

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE LEGUMINOSAS
NATIVAS E SOLOS DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO
DOS CAMPOS GERAIS**

Responsável: Profa. Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista
Depto de Biologia Estrutural, Molecular e Genética
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Ponta Grossa
2015

1. Revisão bibliográfica

1.1. Introdução

O nitrogênio (N) é um fator limitante para qualquer ecossistema. Sabe-se que o N é um dos elementos mais requisitados pelas plantas, fazendo com que o desenvolvimento das mesmas seja produtivo ou limitado, de acordo com sua disponibilidade no solo.

Apesar de 80% da atmosfera ser composta por N e este ser o seu componente mais abundante, o mesmo ocorre na forma molecular (N_2). O N_2 é inerte para grande parte dos organismos, devido à elevada estabilidade da tripla ligação existente entre os dois átomos de N. Para tais organismos, o N deve ser disponibilizado em formas passíveis de assimilação, como nitrato, amônia e N orgânico (TATE, 1995; CREWS, 1999).

Nos solos pouco férteis das regiões tropicais o N é o elemento que mais limita o desenvolvimento das plantas. Suas fontes constituem o solo, essencialmente na forma orgânica (98%), mas também nas formas inorgânicas amônia (NH_3 , convertida em NH_4^+ em contato com H_2O), nitratos (NO_3^-) e nitritos (NO_2^-) (MORGANTE, 2003; ALFAIA, 2006), resultantes da decomposição da matéria orgânica; os fertilizantes nitrogenados; os processos de fixação não-biológica, decorrentes de descargas elétricas (promovem a oxidação do N_2 em NO_3), combustão e vulcanismo (liberação de NH_3); e o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) (MALAVOLTA, 2006).

1.2. Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) constitui a principal via de incorporação do N à biosfera e, junto à fotossíntese, são considerados os mais importantes processos biológicos da biosfera. Consiste na redução enzimática do N_2 a amônia, posteriormente incorporada em compostos nitrogenados, processo realizado exclusivamente por bactérias e arqueobactérias denominadas diazotróficas (DIXON & KAHN, 2004; DELAMUTA, 2015).

A enzima chave para o processo de FBN chamada-se dinitrogenase, a qual possui subunidades proteicas capazes de transportar elétrons para que a redução do N_2 ocorra. Essas subunidades correspondem à Ferro-proteína (Fe-

proteína) e à Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína). A redução do N_2 se dá por várias transferências de elétrons, e requer alta quantidade de ATP. A subunidade Fe-proteína recebe elétrons de uma terceira molécula, que também auxilia esse processo, a ferredoxina. Após recebê-lo, a Fe-proteína doa elétrons para a MoFe-proteína, que os acumula até concentrar oito elétrons. Somente com os oito elétrons é que a redução completa do N_2 a NH_3 ocorre, resultando na reação: $N_2 + 16 ATP + 8e^- + 8H^+ \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 Pi$ (MALAVOLTA, 2006).

Os microrganismos diazotróficos estabelecem diferentes tipos de associação com diferentes espécies vegetais e, de acordo com tal associação, são classificados em: de vida livre, associativos e simbióticos. Os microrganismos diazotróficos simbióticos são coletivamente denominados rizóbios.

1.3. Interação simbiótica entre rizóbios e plantas da família Fabaceae

Dentre as formas de associação planta-diazotróficos, a associação simbiótica entre rizóbios e determinadas espécies da família Fabaceae (=Leguminosae) é a que fornece o maior aporte de N para a planta hospedeira, contribuindo de forma significativa para a incorporação de N em diferentes ecossistemas. (LINDSTRÖM et al, 2010). O sucesso de tal associação deve-se à organogênese de estruturas radiculares especializadas da planta hospedeira, denominadas nódulos, no interior dos quais é mantido um constante suprimento de carbono e regulação da pressão de oxigênio, permitindo que os rizóbios realizem a FBN e disponibilizem a amônia produzida diretamente aos tecidos vegetais (SCHULTZE & KONDOROSI, 1998; OLDROYD & DOWNIE, 2004) (Figura 1).

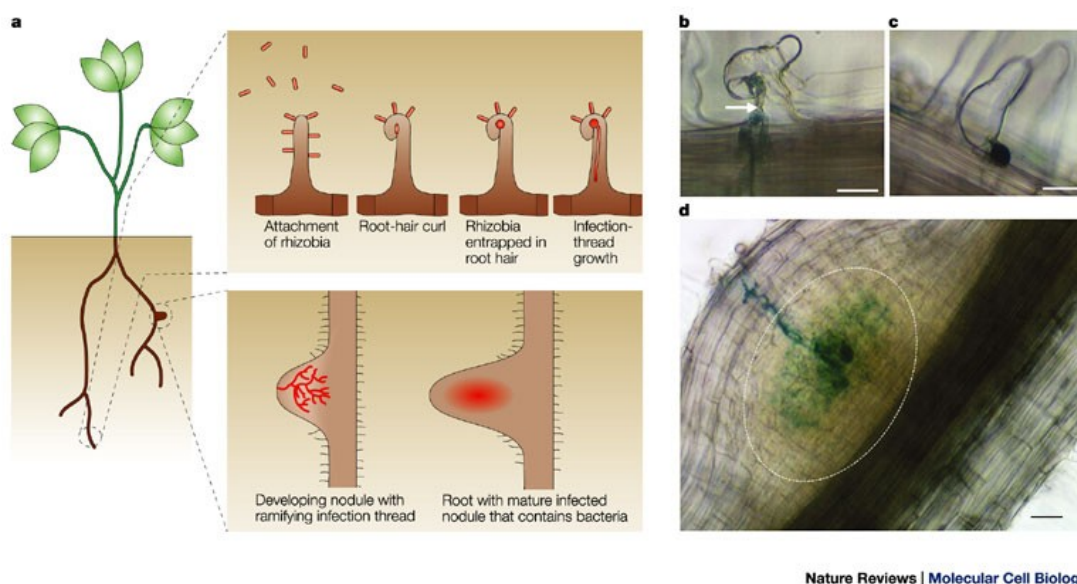


Figura 1: Organogênese do nódulo em plantas leguminosas

Fonte: Oldroyd & Downie, 2004

A interação inicia-se com a liberação de exsudatos radiculares da planta hospedeira, contendo uma específica variedade de moléculas, dentre as quais os compostos flavonoides (Figura 1). Os flavonoides atuam como sinais moleculares, e são detectados por rizóbios compatíveis presentes no solo, agindo como substâncias quimiotáticas, estimuladoras da multiplicação dos rizóbios e indutoras de genes bacterianos responsáveis pela síntese dos fatores de nodulação (fatores Nod), oligossacarídeos lipoquitínicos secretados pelos rizóbios. Os fatores Nod, mediante reconhecimento pela planta, induzem a modificações, como o curvamento dos pelos radiculares, invaginação da parede celular e formação de um cordão de infecção no interior do pelo radicular. O cordão de infecção prolonga-se até atingir o primórdio do nódulo, que é desenvolvido devido à reativação da divisão de células diferenciadas do córtex da raiz. Os rizóbios são liberados na extremidade interna do cordão de infecção por endocitose em uma célula cortical, circundados por uma membrana, no interior da qual serão diferenciados em bacteroides, formas capazes de fixar N_2 (Schultze & Kondorosi, 1998; Jones et al., 2007; Masson-Boivin et al., 2009).

Essa interação simbiótica requer um alto grau de compatibilidade entre o rizóbio e a planta hospedeira, pois a sinalização molecular, através dos

flavonoides e dos fatores Nod, é altamente específica e coordenada (Masson-Boivin et al., 2009; Barret & Parker, 2006).

1.4. Aspectos taxonômicos e evolutivos dos rizóbios

O gênero *Rhizobium* foi descrito pela primeira vez em 1896 por Kirchner e representava o único grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio que se associavam a certas espécies de leguminosas, formando nódulos. (DELAMUTA, 2015). Os rizóbios encontram-se classificados pela taxonomia atual como pertencentes a: Domínio: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Classe: Alphaproteobacteria; Ordem: Rhizobiales; distribuídos nas Famílias Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Methylobacteriaceae e Hiphomicrobiaceae; e compreendendo dez gêneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Blastobacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (NCBI, 2011; MOULIN, et al, 2001). No entanto, bactérias capazes de nodular leguminosas foram identificadas como pertencentes às classes *Betaproteobacteria* (*Burkholderia* e *Cupriavidus*) e *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*) (ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2013).

Rizóbios são capazes de ocupar dois nichos distintos: o solo (forma saprofítica) e a planta hospedeira (forma simbiótica) (Denison & Kiers, 2004; . A capacidade de ocupar diferentes habitats aparentemente influenciou o tamanho, complexidade e conteúdo de seus genomas, sendo proposto que genomas de rizóbios tenham evoluído via expansão, primariamente por transferência lateral de genes e duplicações, a fim de se ajustar às condições ambientais adversas (BOUSSAU et al., 2004), explicando sua grande diversidade genética, em comparação a outros grupos microbianos. Segundo tal ponto de vista, a maximização da sobrevivência dos rizóbios, quando em vida livre, representa o principal impulso na evolução dos genomas desse grupo de microrganismos (YOUNG et al., 2006; BATISTA et al., 2007).

1.5. A família Fabaceae e os Campos Gerais

A família Fabaceae constitui uma das maiores famílias de angiospermas, depois de Orchidaceae e Asteraceae com 800 gêneros e cerca de 20.000 espécies, distribuídas em três subfamílias: Faboideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae (Lewis et al. 2005) A família apresenta uma distribuição ampla ao redor do globo, está presente tanto nas florestas tropicais quanto desertos, planícies e regiões alpinas. Abrange uma ampla gama de formas de vida, desde ervas alpinas árticas e arbustos perenes temperadas ou tropicais até xerófitas anuais e árvores gigantes equatoriais. Os membros da família Fabaceae são caracterizadas por possuir fruta distinta, denominadas leguminosas, que dá à família seu nome original. A simbiose das leguminosas com bactérias fixadoras de nitrogênio não agrega valor apenas na agricultura, mas também desempenha um papel crucial nos ecossistemas naturais (SMÝKAL, 2015).

A região dos Campos Gerais, no Estado do Paraná, Brasil, possui uma grande diversidade florística, assim como uma grande diversidade de plantas da família Fabaceae. Situada na porção centro-leste do estado do Paraná, na borda do Segundo Planalto, a região dos Campos Gerais caracteriza-se principalmente por extensas áreas de gramíneas baixas desprovidas de arbustos; no entanto, são encontrados encraves de cerrados e ainda florestas que ocupam posições distintas na paisagem, geralmente nas encostas, vales e matas de galeria, ou em formações arredondadas -“capões”. Essa região fitogeográfica representa uma zona limítrofe, devido às características climáticas e topográficas, as quais determinam suas formações vegetais distintas (CARMO, 2006).

Alguns dos sítios naturais são objeto de unidades de conservação já implementadas (Parques Estaduais de Vila Velha em Ponta Grossa, do Quartelá em Tibagi, do Monge e do Passa Dois na Lapa, do Cerrado em Jaguariaíva, além de reservas e hortos florestais e RPPNs) ou em implementação (como Parques Municipais do Buraco do Padre, do Capão da Onça e do Rio São Jorge em Ponta Grossa, APA da Escarpa Devoniana abrangendo vários municípios). Em tais localidades, é possível encontrar remanescentes de rica flora endêmica e de espécies animais ameaçadas de extinção (suçuarana, lobo-guará, jaguatirica, gralha-azul, harpia ou gavião-real, gavião-caracoleiro, entre outras) (UEPG, 2003).

De acordo com um levantamento Florístico realizado por CARMO (2006) no Parque Estadual do Guartelá, encontrou-se 634 táxons distribuídos em 321 gêneros e 104 famílias. Desta listagem 612 táxons são de angiospermas, duas de gimnospermas e 20 de pteridófitas. A família com maior riqueza florística foi Asteraceae (79 espécies), seguida de Myrtaceae (42), Fabaceae (42), Poaceae (35), Melastomataceae (29), Rubiaceae (27), Cyperaceae (22), Euphorbiaceae (19), Lauraceae (18), Bromeliaceae (18) e Orchidaceae (16). Popularmente conhecidas como leguminosas, a família Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas, sendo muito frequente na região dos Campos Gerais. Alguns exemplos de espécies encontradas na região são: *Chamaecrista ramosa* var. *parvifoliola*, *Senna rugosa*, *Bauhinia forficata*, *Calliandra selloi*, entre várias outras (CARMO, 2006).

Conforme levantamento florístico realizado por SILVA (2014), no Parque Estadual de Vila Velha, foram amostradas 291 espécies, compreendidas em 53 famílias. Destas, 164 espécies foram amostradas na estepe não-hidromórfica (ENH), 91 na estepe hidromórfica (EH) e 57 na estepe rupestre (ER). Encontrou-se que as famílias com maior riqueza florística foram Asteraceae (75 espécies), seguida de Poaceae (37), Cyperaceae (20), Fabaceae (20) Melastomataceae (15), totalizando 57,39% das espécies amostradas. (SILVA, 2014).

Segundo o levantamento florístico realizado por ANDRADE et. al (2015), Na região das Furnas Gêmeas, local pertencente ao Parque Nacional dos Campos Gerais, foram catalogadas 292 espécies, distribuídas em 67 famílias de Angiospermas e uma família de Gimnosperma. Asteraceae foi a família com a maior riqueza florística (56 sp.), seguida de Poaceae (25 sp.), Myrtaceae (20 sp.), Fabaceae (18 sp.), Rubiaceae e Melastomataceae (15 sp.). Apesar do local ter alterações antrópicas bem evidentes, ainda preserva uma alta riqueza florística da vegetação original, inclusive com espécies que consta na lista de plantas ameaçadas de extinção do Estado do Paraná (dados não publicados).

O Parque Estadual do Cerrado constitui uma importante amostra da vegetação da região nordeste do estado, pois seus quatro tipos fisionômicos principais (floresta, cerrado, campo e refúgio vegetacional rupestre) encontram-se bem preservados. Por este motivo, o Parque abriga uma notável diversidade de espécies de plantas em uma área relativamente pequena; espécimes da

família Fabaceae figuram especialmente em áreas de cerrado e campo. Dados de composição florística da área apontam a família Fabaceae como uma das três mais representativas no Parque Estadual do Cerrado (von Linsingen et al., 2006).

1.6. Justificativa

Apesar da grande diversidade de gêneros e espécies de plantas da família Fabaceae serem descritas na região dos Campos Gerais, ainda não existem trabalhos relacionados com a diversidade de microssimbiontes. O conhecimento da diversidade genética de rizóbios associados a espécies de plantas leguminosas nativas pode contribuir como um recurso no estudo e recuperação da flora nativa em ambientes onde o solo não se encontra em condições favoráveis e, portanto, auxiliar na manutenção biológica destas regiões. REIS Jr et al. (2010) realizaram uma extensa análise de diversidade de rizóbios simbiossintetizantes de plantas do gênero *Mimosa* provenientes de campos ruprestes de dois importantes biomas nacionais: a Caatinga e o Cerrado sulmatogrossense. Contando com muitas espécies endêmicas, os autores demonstraram a importância da FBN na incorporação de N em áreas consideradas frágeis.

Além disso, o conhecimento da diversidade de rizóbios pode fornecer importantes informações sobre as complexas interações ecológicas e evolutivas envolvendo macro e microssimbiontes. Muitas das leguminosas nodulíferas que foram, até então, encontradas em unidades de conservação dos Campos Gerais, foram classificadas como pertencentes ao gênero *Mimosa* (dados não publicados), gênero que desperta muito interesse no estudo da evolução da interação rizóbio-planta hospedeira, por serem capazes de serem noduladas por uma ampla gama de rizóbios, pertencentes a táxons variados. (BONTEMPS et al., 2015). Barrett & Parker (2006) analisaram a diversidade de rizóbios de duas espécies de *Mimosa* sp. de diferentes regiões da Costa Rica. Os autores constataram que a co-ocorrência de três diferentes gêneros de α e β -proteobactérias em uma mesma planta hospedeira, cujas populações de microssimbiontes variaram conforme a localização geográfica e fatores

ambientais locais. Os genótipos dos rizóbios tiveram influência significativa na taxa de FBN.

Cabe salientar que, para a maioria das espécies nativas da região dos Campos Gerais, não existe nenhum tipo de relato sobre nodulação. A análise da diversidade de rizóbios de tais espécies pode nos conferir importantes informações quanto à evolução da interação planta-microrganismo, bem como da diferenciação espacial na composição de populações simbióticas.

Uma outra estratégia de estudo da diversidade de rizóbios de uma determinada região consiste na utilização de plantas-isca (*trapping*). Nesses casos, a utilização de uma planta modelo, reconhecidamente promíscua, pode também ser uma importante fonte de dados sobre diversidade de rizóbios nativos (Arsene et al., 2012). Apesar de ser uma planta de importância agrônômica atualmente, por ter sido introduzida em diferentes locais do mundo, o feijoeiro é também um modelo de estudo de evolução da simbiose rizóbio-leguminosa na América Latina, visto que sua mais provável origem é a Mesoamérica e plantas nativas de *P. vulgaris* ainda tem ocorrência em regiões meso e sulamericanas (Martinez-Romero, 2003). Assim, o estudo de rizóbios associados a feijoeiro em áreas nativas da América pode prover informações valiosas sobre a ecologia da interação, a dinâmica de troca de material genético (visto que microsimbiontes de feijoeiro são reconhecidamente promíscuos) e bases para a proposta de aspectos evolutivos de tal interação (Martinez-Romero, 2003).

2. Objetivos e Metas

2.1. Objetivos

Este projeto propõe a primeira identificação de plantas nodulíferas da família Fabaceae dos Campos Gerais, bem como o isolamento e caracterização da diversidade genética e morfofisiológica de estirpes de rizóbios simbiontes de tais leguminosas nativas e de solos da região.

2.2. Metas

- Coletar e caracterizar exemplares de plantas nodulíferas da família Fabaceae nos Campos Gerais;
- Coletar amostras de solo para isolamento de rizóbios, utilizando o feijoeiro e mimosa como planta-isca (*trapping*);
- Isolar rizóbios do interior dos nódulos das leguminosas nativas coletadas e das raízes da planta-isca;
- Implementar coleção de culturas de bactérias dos Campos Gerais;
- Realizar a caracterização fisiológica e fenotípicas das culturas de rizóbios;
- Avaliar a diversidade genética dos rizóbios obtidos;
- Analisar a relação entre os genótipos dos macrossimbiontes e localização geográfica com os rizóbios isolados.

3. Metodologia e Estratégia de Ação

Os rizóbios serão isolados utilizando duas diferentes estratégias: a coleta de plantas leguminosas nativas das regiões estudadas (Parque Estadual de Vila Velha, Parque Estadual do Guartelá e Parque Estadual do Cerrado) e posterior isolamento dos nódulos radiculares; e a coleta de amostras de solos das regiões selecionadas e utilização de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) como planta-isca (“trapping”) para posterior isolamento dos rizóbios dos nódulos radiculares.

3.1. Características dos locais de coleta.

O Parque Estadual de Vila Velha (PEVV) é uma unidade de Conservação de 3.122,11 há, localizada no município de Ponta Grossa entre as coordenadas 25° 12'34" e 25° 15'35" de latitude S e 49° 58'04" e 50° 03'37" longitude Oeste, a uma altitude de 800 a 1.068 m s.n.m., na região dos Campos Gerais, estado do Paraná, a uma distância de aproximadamente 80 km da capital, Curitiba. (Figura 1) (SILVA, 2014).

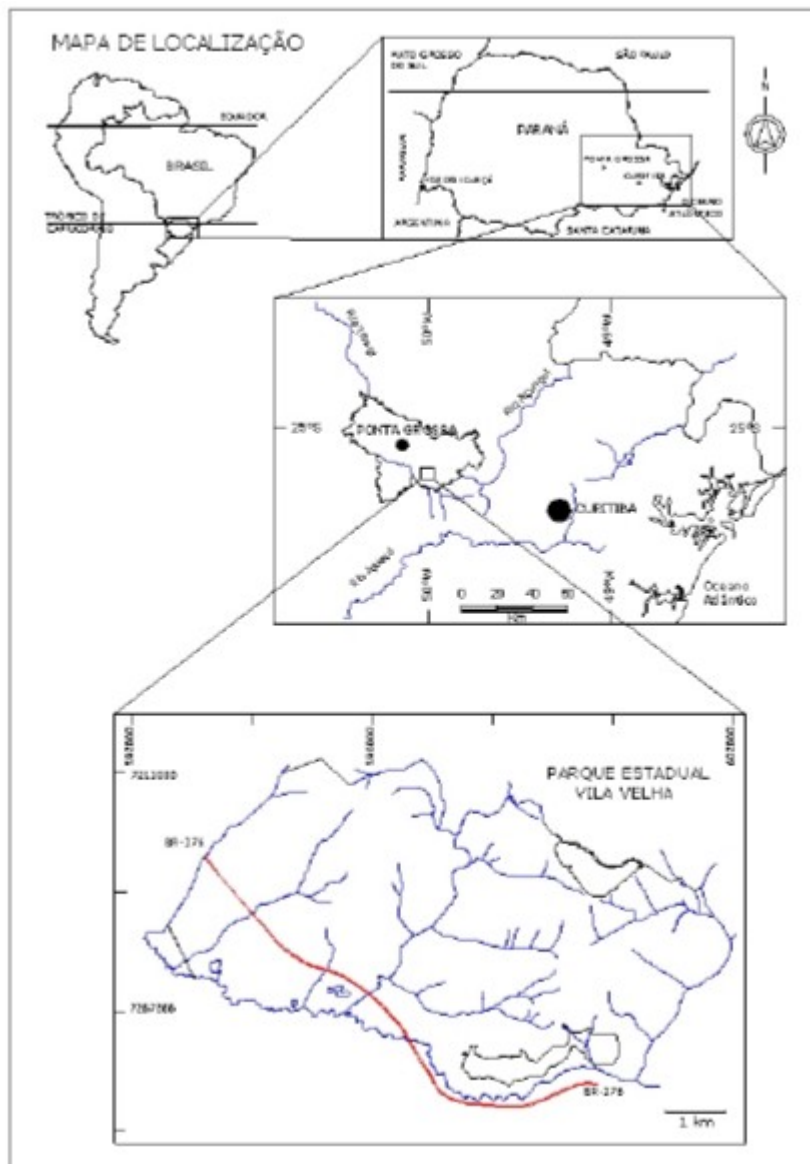


Figura 1 : Localização Parque Estadual de Vila Velha. Fonte: IAP

O Parque Estadual do Guartelá (PEG) está localizado no município de Tibagi, no Segundo Planalto do Estado do Paraná (Figura 2, nas coordenadas 24°39'10"S e 50°15'25"W, totalizando uma área de 789,97 hectares. Tem como limite Norte e Leste o rio Iapó, ao Sudeste o riacho do Pedregulho e ao Noroeste, propriedades particulares. O PEG é uma das importantes Unidades de Conservação da região dos Campos Gerais, estando inserido na Área de Preservação Ambiental (APA) da Escarpa Devoniana.

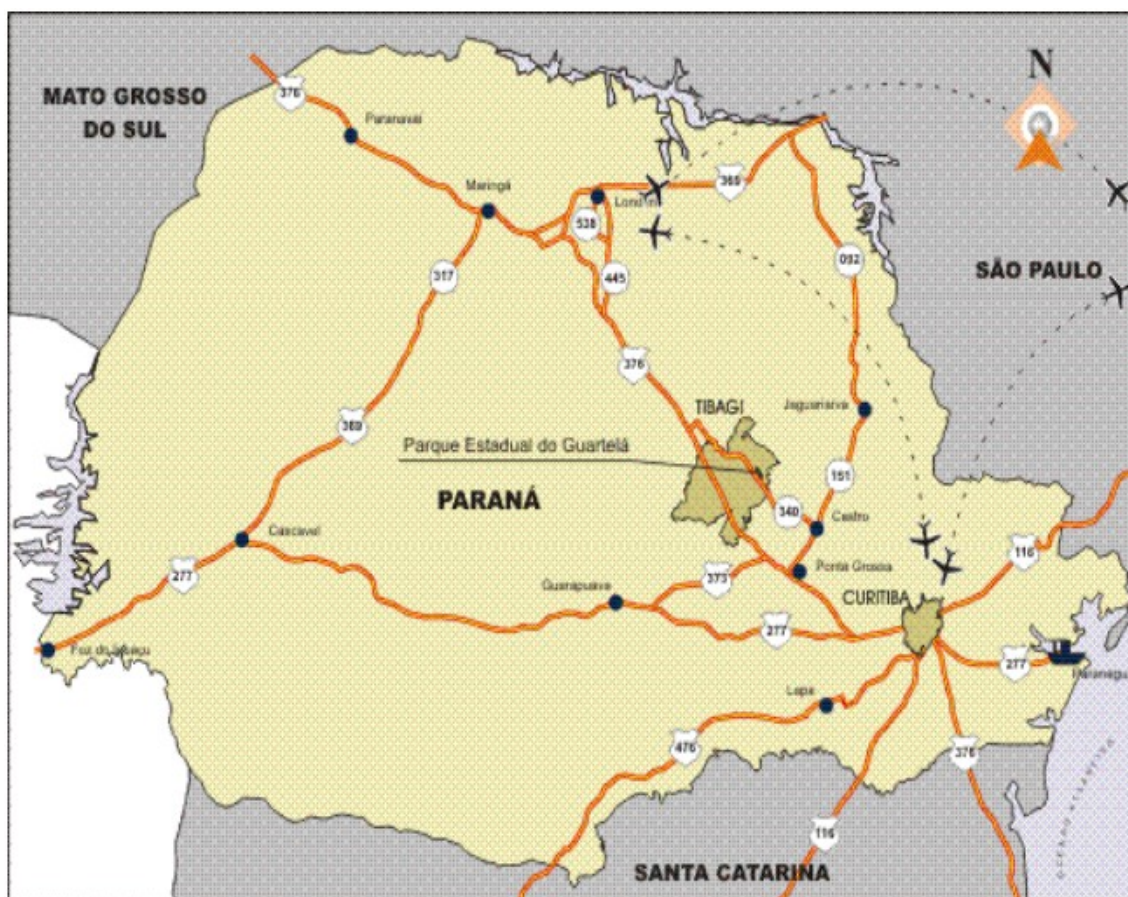


Figura 2 – Localização do Parque Estadual do Guartelá. Fonte: IAP

O Parque Estadual do Cerrado constitui-se em um pequeno fragmento de cerrado no Estado do Paraná, representando o limite austral do bioma no Brasil. Apresenta uma área total de 426,62 hectares e localiza-se a cerca de sete quilômetros do perímetro urbano do município de Jaguariaíva ($24^{\circ}09' S$; $50^{\circ}18' W$). Quanto à fisionomia da vegetação, o Parque abriga duas formas básicas: savânica (cerrado) e florestal.

Serão realizadas coletas também nas Furnas Gêmeas. A área faz parte de uma propriedade privada, porém encontra-se dentro do Parque Nacional dos Campos Gerais. O termo “furna” significa caverna, cova, lapa, sendo utilizado em outras regiões brasileiras para designar qualquer escorregamento de encosta ou cavidade no terreno. Furnas são depressões formadas a partir do desabamento do arenito, especificamente na área de afloramentos da Formação Furnas, provocado por infiltração de água, que ocorrem em uma zona fitogeográfica denominada de Campos Gerais do Paraná, caracterizada por predomínio de vegetação campestre (estepe gramíneo-lenhosa) e por

ocorrência ocasional de capões de floresta com araucária (Floresta Ombrófila Mista) (ANDRADE et al, 2015).

As furnas no Paraná ocorrem quase exclusivamente na área de afloramento da Formação Furnas, sendo mencionadas cerca de 50 furnas na região dos Campos Gerais, a grande maioria rasa e pouco desenvolvida. (MINEROPAR).

3.2. Coleta de nódulos de leguminosas nativas

Serão coletadas espécimes de leguminosas nodulíferas das áreas citadas no item 1.1. Amostras de raízes contendo nódulos serão removidas do solo manualmente e com o auxílio de pá para jardinagem e acondicionadas em sacos plásticos estéreis e conduzidas ao laboratório para isolamento dos rizóbios. Os pontos de coleta serão caracterizados de acordo com dados da diversidade florística presente e coordenadas geográficas.

3.3. Isolamento de rizóbios a partir de planta-isca ("trapping")

Serão coletadas amostras de solo de diferentes áreas da região dos Campos Gerais, especificamente no Parque Nacional do Guartelá e Parque Estadual de Vila Velha, identificadas segundo sua diversidade florística e coordenadas geográficas. As amostras serão coletadas na profundidade de 0-10 cm, em triplicata, e homogeneizadas.

Como isca, utilizaremos sementes de feijoeiro da variedade IPR Campos Gerais, cultivar do grupo Carioca, fornecidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), não tratadas com nenhum tipo de substância antimicrobiana. Serão também utilizadas sementes de plantas do gênero *Mimosa*, fornecidas pela Embrapa Cerrados. A metodologia adotada será conforme descrito por Bournaud et al. (2013), com pequenas modificações: o substrato, que será previamente esterilizado, terá como composição 1 parte de carvão moído para 3 partes de areia estéril. Para melhor desenvolvimento das plantas, será utilizada solução nutritiva livre de nitrogênio (Vincent, 1970).

Mediante constatação da nodulação, os nódulos radiculares serão utilizados para isolamento dos microssimbiontes.

3.4. Isolamento de rizóbios a partir de nódulos de leguminosas nativas e de plantas-isca.

Os nódulos deverão ser previamente desinfestados, para a eliminação de microrganismos da superfície. Cada nódulo deverá permanecer 30 segundos na solução de álcool 70%, logo 3 minutos na solução hipoclorito de sódio 3% e por último, 10 lavagens em água destilada estéril. Os nódulos serão, então, macerados com bastão de vidro flambado com 10µl de água estéril. A solução gerada será inoculada em placas de Petri contendo meio sólido seletivo *Yeast Mannitol* (YM), para isolamento de colônias de rizóbios (VINCENT, 1970).

3.5. Caracterização morfológica de rizóbios em meio YM

As estirpes obtidas nos isolamentos descritos acima serão crescidas em meio sólido seletivo *Yeast Mannitol* (YM), acrescido de vermelho congo a 28 °C, por 2 a 7 dias, as quais serão selecionadas e descritas de acordo com aspectos morfo-fisiológicos das colônias de rizóbios: tempo de crescimento, diâmetro da colônia, forma, elevação, borda, superfície, produção de muco, cromogênese da colônia em meio YM com indicador Azul de Bromotimol. Os dados serão analisados, com o auxílio do software Bionumerics, e comparados com dados de estirpes de referência.

3.6. Extração do DNA total

Células crescidas em meio de cultivo YM até a fase exponencial serão utilizadas para extração do DNA total, utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante. A integridade e concentração do DNA será verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.7. Identificação molecular por sequenciamento do gene ribossomal 16S

As amostras serão inoculadas em meio líquido YM e incubadas a 28 °C graus, sob agitação de 100 rpm até a fase exponencial de crescimento. O

cultivo será utilizado para extração do DNA total, segundo metodologia descrita por Menna et al. (2006).

O DNA de cada estirpe será utilizado para amplificação do gene 16S rRNA, utilizando os iniciadores universais fD1 e rD1 (Weisburg et al., 1991). A reação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, 93°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; um ciclo final de extensão por 5 minutos. Os produtos de PCR foram purificados e submetidos a amplificação por PCR para sequenciamento.

Para a obtenção da sequência total do gene 16S rRNA, 4 reações de PCR foram realizadas utilizando os iniciadores Y1 (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'), Y2 (5' – CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT – 3'), 362f (5' – CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG – 3') e 786f (5' – CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG – 3') (Menna et al., 2006). Cada reação consistirá de 80ng do produto de PCR, 1,3 µL de BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), 2,5 µL de tampão (Applied Biosystems), para um volume final de 20 µL. O mesmo programa será utilizado para todos os iniciadores, consistindo de ciclo inicial de desnaturação a 96 °C por 1 minuto; 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Após amplificação, as amostras serão manualmente purificadas, segundo metodologia descrita por Menna et al. (2006). As amostras serão resuspendidas em 10 µL de formamida, desnaturadas a 95°C por 5 minutos e submetida a sequenciamento em um ABI 3500xl Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Sequências parciais do gene 16S rRNA, de alta qualidade, para cada estirpe serão geradas e analisadas utilizando os programas Phred (Ewing et al., 1998a), Phrad (Ewing et al., 1998b) e Consed (Gordon et al., 1998). As sequências serão depositadas no banco de dados Genbank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.8. Amplificação do DNA para a reação de BOX-PCR

A reação de amplificação será realizada utilizando-se o *primer* BOX-AIR (5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC *et al.*, 1994; KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995), seguindo as modificações de Kaschuk *et al.* (2006) e Batista *et al.* (2007). A reação será conduzida em um volume final de 25 µL, contendo 13,8 µL de água Milli-Q estéril; 5,0 µL de dNTPs, (estoque com 1,5 mmol/L de cada base); 2,5 µL de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,5 µL de MgCl (50 mmol/L); 1,0 µL de *primer* (50 pmol/µL); 1,0 µL de DNA (50 ng/µL) e 0,2 µL de Taq (5 U/µL).

A amplificação das sequências consistirá em: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 7 min; 30 a 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 53°C) e extensão (8 min a 65°C); 1 ciclo de extensão final a 65°C por 16 min; manutenção a 4°C (Batista *et al.*, 2007).

Os perfis obtidos serão analisados para geração de um dendrograma, utilizando o programa Bionumerics (*Applied Mathematics*, Kortrijk, Bélgica, v.4.6), utilizando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*; SNEATH, SOKAL; 1973) para a análise do agrupamento e o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912), com 1% de tolerância.

3.9. Estocagem de linhagens bacterianas:

As estirpes isoladas neste projeto serão mantidas em estoque em meio Agar inclinado e glicerol 50% a -80 °C. Ainda, as estirpes serão depositadas na “Coleção de culturas de microrganismos multifuncionais” da Embrapa Soja (Londrina-PR).

6. Resultados e Impactos Esperados

- Realizar a primeira caracterização da diversidade de rizóbios isolados de leguminosas nativas da região dos Campos Gerais, em especial de espécies ameaçada de extinção;
- Análise de preferência (interdependência) e associação planta-simbionte.
- Estabelecimento de uma coleção representativa da região dos Campos Gerais.

7. Principais contribuições científicas/tecnológicas da proposta:

A presente proposta vem de encontro à solução de um problema muito presente em solos brasileiros, os quais muitas vezes se encontram inviáveis e dificultam o crescimento das plantas. Com a identificação da diversidade microbiológica simbiote presente nos nódulos das leguminosas e o estudo das relações que planta-microsimbiote apresentam, podem-se desenvolver técnicas que permitam a inoculação desses simbioses, assim contribuindo para a manutenção do equilíbrio ecológico dessas plantas. Além de contribuir na recuperação da Flora local e preservação dessas áreas com o auxílio da diversidade microbiana. Outra importante contribuição diz respeito à consolidação da parceria existente entre o Laboratório de Ecologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa com outros centros e instituições, como Universidade Estadual de Londrina, Embrapa Soja, Embrapa Cerrados e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

7. Cronograma

Atividades	Semestres					
	1º	2º	3º	4º	5º	6º
1	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X
3		X		X		X
4		X	X	X	X	X
5			X	X	X	X
6			X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X
8	X	X	X	X	X	X

Descrição das atividades:

1. Coleta de Leguminosas e solos
2. Isolamento da microbiota simbiote presente nos nódulos de leguminosas coletadas.
3. Sequenciamento genético dos rizóbios isolados e montagem do banco de estirpes encontradas.
4. Caracterização fisiológica, taxonômica e filogenética das estirpes. .
5. Bioinformática
6. Agrupamento dos dados obtidos e comparação destes com modelos publicados.
7. Revisão bibliográfica.
8. Redação de artigos científicos e demais publicações

8. Referências Bibliográficas

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Growth promotion and protection of lentil (*Lens esculenta*) against herbicide stress by *Rhizobium* species. *Annals of Microbiology*, 60: 735-745, 2010.

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Insecticide-tolerant and plant-growth-promoting *Rhizobium* improves the growth of lentil (*Lens esculentus*) in insecticide-stressed soils. *Pest Management Science*, 67(4): 423-429, 2011.

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 Ecology*, 53: 270-284, 2007.

BARRETT, C.F; PARKER, M. A. **“Coexistence of Burkholderia, Cupriavidus, and Rhizobium sp. Nodule Bacteria on Two Mimosa spp. in Costa Rica”**. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, Nº. 2, p. 1198-1206. February, 2006.

BONTEMPS C., ROGEL, M. A., WIECHMANN, A., MUSSABEKOVA, A., MOODY, S., SIMON, M. F., MOULIN, L., ELLIOT, G. N., LACERCAT-DIDIER, L., DASILVA, C., GREETHER, R., CAMARGO-RICALDE, S. L., CHEN, W., SPRENT, J. I., MARTÍNEZ-ROMERO, E., YOUNG, J. P. W. & JAMES, E. K. [Endemic Mimosa species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts](#). *New Phytologist* 2015. 27 Jul 2015.

BOUSSAU, B.; KARLBERG, E. O.; FRANK, A. C.; LEGAULT, B.; ANDERSSON, S. G. E. **Computational inference of scenarios for α -proteobacterial genome evolution**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (26): 9722-9727, 2004.

CARMO, M. R. B. **do Caracterização fitofisionômica do Parque Estadual do Guartelá, Município de Tibagi, Estado do Paraná**. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Biológicas - UNESP, Rio Claro, 2006.

DIXON, R.; KAHN, D. **Genetic regulation of biological nitrogen fixation**. *Nature*, v. 02, p. 621-631, 2004.

DENISON, R.F.; KIERS, E.T. **Lifestyle alternatives for rhizobia: Mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis** .*FEMS Microbiology Letters* 237:187–193, 2004.

EWING, B.; GREEN, P. **Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities.***Genome Research*, 8, 186-194, 1998a

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8, 175-185, 1998b

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: **a graphical tool for sequence finishing**. *Genome Research*, 8, 195-202, 1998

JONES K. M., KOBAYASHI H., DAVIES B. W., TAGA M. E., WALKER G. C. 2007. **How rhizobial symbionts invade plants: - *Sinorhizobium-Medicago*-model**. *Nature Review. Microbiology*.5, 619–33. Agosto, 2007.

LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B., and LOCK, M. 2005. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

LINDSTRÖM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. **The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: The case of rhizobia**. *Res. Microbiol.* 2010, 161, 453–463.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. pp.126-192.

MARTINEZ-ROMERO, E. **Diversity of *Rhizobium–Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives**. *Plant and Soil*, 252, pp 11-23. 2003.

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

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

ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. **Dinitrogen-fixing prokaryotes**. In: ROSENBERG, E.; DE LONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds.). Capítulo 11. The Prokaryotes

- prokaryotic physiology and biochemistry. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. p. 427-451.

PEREIRA, P. M.. **Taxonomia e diversidade genética de rizóbios microssimbiontes de distintas leguminosas com base na análise polifásica (BOX-PCR e 16S RNAr) e na metodologia de MLSA**. 2008. 100f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

REIS JUNIOR, F. B. dos; SIMON, M. F.; GROSS, E.; BODDEY, R. M.; ELLIOT, G. N.; ELIAS NETO, N.; LOUREIRO, M. de F.; QUEIROZ, L. P. de; CHEN, W-M.; NORÉM, A.; FARIA, S. M. de; BONTEMPS, C.; GOI, S. R. de; YOUNG, P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. **Nodulation and nitrogen fixation by Mimosa spp. in the cerrado and caatinga biomes of Brazil**. New Phytologist. Volume 186, Issue 4, pages 934–946, Junho 2010

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Inoculantes microbianos: situação no Brasil. In: BIOFAG, org. **Uso y perspectivas de los biofertilizantes en iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial**. Montevideo: BIOFAG p.1-16, 2007.

Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná - UEPG – 2003. Disponível em: < <http://www.uepg.br/natural/relatoriofinal.pdf>> Acesso em: 20/11/2014

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. **Regulation of symbiotic root nodule development**. Annual Review of Genetics, 32: 33-57, 1998.

TATE, R. L. Soil Microbiology. Wiley, 398, 1995.

YESSICA, G. P.; ALEJANDRO, A.; RONALD, F. C.; JOSÉ, A. J.; ESPERANZA, M. R.; SAMUEL, C. S. J.; REMEDIOS, M. M.; ORMEÑO-ORRILLO, E. Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzopyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. Applied Soil Ecology, 63: 105-111, 2013.

YOUNG, J. P. W.; CROSSMAN, L. C.; JOHNSTON, A. W. B.; THOMSON, N. R.; GHAZOU, Z. F.; HULL, K. H. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. Genome Biology, 7 (4): R34, 2006.

WEISBURG, M.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703, 1991.