... 1241 0.0

[gil16416327|emb|AJ417091.1](#) Mesorhizobium sp. Rch-9865 partial 1... 1241 0.0

[gil24251135|gb|AY141983.1](#) Mesorhizobium sp. SH2851 16S ribosoma... 1241 0.0

[gil110002851|emb|AM181745.1](#) Mesorhizobium mediterraneum partial... 1241 0.0

## LMG 19141

- [gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 1156 0.0  
[gil1895063|gb|U89824.1|RLU89824](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 1156 0.0  
[gil1895064|gb|U89825.1|RLU89825](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 1156 0.0  
[gil2801559|gb|AF041443.1](#) Rhizobium sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 1156 0.0  
[gil9255925|gb|AF282924.1|AF282924](#) Mesorhizobium sp. N36 16S ribo... 1156 0.0

## LMG 19592

- [gil118776434|gb|EF107504.1](#) Rhizobium sp. UMR7365 16S ribosomal ... 1271 0.0  
[gil24251138|gb|AY141986.1](#) Rhizobium sp. SH1718alt 16S ribosomal... 1263 0.0  
[gil27261752|gb|AY166844.1](#) Rhizobium gallicum UPRM8052 16S ribos... 1263 0.0  
[gil110002862|embl|AM181756.1](#) Rhizobium gallicum partial 16S rDNA... 1263 0.0  
[gil118776432|gb|EF107502.1](#) Rhizobium sp. UMR7360 16S ribosomal ... 1263 0.0

## H 152

- [gil62084747|gb|AY873982.1](#) Burkholderia sp. HOT13 16S ribosomal ... 1386 0.0  
[gil2290259|gb|U87785.1|AGU87785](#) Afipia genosp. 14 16S ribosomal ... 880 0.0  
[gil27805068|gb|AY177780.1](#) Uncultured Afipia sp. 16S ribosomal R... 880 0.0  
[gil97955094|embl|AJ810381.1](#) Rhizobium genosp. AK 16S rDNA gene, ... 749 0.0  
[gil82623076|gb|DQ280489.1](#) Rhizobium sp. HB8C1 16S ribosomal RNA... 741 0.0

## R 602

- [gil31323778|gb|AF511492.1](#) Rhizobium sp. Aei-5 16S ribosomal RNA... 1465 0.0  
[gil83630220|gb|DQ303370.1](#) Uncultured Rhizobium sp. clone TM4\_21... 1465 0.0  
[gil110002861|embl|AM181755.1](#) Rhizobium giardinii partial 16S rRN... 1465 0.0  
[gil69219337|gb|DQ100064.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 45226 16S ribosom... 1465 0.0  
[gil94962092|gb|DQ499513.1](#) Rhizobium sp. 3.5 16S ribosomal RNA g... 1465 0.0

## LMG 6133

- [gb|DQ974030.1](#) Uncultured bacterium clone FW6m16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Length=775 0.0  
[gb|AF468222.1](#) Sinorhizobium sp. 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1367 0.0  
[gb|EU234317.1](#) Uncultured bacterium clone D25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Length=1510 0.0  
[gb|EU050699.1](#) Uncultured Azospirillum sp. clone DQ312-25 16S ribosomal RNA gene, partial  
 sequence Length=1421 0.0

## LMG 6346

[gb|EU256493.1](#) Staphylococcus pasteurii strain HN003 16S ribosomal RNA gene, complete sequence

Length=1541 0.0

[gb|DQ532139.1](#) Uncultured bacterium clone JPL1\_58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1515 0.0

[gb|DQ532139.1](#) Uncultured bacterium clone JPL1\_58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1515 0.0

## LMG 14904

[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 1209 0.0

[gil1895064|gb|U89825.1|RLU89825](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 1209 0.0

[gil2801559|gb|AF041443.1](#) Rhizobium sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 1209 0.0

[gil9255925|gb|AF282924.1|AF282924](#) Mesorhizobium sp. N36 16S ribo... 1209 0.0

[gil12667223|gb|AF313904.1|AF313904](#) Rhizobium etli strain CIAT151... 1209 0.0

3. Resumo do relatório com os resultados contendo a identificação das seqüências *nifH* das estirpes, valores de “score”, “e-value” e alinhamento das seqüências.

## SEMIA 116

[gil14523537|gb|AE007235.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 539 e-151

[gil25168258|gb|AE006469.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 539 e-151

[gil16262453|ref|NC\\_003037.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid... 539 e-151

[SMa0825](#) 539 e-151

[gil61191859|gb|AY934877.1](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 53044B nitrog... 535 e-150

## SEMIA 134

[gil14523537|gb|AE007235.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 611 e-172

[gil25168258|gb|AE006469.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 611 e-172

[gil61191859|gb|AY934877.1](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 53044B nitrog... 611 e-172

[gil16262453|ref|NC\\_003037.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid... 611 e-172

[gil89475635|gb|DQ413016.1](#) Sinorhizobium meliloti isolate RP254 ... 611 e-172

## SEMIA 135

[gil14523537|gb|AE007235.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 636 e-180

- [gil25168258|gb|AE006469.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 636 e-180  
[gil16262453|ref|NC\\_003037.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid... 636 e-180  
[SMa0825](#) 636 e-180  
[gil89475635|gb|DQ413016.1](#) Sinorhizobium meliloti isolate RP254 ... 632 e-179

## SEMIA 388

- [gil22163983|dbj|AB079620.1](#) Bradyrhizobium sp. MAFF 210318 nifH ... 289 5e-76  
[gil71725828|gb|DQ085617.1](#) Bradyrhizobium sp. LMTR 19 nitrogenas... 283 3e-74  
[gil71725826|gb|DQ085616.1](#) Bradyrhizobium sp. LMTR 3 nitrogenase... 276 7e-72  
[gil71725830|gb|DQ085618.1](#) Bradyrhizobium sp. LMTR 14 nitrogenas... 274 3e-71  
[gil71725832|gb|DQ085619.1](#) Bradyrhizobium sp. LMTR 21 nitrogenas... 274 3e-71

## SEMIA 587

- [gil108514315|gb|DQ485702.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain S 127 ... 620 e-175  
[gil110456190|gb|DQ485701.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain S 127 ... 620 e-175  
[gil51235165|gb|AY599091.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 46... 615 e-174  
[gil51235167|gb|AY599092.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 94... 615 e-174  
[gil30172216|dbj|AB094963.1](#) Bradyrhizobium elkanii nifH gene for... 605 e-171

## SEMIA 2051

- [gil46468|emb|X02478.1](#) Rhizobium trifolii (strain 843) repeated ... 462 e-128  
[gil152319|gb|K00490.1|RHMNIFHY](#) R.trifolii nitrogenase genes nifh... 410 e-112  
[gil121078475|gb|EF165535.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. trifolii... 410 e-112  
[gil121078437|gb|EF165526.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. trifolii... 392 e-107  
[gil2168746|dbj|E00463.1](#) RDS of rhizobium trifolii,RS-1(a)" 383 e-104

## SEMIA 3012

- [gil58042492|gb|AY318755.2](#) Mesorhizobium ciceri dinitrogenase re... 141 3e-31  
[gil20269078|emb|AJ457912.1](#) Mesorhizobium mediterraneum partial ... 141 3e-31  
[gil20269080|emb|AJ457913.1](#) Mesorhizobium ciceri partial nifH ge... 141 3e-31  
[gil20269082|emb|AJ457914.1](#) Mesorhizobium ciceri partial nifH ge... 141 3e-31  
[gil20269084|emb|AJ457915.1](#) Mesorhizobium ciceri partial nifH ge... 141 3e-31

## SEMIA 3025

- [gil89475633|gb|DQ413015.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae is... 529 e-148  
[gil115259115|embl|AM236084.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae ... 529 e-148  
[gil116254467|ref|NC\\_008381.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae... 529 e-148  
[pRL100162](#) 529 e-148  
[gil13776418|gb|AZ934358.1|AZ934358](#) BJ\_\_Ba0002C02r B. japonicum B... 404 e-110

## SEMIA 3026

- [gil14523537|gb|AE007235.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 611 e-172  
[gil25168258|gb|AE006469.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 611 e-172  
[gil61191859|gb|AY934877.1](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 53044B nitrog... 611 e-172  
[gil16262453|ref|NC\\_003037.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid... 611 e-172  
[gil89475635|gb|DQ413016.1](#) Sinorhizobium meliloti isolate RP254 ... 611 e-172

## SEMIA 4077

- [gil82659471|gb|DQ284983.1](#) Rhizobium sp. NCHA22 NifH (nifH) gene... 658 0.0  
[gil89475645|gb|DQ413021.1](#) Rhizobium tropici isolate RP261 NifH ... 656 0.0  
[gil38256849|embl|AJ505314.1](#) Rhizobium sp. TJ171 partial nifH gen... 591 e-166  
[gil38256847|embl|AJ505313.1](#) Rhizobium sp. TJ172 partial nifH gen... 555 e-156  
[gil14090815|gb|AF275670.1|AF275670](#) Sinorhizobium sp. GR-X8 nitro... 428 e-118

## SEMIA 4080

- [gil82659471|gb|DQ284983.1](#) Rhizobium sp. NCHA22 NifH (nifH) gene... 617 e-174  
[gil89475645|gb|DQ413021.1](#) Rhizobium tropici isolate RP261 NifH ... 613 e-173  
[gil38256849|embl|AJ505314.1](#) Rhizobium sp. TJ171 partial nifH gen... 545 e-153  
[gil38256847|embl|AJ505313.1](#) Rhizobium sp. TJ172 partial nifH gen... 505 e-141  
[gil14090815|gb|AF275670.1|AF275670](#) Sinorhizobium sp. GR-X8 nitro... 391 e-106

## SEMIA 5019

- [gil51235165|gb|AY599091.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 46... 634 e-180  
[gil51235167|gb|AY599092.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 94... 634 e-180  
[gil108514315|gb|DQ485702.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain S 127 ... 634 e-180

[gil110456190|gb|DQ485701.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* strain S 127 ... 634 e-180  
[gil30172216|dbj|AB094963.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* nifH gene for... 618 e-175

## SEMIA 5079

[gil12620417|gb|AH010242.1|SEG\\_AF322012S](#) *Bradyrhizobium japonicum*... 527 e-147  
[gil12620418|gb|AF322012.1|AF322012S1](#) *Bradyrhizobium japonicum* sy... 527 e-147  
[gil47457770|embl|AJ563961.1](#) *Bradyrhizobium japonicum* partial nif... 527 e-147  
[gil22163981|dbj|AB079619.1](#) *Bradyrhizobium japonicum* nifH gene f... 527 e-147  
[gil22212526|dbj|AB079690.1](#) *Bradyrhizobium japonicum* nifH gene f... 527 e-147

## SEMIA 5080

[gil12620417|gb|AH010242.1|SEG\\_AF322012S](#) *Bradyrhizobium japonicum*... 563 e-158  
[gil12620418|gb|AF322012.1|AF322012S1](#) *Bradyrhizobium japonicum* sy... 563 e-158  
[gil47457770|embl|AJ563961.1](#) *Bradyrhizobium japonicum* partial nif... 563 e-158  
[gil22163981|dbj|AB079619.1](#) *Bradyrhizobium japonicum* nifH gene f... 563 e-158  
[gil22212526|dbj|AB079690.1](#) *Bradyrhizobium japonicum* nifH gene f... 563 e-158

## SEMIA 6069

[gil82659471|gb|DQ284983.1](#) *Rhizobium* sp. NCHA22 NifH (nifH) gene... 377 e-102  
[gil89475645|gb|DQ413021.1](#) *Rhizobium tropici* isolate RP261 NifH ... 377 e-102  
[gil38256849|embl|AJ505314.1](#) *Rhizobium* sp. TJ171 partial nifH gen... 347 2e-93  
[gil38256847|embl|AJ505313.1](#) *Rhizobium* sp. TJ172 partial nifH gen... 313 3e-83  
[gil14090815|gb|AF275670.1|AF275670](#) *Sinorhizobium* sp. GR-X8 nitro... 289 5e-76

## SEMIA 6070

[gil82659471|gb|DQ284983.1](#) *Rhizobium* sp. NCHA22 NifH (nifH) gene... 285 8e-75  
[gil89475645|gb|DQ413021.1](#) *Rhizobium tropici* isolate RP261 NifH ... 285 8e-75  
[gil38256849|embl|AJ505314.1](#) *Rhizobium* sp. TJ171 partial nifH gen... 260 5e-67  
[gil14090815|gb|AF275670.1|AF275670](#) *Sinorhizobium* sp. GR-X8 nitro... 238 2e-60  
[gil14090817|gb|AF275671.1|AF275671](#) *Sinorhizobium* sp. GR-06 nitro... 238 2e-60

## SEMIA 6144

[gil113725780|gb|AATG01000001.1|](#) Sinorhizobium medicae WSM419 ctg... 656 0.0  
[gil113871108|ref|NZ\\_AATG01000001.1|](#) Sinorhizobium medicae WSM419... 656 0.0  
[gil61191848|gb|AY934874.1|](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 33036a nitrog... 646 0.0  
[gil14523537|gb|AE007235.1|](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 585 e-165  
[gil25168258|gb|AE006469.1|](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 585 e-165

## SEMIA 103

[gil61191848|gb|AY934874.1|](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 33036a nitrog... 618 e-175  
[gil113725780|gb|AATG01000001.1|](#) Sinorhizobium medicae WSM419 ctg... 613 e-173  
[gil113871108|ref|NZ\\_AATG01000001.1|](#) Sinorhizobium medicae WSM419... 613 e-173  
[gil14523537|gb|AE007235.1|](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 541 e-152  
[gil25168258|gb|AE006469.1|](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 541 e-152

## SEMIA 656

[gil61191831|gb|AY934869.1|](#) Rhizobium sp. CCBAU 23084 nitrogenase... 581 e-163  
[gil61191835|gb|AY934870.1|](#) Bradyrhizobium elkanii nitrogenase re... 581 e-163  
[gil30172216|dbj|AB094963.1|](#) Bradyrhizobium elkanii nifH gene for... 573 e-161  
[gil51235165|gb|AY599091.1|](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 46... 557 e-156  
[gil51235167|gb|AY599092.1|](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 94... 557 e-156

## SEMIA 806

[gil47118328|dbj|BA000012.4|](#) Mesorhizobium loti MAFF303099 DNA, c... 428 e-118  
[gil57165207|ref|NC\\_002678.2|](#) Mesorhizobium loti MAFF303099, comp... 428 e-118  
[mlr5905](#) 428 e-118  
[gil30407143|embl|AL672111.1|MLO672111|](#) Mesorhizobium loti R7A symb... 414 e-113  
[gil20804067|embl|AL672114.1|](#) Mesorhizobium loti R7A symbiosis isl... 414 e-113

## SEMIA 816

[gil47118328|dbj|BA000012.4|](#) Mesorhizobium loti MAFF303099 DNA, c... 519 e-145  
[gil57165207|ref|NC\\_002678.2|](#) Mesorhizobium loti MAFF303099, comp... 519 e-145  
[mlr5905](#) 519 e-145  
[gil30407143|embl|AL672111.1|MLO672111|](#) Mesorhizobium loti R7A symb... 511 e-143  
[gil20804067|embl|AL672114.1|](#) Mesorhizobium loti R7A symbiosis isl... 511 e-143

## SEMIA 830

[gil30407143|embl|AL672111.1|MLO672111|](#) Mesorhizobium loti R7A symb... 482 e-134

- [gil20804067|embl|AL672114.1](#) Mesorhizobium loti R7A symbiosis isl... 482 e-134  
[ML0303](#) NITROGENASE IRON PROTEIN NIFH 482 e-134  
[gil13778052|gb|AZ935396.1|AZ935396](#) BJ\_\_Ba0003B22f B. japonicum B... 476 e-132  
[gil13776418|gb|AZ934358.1|AZ934358](#) BJ\_\_Ba0002C02r B. japonicum B... 440 e-121

## SEMIA 928

- [gil38639273|gb|AY386783.1](#) Bradyrhizobium japonicum bv. genisteae... 603 e-170  
[gil51235169|gb|AY599093.1](#) Bradyrhizobium canariense bv. genisteae... 515 e-144  
[gil38639275|gb|AY386784.1](#) Bradyrhizobium japonicum bv. genisteae... 498 e-138  
[gil38639269|gb|AY386781.1](#) Bradyrhizobium genosp. alpha bv. geni... 490 e-136  
[gil38639277|gb|AY386785.1](#) Bradyrhizobium japonicum bv. genisteae... 482 e-134

## SEMIA 938

- [gil38639273|gb|AY386783.1](#) Bradyrhizobium japonicum bv. genisteae... 535 e-150  
[gil51235169|gb|AY599093.1](#) Bradyrhizobium canariense bv. genisteae... 464 e-128  
[gil38639269|gb|AY386781.1](#) Bradyrhizobium genosp. alpha bv. geni... 456 e-126  
[gil38639275|gb|AY386784.1](#) Bradyrhizobium japonicum bv. genisteae... 440 e-121  
[gil38639277|gb|AY386785.1](#) Bradyrhizobium japonicum bv. genisteae... 426 e-117  
[gil38639273|gb|AY386783.1](#) Bradyrhizobium japonicum bv. genisteae... 535 e-150  
[gil51235169|gb|AY599093.1](#) Bradyrhizobium canariense bv. genisteae... 464 e-128  
[gil38639269|gb|AY386781.1](#) Bradyrhizobium genosp. alpha bv. geni... 456 e-126  
[gil38639275|gb|AY386784.1](#) Bradyrhizobium japonicum bv. genisteae... 440 e-121  
[gil38639277|gb|AY386785.1](#) Bradyrhizobium japonicum bv. genisteae... 426 e-117

## SEMIA 2050

- [gil46468|embl|X02478.1](#) Rhizobium trifolii (strain 843) repeated ... 502 e-140  
[gil152319|gb|K00490.1|RHMNIFHY](#) R.trifolii nitrogenase genes nifh... 464 e-128  
[gil121078475|gb|EF165535.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. trifolii... 458 e-126  
[gil121078437|gb|EF165526.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. trifolii... 432 e-119  
[gil2168746|dbj|E00463.1](#) RDS of rhizobium trifolii,RS-1(a)" 420 e-115

## SEMIA 6145

- [gil30172216|dbj|AB094963.1](#) Bradyrhizobium elkanii nifH gene for... 646 0.0  
[gil51235165|gb|AY599091.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 46... 630 e-178  
[gil51235167|gb|AY599092.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 94... 630 e-178  
[gil108514315|gb|DQ485702.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain S 127 ... 630 e-178  
[gil110456190|gb|DQ485701.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain S 127 ... 630 e-178

## SEMIA 6146

- [gil119874242|gb|EF153399.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 3... 436 e-120
- [gil30172216|dbj|AB094963.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* nifH gene for... 311 1e-82
- [gil51235165|gb|AY599091.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 46... 311 1e-82
- [gil51235167|gb|AY599092.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 94... 311 1e-82
- [gil108514315|gb|DQ485702.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* strain S 127 ... 311 1e-82

## SEMIA 6150

- [gil71725834|gb|DQ085620.1](#) *Bradyrhizobium yuanmingense* strain LM... 256 7e-66
- [gil30172216|dbj|AB094963.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* nifH gene for... 254 3e-65
- [gil51235165|gb|AY599091.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 46... 254 3e-65
- [gil51235167|gb|AY599092.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 94... 254 3e-65
- [gil108514315|gb|DQ485702.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* strain S 127 ... 254 3e-65

## SEMIA 6152

- [gil13778052|gb|AZ935396.1|AZ935396](#) BJ\_\_Ba0003B22f *B. japonicum* B... 258 2e-66
- [gil13776418|gb|AZ934358.1|AZ934358](#) BJ\_\_Ba0002C02r *B. japonicum* B... 234 3e-59
- [gil22163983|dbj|AB079620.1](#) *Bradyrhizobium* sp. MAFF 210318 nifH ... 224 3e-56
- [gil13778449|gb|AZ935548.1|AZ935548](#) BJ\_\_Ba0003P16f *B. japonicum* B... 184 2e-44
- [gil83723066|gb|AAKL01000365.1](#) *Ralstonia solanacearum* UW551 Cont... 178 1e-42

## SEMIA 6153

- [gil84872505|gb|DQ333890.1](#) *Sinorhizobium meliloti* bv. mediterran... 480 e-133
- [gil14090815|gb|AF275670.1|AF275670](#) *Sinorhizobium* sp. GR-X8 nitro... 478 e-132
- [gil14090817|gb|AF275671.1|AF275671](#) *Sinorhizobium* sp. GR-06 nitro... 478 e-132
- [gil89475637|gb|DQ413017.1](#) *Rhizobium gallicum* bv. gallicum isola... 377 e-102
- [gil83699971|gb|DQ311093.1](#) *Mesorhizobium* sp. CCBAU 61158 nitroge... 375 e-101

## SEMIA 6154

- [gil22163983|dbj|AB079620.1](#) *Bradyrhizobium* sp. MAFF 210318 nifH ... 268 2e-69
- [gil22163973|dbj|AB079615.1](#) *Bradyrhizobium* sp. IRBG 2 nifH gene ... 234 3e-59
- [gil22163977|dbj|AB079617.1](#) *Bradyrhizobium* sp. IRBG 230 nifH gen... 234 3e-59
- [gil22163975|dbj|AB079616.1](#) *Bradyrhizobium* sp. IRBG 228 nifH gen... 226 6e-57
- [gil30172216|dbj|AB094963.1](#) *Bradyrhizobium elkanii* nifH gene for... 222 1e-55

## SEMIA 6157

- [gil119874242|gb|EF153399.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 3... 375 e-101
- [gil30172216|dbj|AB094963.1](#) Bradyrhizobium elkanii nifH gene for... 258 2e-66
- [gil51235165|gb|AY599091.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 46... 258 2e-66
- [gil51235167|gb|AY599092.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 94... 258 2e-66
- [gil61191831|gb|AY934869.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 23084 nitrogenase... 258 2e-66

## SEMIA 6158

- [gil119874242|gb|EF153399.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 3... 551 e-155
- [gil61191831|gb|AY934869.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 23084 nitrogenase... 373 e-101
- [gil61191835|gb|AY934870.1](#) Bradyrhizobium elkanii nitrogenase re... 373 e-101
- [gil30172216|dbj|AB094963.1](#) Bradyrhizobium elkanii nifH gene for... 365 1e-98
- [gil22255711|gb|AF484643.1](#) Bradyrhizobium sp. 2 nitrogenase iron... 359 7e-97

## SEMIA 6162

- [gil14090815|gb|AF275670.1|AF275670](#) Sinorhizobium sp. GR-X8 nitro... 438 e-121
- [gil14090817|gb|AF275671.1|AF275671](#) Sinorhizobium sp. GR-06 nitro... 438 e-121
- [gil84872505|gb|DQ333890.1](#) Sinorhizobium meliloti bv. mediterran... 438 e-121
- [gil83699971|gb|DQ311093.1](#) Mesorhizobium sp. CCBAU 61158 nitroge... 351 2e-94
- [gil89475637|gb|DQ413017.1](#) Rhizobium gallicum bv. gallicum isola... 345 1e-92

## SEMIA 6169

- [gil14523537|gb|AE007235.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 630 e-178
- [gil25168258|gb|AE006469.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 630 e-178
- [gil61191859|gb|AY934877.1](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 53044B nitrog... 630 e-178
- [gil16262453|ref|NC\\_003037.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid... 630 e-178
- [gil89475635|gb|DQ413016.1](#) Sinorhizobium meliloti isolate RP254 ... 630 e-178
- [SMa0825](#)

## SEMIA 6175

- [gil119874242|gb|EF153399.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 3... 474 e-131
- [gil22255711|gb|AF484643.1](#) Bradyrhizobium sp. 2 nitrogenase iron... 353 4e-95
- [gil22255713|gb|AF484644.1](#) Bradyrhizobium sp. 29d nitrogenase ir... 353 4e-95
- [gil22255710|gb|AF484642.1](#) Bradyrhizobium sp. 70a nitrogenase ir... 325 1e-86
- [gil22255709|gb|AF484641.1](#) Bradyrhizobium sp. 82a nitrogenase ir... 305 9e-81

## SEMIA 6192

- [gil13776418|gb|AZ934358.1|AZ934358](#) BJ\_\_Ba0002C02r B. japonicum B... 244 3e-62

[gil22163983|dbj|AB079620.1|](#) Bradyrhizobium sp. MAFF 210318 nifH ... 234 3e-59  
[gil13778052|gb|AZ935396.1|AZ935396](#) BJ\_\_Ba0003B22f B. japonicum B... 216 6e-54  
[gil13778449|gb|AZ935548.1|AZ935548](#) BJ\_\_Ba0003P16f B. japonicum B... 174 2e-41  
[gil119874236|gb|EF153396.1|](#) Bradyrhizobium elkanii strain CCBAU ... 170 3e-40

## SEMIA 6209

[gil13776418|gb|AZ934358.1|AZ934358](#) BJ\_\_Ba0002C02r B. japonicum B... 272 1e-70  
[gil13778052|gb|AZ935396.1|AZ935396](#) BJ\_\_Ba0003B22f B. japonicum B... 250 4e-64  
[gil22163983|dbj|AB079620.1|](#) Bradyrhizobium sp. MAFF 210318 nifH ... 222 1e-55  
[gil13778449|gb|AZ935548.1|AZ935548](#) BJ\_\_Ba0003P16f B. japonicum B... 220 4e-55  
[gil83750266|ref|NZ\\_AAKL01000365.1|](#) Ralstonia solanacearum UW551 ... 202 9e-50

## SEMIA 396

[gil20269080|emb|AJ457913.1|](#) Mesorhizobium ciceri partial nifH ge... 133 7e-29  
[gil20269082|emb|AJ457914.1|](#) Mesorhizobium ciceri partial nifH ge... 125 2e-26  
[gil20269084|emb|AJ457915.1|](#) Mesorhizobium ciceri partial nifH ge... 125 2e-26  
[gil20269086|emb|AJ457916.1|](#) Mesorhizobium mediterraneum partial ... 125 2e-26  
[gil20269090|emb|AJ457918.1|](#) Mesorhizobium ciceri partial nifH ge... 125 2e-26

## SEMIA 695

[gil22255691|gb|AF484631.1|](#) Bradyrhizobium sp. 125e nitrogenase i... 139 1e-30  
[gil22163983|dbj|AB079620.1|](#) Bradyrhizobium sp. MAFF 210318 nifH ... 133 8e-29  
[gil22255685|gb|AF484628.1|](#) Bradyrhizobium sp. 123b nitrogenase i... 131 3e-28  
[gil22255694|gb|AF484633.1|](#) Bradyrhizobium sp. 49b nitrogenase ir... 131 3e-28  
[gil22255696|gb|AF484634.1|](#) Bradyrhizobium sp. 48a nitrogenase ir... 131 3e-28

## SEMIA 6159

[gil119874242|gb|EF153399.1|](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 3... 297 2e-78  
[gil22255711|gb|AF484643.1|](#) Bradyrhizobium sp. 2 nitrogenase iron... 270 5e-70  
[gil22255713|gb|AF484644.1|](#) Bradyrhizobium sp. 29d nitrogenase ir... 270 5e-70  
[gil22255710|gb|AF484642.1|](#) Bradyrhizobium sp. 70a nitrogenase ir... 242 1e-61  
[gil22255709|gb|AF484641.1|](#) Bradyrhizobium sp. 82a nitrogenase ir... 222 1e-55

## SEMIA 6168

[gil38256849|emb|AJ505314.1|](#) Rhizobium sp. TJ171 partial nifH gen... 311 1e-82  
[gil82659471|gb|DQ284983.1|](#) Rhizobium sp. NCHA22 NifH (nifH) gene... 264 3e-68  
[gil89475645|gb|DQ413021.1|](#) Rhizobium tropici isolate RP261 NifH ... 264 3e-68

[gil38256847|embl|AJ505313.1](#) Rhizobium sp. TJ172 partial nifH gen... 232 1e-58  
[gil14090815|gb|AF275670.1|AF275670](#) Sinorhizobium sp. GR-X8 nitro... 188 1e-45

## SEMIA 662

[gil61191831|gb|AY934869.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 23084 nitrogenase... 408 e-112  
[gil61191835|gb|AY934870.1](#) Bradyrhizobium elkanii nitrogenase re... 408 e-112  
[gil30172216|dbj|AB094963.1](#) Bradyrhizobium elkanii nifH gene for... 392 e-107  
[gil108514315|gb|DQ485702.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain S 127 ... 377 e-102  
[gil110456190|gb|DQ485701.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain S 127 ... 377 e-102

## SEMIA 6156

[gil61191831|gb|AY934869.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 23084 nitrogenase... 513 e-143  
[gil61191835|gb|AY934870.1](#) Bradyrhizobium elkanii nitrogenase re... 513 e-143  
[gil30172216|dbj|AB094963.1](#) Bradyrhizobium elkanii nifH gene for... 498 e-138  
[gil51235165|gb|AY599091.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 46... 486 e-135  
[gil51235167|gb|AY599092.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 94... 486 e-135

## SEMIA 6319

[gil71725836|gb|DQ085621.1](#) Bradyrhizobium yuanmingense strain LM... 615 e-174  
[gil71725834|gb|DQ085620.1](#) Bradyrhizobium yuanmingense strain LM... 583 e-164  
[gil169749|gb|K00487.1|RHFNIFH](#) Rhizobium sp. ANU289 nitrogenase i... 369 e-100  
[gil30172216|dbj|AB094963.1](#) Bradyrhizobium elkanii nifH gene for... 349 6e-94  
[gil51235165|gb|AY599091.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 46... 343 4e-92

## SEMIA 6424

[gil13776418|gb|AZ934358.1|AZ934358](#) BJ\_\_Ba0002C02r B. japonicum B... 157 5e-36  
[gil13778052|gb|AZ935396.1|AZ935396](#) BJ\_\_Ba0003B22f B. japonicum B... 157 5e-36  
[gil13778449|gb|AZ935548.1|AZ935548](#) BJ\_\_Ba0003P16f B. japonicum B... 149 1e-33  
[gil119874242|gb|EF153399.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 3... 141 3e-31  
[gil22255711|gb|AF484643.1](#) Bradyrhizobium sp. 2 nitrogenase iron... 133 7e-29

## LMG 7834

[gil14090815|gb|AF275670.1|AF275670](#) Sinorhizobium sp. GR-X8 nitro... 311 1e-82  
[gil14090817|gb|AF275671.1|AF275671](#) Sinorhizobium sp. GR-06 nitro... 311 1e-82  
[gil38256849|embl|AJ505314.1](#) Rhizobium sp. TJ171 partial nifH gen... 311 1e-82  
[gil83699971|gb|DQ311093.1](#) Mesorhizobium sp. CCBAU 61158 nitroge... 293 3e-77

[gil152327|gb|M26961.1|RHMNIFKDH3](#) Rhizobium sp. nitrogenase struc... 289 5e-76

#### LMG 8819

[gil91798527|gb|CP000319.1](#) Nitrobacter hamburgensis X14, complet... 46 0.012

[gil92115633|ref|NC\\_007964.1](#) Nitrobacter hamburgensis X14, compl... 46 0.012

[gil47118328|dbj|BA000012.4](#) Mesorhizobium loti MAFF303099 DNA, c... 42 0.19

[gil57165207|ref|NC\\_002678.2](#) Mesorhizobium loti MAFF303099, comp... 42 0.19

[gil113725780|gb|AATG01000001.1](#) Sinorhizobium medicae WSM419 ctg... 42 0.19

#### LMG 14107

[gil82659471|gb|DQ284983.1](#) Rhizobium sp. NCHA22 NifH (nifH) gene... 256 7e-66

[gil89475645|gb|DQ413021.1](#) Rhizobium tropici isolate RP261 NifH ... 256 7e-66

[gil38256849|embl|AJ505314.1](#) Rhizobium sp. TJ171 partial nifH gen... 224 3e-56

[gil14090815|gb|AF275670.1|AF275670](#) Sinorhizobium sp. GR-X8 nitro... 202 1e-49

[gil14090817|gb|AF275671.1|AF275671](#) Sinorhizobium sp. GR-06 nitro... 202 1e-49

#### LMG 14904

[gil89475633|gb|DQ413015.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae is... 291 1e-76

[gil115259115|embl|AM236084.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae ... 291 1e-76

[gil116254467|ref|NC\\_008381.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae... 291 1e-76

[pRL100162](#) 291 1e-76

[gil61191852|gb|AY934875.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 33220a nitrogenas... 184 2e-44

#### LMG 19227

[gil14090815|gb|AF275670.1|AF275670](#) Sinorhizobium sp. GR-X8 nitro... 325 9e-87

[gil14090817|gb|AF275671.1|AF275671](#) Sinorhizobium sp. GR-06 nitro... 325 9e-87

[gil152327|gb|M26961.1|RHMNIFKDH3](#) Rhizobium sp. nitrogenase struc... 311 1e-82

[gil152328|gb|AH000924.1|SEG\\_RHMNIFKDH](#) Rhizobium sp. nitrogenase ... 311 1e-82

[gil82621101|gb|U00090.1](#) Rhizobium sp. NGR234 plasmid pNGR234a, ... 311 1e-82

#### LMG 6125

[gil30407143|embl|AL672111.1|MLO672111](#) Mesorhizobium loti R7A symb... 361 2e-97

[gil20804067|embl|AL672114.1](#) Mesorhizobium loti R7A symbiosis isl... 361 2e-97

[ML0303](#) NITROGENASE IRON PROTEIN NIFH 361 2e-97

[gil47118328|dbj|BA000012.4](#) Mesorhizobium loti MAFF303099 DNA, c... 345 1e-92

[gil57165207|ref|NC\\_002678.2](#) Mesorhizobium loti MAFF303099, comp... 345 1e-92

## LMG 6133

- [gil26418919|gb|AY159587.1](#) Uncultured Sinorhizobium sp. clone ni... 291 2e-76
- [gil14523537|gb|AE007235.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 291 2e-76
- [gil25168258|gb|AE006469.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 291 2e-76
- [gil61191859|gb|AY934877.1](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 53044B nitrog... 291 2e-76
- [gil16262453|ref|NC\\_003037.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid... 291 2e-76

## LMG 6134

- [gil22255707|gb|AF484640.1](#) Bradyrhizobium elkanii nitrogenase ir... 272 1e-70
- [gil30172216|dbj|AB094963.1](#) Bradyrhizobium elkanii nifH gene for... 272 1e-70
- [gil51235165|gb|AY599091.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 46... 264 3e-68
- [gil51235167|gb|AY599092.1](#) Bradyrhizobium elkanii strain USDA 94... 264 3e-68
- [gil61191831|gb|AY934869.1](#) Rhizobium sp. CCBAU 23084 nitrogenase... 264 3e-68

## LMG 6138

- [gil12620417|gb|AH010242.1|SEG\\_AF322012S](#) Bradyrhizobium japonicum... 313 4e-83
- [gil12620418|gb|AF322012.1|AF322012S1](#) Bradyrhizobium japonicum sy... 313 4e-83
- [gil22255701|gb|AF484637.1](#) Bradyrhizobium liaoningense nitrogena... 313 4e-83
- [gil47457770|embl|AJ563961.1](#) Bradyrhizobium japonicum partial nif... 313 4e-83
- [gil22163981|dbj|AB079619.1](#) Bradyrhizobium japonicum nifH gene f... 313 4e-83

## LMG 11892

- [gil152327|gb|M26961.1|RHMNIFKDH3](#) Rhizobium sp. nitrogenase struc... 159 1e-36
- [gil152328|gb|AH000924.1|SEG\\_RHMNIFKDH](#) Rhizobium sp. nitrogenase ... 159 1e-36
- [gil82621101|gb|U00090.1](#) Rhizobium sp. NGR234 plasmid pNGR234a, ... 159 1e-36
- [gil16519640|ref|NC\\_000914.1](#) Rhizobium sp. NGR234 plasmid pNGR23... 159 1e-36
- [y4xA](#) nitrogenase Fe protein; id. to y4vK 159 1e-36

## LMG 14919

- [gil152327|gb|M26961.1|RHMNIFKDH3](#) Rhizobium sp. nitrogenase struc... 202 9e-50
- [gil152328|gb|AH000924.1|SEG\\_RHMNIFKDH](#) Rhizobium sp. nitrogenase ... 202 9e-50
- [gil82621101|gb|U00090.1](#) Rhizobium sp. NGR234 plasmid pNGR234a, ... 202 9e-50
- [gil16519640|ref|NC\\_000914.1](#) Rhizobium sp. NGR234 plasmid pNGR23... 202 9e-50
- [y4xA](#) nitrogenase Fe protein; id. to y4vK 202 9e-50

## LMG 18254

[gil294696|gb|L16503.1|RHMQB](#) Rhizobium fredii DNA sequence 266 8e-69  
[gil22255729|gb|AF484652.1](#) Sinorhizobium xinjiangense nitrogenas... 266 8e-69  
[gil26418925|gb|AY159590.1](#) Uncultured Sinorhizobium sp. clone ni... 266 8e-69  
[gil26418935|gb|AY159595.1](#) Uncultured Sinorhizobium sp. clone ni... 266 8e-69  
[gil2169428|dbj|E01169.1](#) DNA sequence from nifH and nifD 266 8e-69

#### LMG 18864

[gil61191848|gb|AY934874.1](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 33036a nitrog... 454 e-125  
[gil113725780|gb|AATG01000001.1](#) Sinorhizobium medicae WSM419 ctg... 454 e-125  
[gil113871108|ref|NZ\\_AATG01000001.1](#) Sinorhizobium medicae WSM419... 454 e-125  
[gil115252857|embl|AJ968689.1](#) Phyllobacterium sp. ORS 1402 partia... 454 e-125  
[gil26418919|gb|AY159587.1](#) Uncultured Sinorhizobium sp. clone ni... 383 e-104

#### LMG 17148

[gil20269082|embl|AJ457914.1](#) Mesorhizobium ciceri partial nifH ge... 274 3e-71  
[gil20269084|embl|AJ457915.1](#) Mesorhizobium ciceri partial nifH ge... 274 3e-71  
[gil20269086|embl|AJ457916.1](#) Mesorhizobium mediterraneum partial ... 274 3e-71  
[gil20269090|embl|AJ457918.1](#) Mesorhizobium ciceri partial nifH ge... 274 3e-71  
[gil58042492|gb|AY318755.2](#) Mesorhizobium ciceri dinitrogenase re... 266 8e-69

#### LMG 19141

[gil1463031|gb|U31074.1|RLU31074](#) Rhizobium leguminosarum bv. trif... 624 e-177  
[gil1895063|gb|U89824.1|RLU89824](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 624 e-177  
[gil1895064|gb|U89825.1|RLU89825](#) Rhizobium leguminosarum bv. vici... 624 e-177  
[gil2801559|gb|AF041443.1](#) Rhizobium sp. 'ACCC 19667' 16S ribosom... 624 e-177  
[gil9255925|gb|AF282924.1|AF282924](#) Mesorhizobium sp. N36 16S ribo... 624 e-177

#### H152

[gil2565135|gb|U86344.1|RGU86344](#) Rhizobium giardinii 16S ribosoma... 1066 0.0  
[gil13591735|gb|AF345552.1|AF345552](#) Rhizobium sp. SDW058 16S ribo... 1066 0.0  
[gil47420170|gb|AY599688.1](#) Uncultured Rhizobium sp. clone CI-4-T... 1066 0.0  
[gil83699978|gb|DQ310792.1](#) Bradyrhizobium sp. CCBAU 23024 16S ri... 1066 0.0  
[gil110002861|embl|AM181755.1](#) Rhizobium giardinii partial 16S rRN... 1066 0.0

#### LMG 18976

[gil26418919|gb|AY159587.1](#) Uncultured Sinorhizobium sp. clone ni... 406 e-111  
[gil14523537|gb|AE007235.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 406 e-111

[gil25168258|gb|AE006469.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 406 e-111  
[gil61191859|gb|AY934877.1](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 53044B nitrog... 406 e-111  
[gil16262453|ref|NC\\_003037.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid... 406 e-111

#### LMG 19141

[gil26418919|gb|AY159587.1](#) Uncultured Sinorhizobium sp. clone ni... 244 3e-62  
[gil14523537|gb|AE007235.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 244 3e-62  
[gil25168258|gb|AE006469.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid p... 244 3e-62  
[gil61191859|gb|AY934877.1](#) Sinorhizobium sp. CCBAU 53044B nitrog... 244 3e-62  
[gil16262453|ref|NC\\_003037.1](#) Sinorhizobium meliloti 1021 plasmid... 244 3e-62

#### LMG 6465

[gil89475633|gb|DQ413015.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae is... 135 2e-29  
[gil115259115|embl|AM236084.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae ... 135 2e-29  
[gil116254467|ref|NC\\_008381.1](#) Rhizobium leguminosarum bv. viciae... 135 2e-29  

[pRL100162](#) 135 2e-29

[gil13778052|gb|AZ935396.1|AZ935396](#) BJ\_\_Ba0003B22f B. japonicum B... 125 2e-26

# 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](#)