Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Composição e funcionalidade do microbioma da rizosfera de feijão selvagem e cultivado

Stalin Wladimir Sarango Flores

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

Stalin Wladimir Sarango Flores
Engenheiro Agrônomo

Composição e funcionalidade do microbioma da rizosfera de feijão selvagem e cultivado

Orientador:
Prof. Dr. **RODRIGO MENDES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Sarango Flores, Stalin Wladimir
Composição e funcionalidade do microbioma da rizosfera de feijão selvagem e cultivado / Stalin Wladimir Sarango Flores. - - Piracicaba, 2015.
150 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Feijão selvagem 2. Metagenoma 3. Rizobactérias 4. Comunidades microbianas I. Título

CDD 635.652
S243c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

A Deus pela vida manifesta em cada canto. À minha querida família pelo seu infinito amor. Aos meus amigos pelo apoio emocional. A todas as pessoas que usarem este material na busca de informação.

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Mendes pela sua confiança, amizade, paciência e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Dr. Fernando Dini Andreote e Dr. Márcio Lambais pela oportunidade de cumprir essa etapa da minha formação acadêmica no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da ESALQ/USP que eles coordenaram.

À Secretaria Nacional de Educação Superior, Ciência, Tecnologia e Inovação do Equador (SENESCYT) e aos meus conterrâneos equatorianos pelo apoio financeiro.

Ao pessoal do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA-Meio Ambiente, pela disposição e colaboração em tudo o que foi necessário no desenvolvimento acadêmico e de pesquisa do meu trabalho.

Aos professores das disciplinas que acompanhei pelos aprendizados em Microbiologia, Bioinformática e Estatística, doutores: Simone Possedente de Lira, Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, Sônia Maria de Stefano Piedade, Fernando Dini Andreote, Rodrigo Mendes, João Carlos Setubal, Luiz Carlos Basso e Carlos Tadeu dos Santos Dias

Aos meus colegas e técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa-Meio Ambiente: Emiliana, Josiane, Maike, Carol, Harold, Suikinai, Ana Paula, Danilo, Fábio, Clederson, Camila, Ana Gabriele, Vanessa, Leonardo, Marta, Laura, Rafael, Tatiana, João, Tiago, Rodrigo, Márcia, Elke, Rosely, Ana Maria, Rayza, Roseli, Isaneli, Jorge, Joani, Juan, entre outros, pelo auxílio durante minha estada no laboratório e por cada momento inesquecível vivido com eles.

Aos colegas da ESALQ/USP: Silvia, Luana, Maryeimy, Adriano, Alice, Elisa, Rafael, Giselle, Fábio, Arthur, Diogo, Pedro, Lucas, Nelson, Viviana, Yesid e outros pelas conversas e companhia na minha estada em Piracicaba (SP).

"Satisfaction lies in the effort, not in the attainment. Full effort is full victory".

Mohandas Karamchand Gandhi

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
RESUMEN 15
LISTA DE FIGURAS 17
LISTA DE TABELAS 19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 21
1 INTRODUÇÃO 23
1.1 Hipótese e Objetivos 24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 25
2.1 Feijão Comum - *Phaseolus vulgaris* L. 25
2.1.1 Origem e domesticação do feijão comum 25
2.1.2 Patógenos radiculares do feijão 26
2.1.3 Supressividade de doenças 28
2.2 O Microbioma da Planta 29
2.2.1 O microbioma da rizosfera 30
2.2.2 Rizodepósitos 31
2.3 Terra Preta da Amazônia 32
2.3.1 Propriedades físico-químicas da TPA 32
2.3.2 Microbiota associada a TPA 33
3 MATERIAL E MÉTODOS 35
3.1 Material Vegetal 35
3.2 Experimento em Casa de Vegetação 35
3.3 Abordagem Dependente de Cultivo 38
3.3.1 Isolamento de bactérias da rizosfera 38
3.3.2 Caracterização genotípica de isolados bacterianos da rizosfera 39
3.3.3 Testes de inibição do crescimento de fungos patógenos do feijão 40
3.3.4 Identificação dos isolados antagonistas por sequenciamento parcial do gene 16*S* rRNA 41
3.3.5 Análise dos dados do sequenciamento parcial do gene 16*S* rRNA dos isolados bacterianos antagonistas 43
3.3.6 Análise estatística 43

3.4 Abordagem Independente de Cultivo 43
3.4.1 Extração de DNA da rizosfera e sequenciamento metagenômico 43
3.4.2 Análise dos dados do sequenciamento metagenômico 44
3.4.3 Análise estatística dos dados metagenômicos 44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
4.1 Abordagem Dependente de Cultivo 45
4.1.1 Isolamento de bactérias da rizosfera 45
4.1.2 Caracterização molecular de isolados bacterianos por BOX-PCR.....46
4.1.3 Inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e identificação de antagonistas por sequenciamento parcial do gene 16*S* rRNA.....48
4.2 Abordagem Independente de Cultivo 51
4.2.1 Sequenciamento metagenômico do microbioma da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex e do cultivado IAC Alvorada 51
4.2.2 Composição do microbioma da rizosfera do feijão 55
4.2.3 Busca dirigida das bactérias antagonistas de *R. solani* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nos metagenomas de *bulk soil* e rizosferas 85
4.2.4 Funcionalidade do microbioma da rizosfera de feijão 95
4.2.5 Busca de genes microbianos relacionados com funções benéficas para as plantas 97
4.3 Sumário dos Principais Resultados 105
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS 107
REFERÊNCIAS 109
APÊNDICES 147

RESUMO

Composição e funcionalidade do microbioma da rizosfera de feijão selvagem e cultivado

O processo de domesticação e posterior melhoramento das plantas cultivadas foram essenciais para o sustento do crescimento populacional observado na recente história da humanidade. Porém, no processo de melhoramento das culturas não foi considerado o importante papel que o microbioma rizosférico desempenha nas plantas. Neste contexto, esta pesquisa foi direcionada ao estudo do microbioma rizosférico do feijoeiro, considerando um genótipo selvagem e outro cultivado, a fim de determinar a composição e funcionalidade do microbioma em cada rizosfera. Assim, para testar a hipótese de que materiais ancestrais têm maior capacidade de hospedar micro-organismos benéficos na rizosfera quando comparados a cultivares modernas, os genótipos de feijão cultivado IAC Alvorada e selvagem Wild Mex foram cultivados em Terra Preta da Amazônia (TPA), solo caracterizado por abrigar uma grande diversidade microbiana. O DNA total do solo rizosférico de cada genótipo de feijão e do *bulk soil* foi extraído para realizar o sequenciamento metagenômico usando a plataforma *Illumina MiSeq*. O solo rizosférico também foi usado para isolar e selecionar bactérias antagonistas a fungos radiculares patógenos do feijoeiro, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. A abordagem dependente de cultivo permitiu recuperar 11 bactérias que apresentaram atividade antagônica *in vitro* contra os patógenos avaliados, os isolados bacterianos foram identificados como pertencentes aos gêneros *Streptomyces, Kitasatospora, Alcaligenes, Achromobacter, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Brevibacillus* e *Paenibacillus*. A abordagem independente de cultivo revelou que a composição da comunidade microbiana na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex foi caracterizada pela maior abundância relativa dos filos bacterianos Acidobacteria, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes, e do filo fúngico Glomeromycota quando comparada com a composição da rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada, a qual foi constituída em maior proporção pelos filos bacterianos Firmicutes, Planctomycetes, Deinococcus-Thermus e pelo filo fúngico Ascomycota. No nível taxonômico de gênero, a comunidade microbiana da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex apresentou maior frequência relativa de gêneros fixadores do nitrogênio, nitrificadores, antagonistas e promotores do crescimento vegetal. A rizosfera do feijão selvagem Wild Mex apresentou maior abundância relativa de funções relacionadas à fixação do nitrogênio, produção de sideróforos e de ácido indol acético (AIA), quando comparada com o genótipo cultivado IAC Alvorada. O padrão de distribuição observado na análise de ordenação das funções no microbioma da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex foi diferente do padrão encontrado no *bulk soil* e na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada. Os resultados indicaram que o genótipo selvagem é mais seletivo no recrutamento de micro-organismos e funções na rizosfera quando comparado com o cultivar moderno. Em conclusão, os resultados revelaram que o processo de domesticação e melhoramento genético das plantas cultivadas potencialmente debilitou a capacidade do hospedeiro em selecionar e sustentar micro-organismos e funções benéficas na rizosfera.

Palavras-chave: Feijão selvagem; Metagenoma; Rizobactérias; Comunidades microbianas

ABSTRACT

Composition and functionality of the wild and cultivated common bean rhizosphere microbiome

The process of domestication and subsequent plant breeding were key to support human population growth over the last decades. However, plant breeding has neglected the important role of the rhizosphere microbiome on plant performance. In this context, this research aimed the study of common bean rhizosphere microbiome in a wild and in a cultivated genotype to determine the composition and functionality of their microbial community. We tested the hypothesis that ancestor materials have higher ability to host beneficial microorganisms in the rhizosphere when compared to modern cultivars. The common bean genotype IAC Alvorada and wild common bean Wild Mex were grown in highly biodiverse soil (Amazonian Dark Earth – ADE) and the total DNA from bulk soil and each common bean rhizosphere was extracted for sequencing by using Illumina MiSeq platform. In addition, rhizosphere soil was also used to isolate and select antagonistic bacteria against soil borne pathogens *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Using cultivation-dependent approach, 11 bacteria were isolated and showed antagonistic *in vitro* activity against the evaluated pathogens. The bacterial isolates were identified belonging to *Streptomyces, Kitasatospora, Alcaligenes, Achromobacter, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Brevibacillus* and *Paenibacillus* genus. The cultivation-independent approach revealed that microbial community composition in the Wild Mex bean rhizosphere was characterized by higher relative abundance of bacterial phyla Acidobacteria, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes and fungal phylum Glomeromycota when compared with IAC Alvorada cultivated bean, which showed a higher relative abundance of bacterial phyla Firmicutes, Planctomycetes, Deinococcus-Thermus and fungal phylum Ascomycota. Wild Mex rhizosphere microbiome showed higher relative frequency of nitrogen-fixing, nitrifying, antagonists and plant growth promoting microorganisms. The wild bean also showed higher relative abundance of functions related to nitrogen fixation, siderophore and indole acetic acid (IAA) production, when compared with IAC Alvorada bean. The distribution pattern observed in the functions ordination analysis of Wild Mex was different from the bulk soil and IAC Alvorada patterns. The results showed that wild genotype is more selective for recruiting microorganisms and functions in the rhizosphere when compared with modern cultivar. In conclusion, the results revealed that domestication and plant breeding potentially undermined rhizosphere microbiome composition and functions debilitating the host's ability to select and support beneficial microbes.

Keywords: Wild common bean; Metagenome; Rhizobacteria; Microbial communities

RESUMEN

Composición y funcionalidad del microbioma de la rizosfera del fréjol silvestre y cultivado

El proceso de domesticación y posterior mejoramiento de las plantas cultivadas fueron esenciales para el sustento del crecimiento poblacional observado en la reciente historia de la humanidad. Sin embargo, en el proceso de mejoramiento de los cultivos no fue considerado el importante papel que el microbioma rizosférico desempeña en las plantas. En este contexto, esta investigación fue direccionada al estudio del microbioma rizosférico del fréjol, considerando un genotipo silvestre y otro cultivado, a fin de determinar la composición y funcionalidad del microbioma en cada rizosfera. De ese modo, para probar la hipótesis de que materiales ancestrales tienen mayor capacidad de hospedar microorganismos benéficos en la rizosfera al ser comparados con variedades modernas, los genotipos de fréjol cultivado IAC Alvorada y silvestre Wild Mex fueron cultivados en *Terra Preta da Amazonia* (TPA), suelo caracterizado por abrigar una gran diversidad microbiana. El ADN total del suelo rizosférico de cada genotipo de fréjol y del *bulk soil* fue extraído para realizar la secuenciación metagenómica usando la plataforma *Illumina MiSeq*. El suelo rizosférico también fue usado para aislar y seleccionar bacterias antagonistas contra hongos radiculares patógenos del fréjol, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. El abordaje dependiente de cultivo permitió recuperar 11 bacterias que presentaron actividad antagónica *in vitro* contra los patógenos evaluados, los aislamientos bacterianos fueron identificados como pertenecientes a los géneros: *Streptomyces, Kitasatospora, Alcaligenes, Achromobacter, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Brevibacillus* y *Paenibacillus*. El abordaje independiente de cultivo reveló que la composición de la comunidad microbiana en la rizosfera del fréjol silvestre Wild Mex fue caracterizada por la alta abundancia relativa de los filos bacterianos Acidobacteria, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes, y del filo fúngico Glomeromycota al ser comparada con la composición de la rizosfera del genotipo cultivado IAC Alvorada, la cual estuvo constituida en mayor proporción por los filos bacterianos Firmicutes, Planctomycetes, Deinococcus-Thermus y por el filo fúngico Ascomycota. En el nivel taxonómico de género, la comunidad microbiana de la rizosfera del fréjol silvestre Wild Mex presentó mayor frecuencia relativa de géneros fijadores de nitrógeno, nitrificadores, antagonistas y promotores del crecimiento vegetal. La rizosfera del fréjol silvestre Wild Mex presentó mayor abundancia relativa de funciones relacionadas con la fijación de nitrógeno, producción de sideróforos y de ácido indol acético (AIA), al ser comparada con el genotipo cultivado IAC Alvorada. El patrón de distribución observado en el análisis de ordenación de las funciones del microbioma de la rizosfera del fréjol silvestre Wild Mex fue diferente del patrón encontrado en el *bulk soil* e en la rizosfera del fréjol cultivado IAC Alvorada. Los resultados indicaron que el genotipo silvestre es más selectivo en el reclutamiento de microorganismos y funciones observadas en la rizosfera en comparación con el cultivar moderno. En conclusión, los resultados revelaron que el proceso de domesticación y mejoramiento genético de las plantas cultivadas potencialmente debilitó la capacidad del hospedero en seleccionar y sustentar microorganismos y funciones benéficas en la rizosfera.

Palabras clave: Fréjol silvestre; Metagenoma; Rizobacterias; Comunidades microbianas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bioensaio em casa de vegetação com feijão genótipo cultivado IAC Alvorada (etiquetas com I) e genótipo selvagem Wild Mex (etiquetas com W) 36

Figura 2 – Esquema da metodologia desenvolvida na pesquisa em casa de vegetação e laboratório 37

Figura 3 – Abundância de Unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo seco na rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e feijão selvagem Wild Mex (WM), quantificadas em meio de cultura TSBA 45

Figura 4 – Dendrograma dos 104 isolados bacterianos da rizosfera de feijão genótipo selvagem Wild Mex (verde) e cultivado IAC Alvorada (laranja) calculado com 10.000 bootstrap e índice de Jaccard. Os isolados antagonistas estão identificados com a letra A 47

Figura 5 – Inibição do crescimento micelial dos fungos patógenos do feijão *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* pelas bactérias antagonistas isoladas das rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada e feijão selvagem Wild Mex 49

Figura 6 – Árvore filogenética construída a partir do sequenciamento parcial do gene 16*S* rRNA dos isolados bacterianos e das cepas de referência do banco de dados *NCBI*, usando o método de Inferência Bayesiana no programa *MrBayes*. Os códigos dos isolados aparecem em negrito e sublinhados, acompanhados das acessões mais similares encontradas no banco de dados *EzTaxon* 50

Figura 7 – Curvas de rarefação geradas no MG-RAST a partir dos dados do sequenciamento metagenômico do DNA das amostras de *bulk soil* (BS), rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e rizosfera de feijão selvagem Wild Mex (WM) 52

Figura 8 – Número de sequências (Log10) de Bacteria, Archaea, Eukaryota Virus e sequências não classificadas anotadas no MG-RAST a partir dos dados do sequenciamento metagenômico do DNA das amostras de *bulk soil* (BS), rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e rizosfera de feijão selvagem Wild Mex (WM) 53

Figura 9 – Análise de Componentes Principais (PCA) de filos de Bacteria (A), Archaea (B) e Fungi (C) em *bulk soil* e rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada e feijão selvagem Wild Mex 55

Figura 10 – Frequência relativa média (n = 5) dos filos de Bacteria no *bulk soil* (BS) e nas rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e feijão selvagem Wild Mex (WM) (* indica diferença estatística, $p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) 57

Figura 11 – Frequência relativa média (n = 5) dos gêneros fixadores de nitrogênio significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre o *bulk soil* (BS) e as rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e feijão selvagem Wild Mex (WM) 66

Figura 12 – Frequência relativa média (n = 5) dos filos de Archaea no *bulk soil* (BS) e nas rizosferas de feijão tipo cultivado IAC Alvorada e feijão selvagem Wild Mex (WM) 76

Figura 13 – Frequência relativa média (n = 5) dos filos da subdivisão Fungi no *bulk soil* (BS) e nas rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada e feijão selvagem Wild Mex (WM) (* indica diferença estatística de acordo ao teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) 80

Figura 14 – Frequência relativa média (n = 5) dos gêneros de Glomeromycota significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre o *bulk soil* (BS) e as rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e feijão selvagem Wild Mex (WM) 84

Figura 15 – Diagramas de box-plot da frequência relativa e valor p (teste de Kruskal-Wallis) dos gêneros correspondentes aos isolados bacterianos antagonistas de fungos patógenos do feijão encontrados nos dados metagenômicos de *bulk soil* (cor azul), rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada (cor laranja) e rizosfera de feijão selvagem Wild Mex (cor verde) 86

Figura 16 – Análise de agrupamento da classificação funcional usando *heatmap* gerado no MG-RAST segundo o banco de dados *SEED Subsystems* e baseado na abundância de proteínas funcionais no subsistema Nível 1 (BS: *bulk soil;* IA: rizosfera IAC Alvorada; WM: rizosfera Wild Mex) 96

Figura 17 – Análise de Componentes Principais (PCA) das funções anotadas com o banco de dados *SEED Subsystems* nas amostras de *bulk soil*, rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada e feijão selvagem Wild Mex 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades químicas da Terra Preta da Amazônia (TPA) utilizada no experimento 36

Tabela 2 – *Primers* da região 16*S* rRNA utilizados nas reações para sequenciamento da6 bactérias antagonistas 42

Tabela 3 – Identificação dos isolados bacterianos antagonistas a partir do sequenciamento parcial do gene 16*S* rRNA e porcentagem de inibição do crescimento (PIC) micelial dos fungos patógenos do feijão *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 48

Tabela 4 – Valores médios (n = 5) dos dados do sequenciamento metagenômico das amostras de *bulk soil* de TPA anotados pelo MG-RAST 51

Tabela 5 – Valores médios (n = 5) da riqueza de espécies (domínios Bacteria, Archaea e subdivisão Fungi) e índices de diversidade nas amostras de *bulk* soil (BS) e rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e de feijão selvagem Wild Mex (WM) 53

Tabela 6 – Filos de Bacteria significativamente diferentes (p < 0,05, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média (n = 5) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e feijão selvagem Wild Mex (% WM) 57

Tabela 7 – Gêneros de Bacteria significativamente diferentes (p < 0,05, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média (n = 5) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM) 62

Tabela 8 – Gêneros de Archaea significativamente diferentes (p < 0,05, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média (n = 5) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM) 76

Tabela 9 – Filos da subdivisão Fungi significativamente diferentes (p < 0,05, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média (n = 5) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM) 80

Tabela 10 – Gêneros de Fungi significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média ($n = 5$) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM) 81

Tabela 11 – Funções relacionadas com nutrição, produção de antibióticos e promoção de crescimento vegetal significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média ($n = 5$) no *bulk soil* (% BS) e nas rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM) 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato
ADE	Amazonian Dark Earth
AIA	Ácido Indol-3-Acético
AOA	Ammonia-Oxidizing Archaea
AOB	Ammonia-Oxidizing Bacteria
BS	Bulk soil
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CONAB	Companhia Nacional de Desenvolvimento
Fd	Ferredoxin
IA	IAC Alvorada
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
MG-RAST	Metagenome Rapid Annotation using Subsystem Technology
NOB	Nitrite-Oxidizing Bacteria
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PAST	Paleontological Statistics
PCA	Principal Component Analysis
PCP	Pentachlorophenol
Phl	2,4-diacetil floroglucinol
Pho	Fosfato
Plt	Pioluteorina
Pn	Fosfonato
Pvd	Pioverdina
Pyr, Prn	Pirrolnitrina
STAMP	Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles
TPA	Terra Preta da Amazônia
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WM	Wild Mex

1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola mundial aumentou significativamente à custa de inovações tecnológicas no período denominado "revolução verde", um modelo de produção demandante de grande quantidade de energia e capital e com enorme custo ambiental (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Portanto, o estudo e exploração eficaz dos processos de base naturais, que incluem o microbioma rizosférico das culturas, permitirá o desenvolvimento de sistemas agrícolas com reduzidos efeitos prejudiciais, máximos efeitos benéficos e com menor dependência de energia (insumos, recursos) (SMITH et al., 1999).

Os processos que ocorrem abaixo e acima da superfície do solo influenciam a manutenção das propriedades dos ecossistemas terrestres (De DEYN; PUTTEN, 2005). Ambos os componentes, superficial e subterrâneo, estão rigorosamente inter-relacionados no nível de comunidade e reforçados por um maior grau de especificidade entre plantas e micro-organismos do solo. A combinação do enfoque superficial e subterrâneo na ecologia da comunidade microbiana e do ecossistema melhora a compreensão tanto da importância regulatória e funcional que tem a biodiversidade bem como dos impactos ambientais induzidos pelo homem (WARDLE et al., 2004).

As plantas sintetizam uma grande diversidade de metabólitos secundários e podem modular suas atividades metabólicas para responder aos estresses bióticos ou abióticos (FLORES et al., 1999). A produção de rizodepósitos é um importante elemento no estudo das interações que ocorrem na rizosfera (D'AURIA; GERSHENZON, 2005). Vários desses metabólitos podem ajudar na prevenção de infecções por patógenos nas plantas (OBLESSUC et al., 2012). Por outro lado, a área radicular das plantas, que pode ser maior do que a aérea, é capaz de fornecer uma grande quantidade de recursos para os micro-organismos e outros habitantes do solo que são considerados como os condutores da diversidade vegetal e da funcionalidade do ecossistema (De DEYN; PUTTEN, 2005; MALAMY, 2005).

Os resultados de estudos sobre as comunidades microbianas na rizosfera de genótipos selvagens, ancestrais e modernos de: feijão (SOUZA et al., 1997), milho (SCHMALENBERGER; TEBBE, 2002), batata (DIAS et al., 2013), tomate (SMITH et al., 1999), beterraba (SACHOW et al., 2014), canola e trigo (SICILIANO et al., 1998; GERMIDA; SICILIANO, 2001; ZHU et al., 2001), demonstram que a variação genética das plantas afeta as interações benéficas com os micro-organismos, as quais têm sido resultado da coevolução a longo prazo (GEPTS, 2004) e que o melhoramento genético de plantas poderia ter comprometido a capacidade de hospedar e sustentar micro-organismos benéficos na rizosfera dos cultivares modernos (ZHU et al., 2001).

Nesse contexto, este trabalho esteve orientado ao estudo da composição e funcionalidade da comunidade microbiana na rizosfera do feijão selvagem e cultivado, visando elucidar a seletividade de micro-organismos em ambos os genótipos a partir das abordagens dependente e independente de cultivo.

1.1 Hipótese e Objetivos

Este estudo foi desenvolvido sob a hipótese que genótipos selvagens de plantas hospedam um microbioma na rizosfera que lhes permite melhor desenvolvimento vegetal quando comparado ao microbioma rizosférico de genótipos melhorados, isto é, cultivares. Como a seleção de micro-organismos na rizosfera foi uma característica negligenciada nos programas de melhoramento, sugere-se que os genes responsáveis pela comunicação com os micro-organismos foram perdidos no processo de melhoramento vegetal e consequentemente materiais ancestrais teriam maior capacidade de atrair e sustentar micro-organismos benéficos.

O objetivo geral deste estudo foi elucidar a composição e funcionalidade da comunidade microbiana da rizosfera de um genótipo de feijão selvagem e de um cultivado, plantados em um solo com alta riqueza microbiológica (Terra Preta da Amazônia) em casa de vegetação por meio de sequenciamento metagenômico do DNA rizosférico e isolamento em meio de cultivo.

Os objetivos específicos foram:

- Isolar, selecionar, caracterizar e identificar molecularmente isolados bacterianos das rizosferas de feijão selvagem Wild Mex e cultivado IAC Alvorada com atividade antagonista contra patógenos radiculares do feijão.
- Determinar a composição da comunidade microbiana da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex e do cultivado IAC Alvorada por sequenciamento metagenômico.
- Identificar as principais funções de promoção do crescimento vegetal da comunidade microbiana na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex e do cultivado IAC Alvorada por sequenciamento metagenômico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Feijão Comum - *Phaseolus vulgaris* L.

O feijão comum é uma leguminosa comestível que representa 50% dos grãos de leguminosas consumidos no mundo (McCLEAN et al., 2004; ARAGÃO et al., 2011). Tem grande importância na segurança alimentar devido a seu alto conteúdo nutritivo (proteína, fibra, carboidratos, vitaminas e micronutrientes) (CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT, 2010). No Brasil e o México, o feijão é um dos componentes da base alimentar como fonte de proteína para a dieta humana (BROUGHTON et al., 2003; McCLEAN et al., 2004). Em 2004 o Brasil tornou-se o maior produtor de feijão no mundo com participação de 16,3% na produção mundial (EMBRAPA, 2005). Considerando as três safras no período 2013/2014, estima-se que a área cultivada no Brasil foi de 3,3 milhões de hectares com produção média anual de 3,4 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

2.1.1 Origem e domesticação do feijão comum

O feijão tem sua origem na América sendo a Mesoamérica ou América Central (México, também Colômbia e Venezuela) e os Andes na América do Sul (Equador, Peru, Bolívia, Chile e Argentina) os lugares geográficos de origem e domesticação do feijão (DEBOUCK et al., 1993; GEPTS, 1998; McCLEAN et al., 2004; BITOCCHI et al., 2012; SINGH et al., 2014). A transição do feijão selvagem ao cultivado é estimada que aconteceu há 7.000 e 5.000 anos (GEPTS, 2004; PATHANIA et al., 2014). Os bancos genéticos sul-americanos tiveram sua origem através de eventos migratórios desde a Mesoamérica, sendo o México o berço da sua diversidade (BROUGHTON et al., 2003; DESIDERIO et al., 2013). Adicionalmente, a região Norte-Central da Espanha e o Brasil são considerada centros secundários da diversidade do feijão (SANTALLA et al., 2002; BURLE et al., 2010).

Tem sido proposta uma classificação em raças do feijão comum segundo os grandes grupos. Assim, o grupo Mesoamericano abrange as raças: Durango, Jalisco e Mesoamericano enquanto o grupo Andino abrange as raças Chile, Nueva Granada e Peru (BROUGHTON et al., 2003; ARAGÃO et al., 2011; PATHANIA et al., 2014).

A domesticação é resultado do processo de seleção que leva ao incremento da adaptação das plantas para serem cultivadas e utilizadas pelo homem. Características desejáveis como: a perda da habilidade de dispersão e dormência das sementes, o crescimento determinado, a maturidade antecipada (ARAGÃO et al., 2011; GEPTS, 2004), a alta qualidade de vagens, o rendimento de sementes e a resistência a doenças, em comparação com os parentes selvagens,

têm sido incorporadas aos cultivares modernos de feijão (GEPTS, 1998; BROUGHTON et al., 2003; PATHANIA et al., 2014). No entanto, ainda persistem importantes limitações bióticas (doenças causadas por fungos, bactérias e vírus) (GEFFROY et al., 1999) e abióticas (seca e deficiência de fósforo) na produção de feijão (ARAGÃO et al., 2011; CORTÉS et al., 2012; PATHANIA et al., 2014).

As variedades crioulas constituem populações variáveis com um nome local, não passaram por um processo de melhoramento "formal" e caracterizam-se por ser tolerantes a estresses bióticos e abióticos (PATHANIA et al., 2014; BURLE et al., 2010). A maioria dessas variedades estão em risco de extinção devido à substituição gradual da agricultura local, indígena ou tradicional pela agricultura industrial (PATHANIA et al., 2014; SOUZA et al., 1997). Já os cultivares comerciais são resultado de cruzamentos entre cultivares estreitamente relacionados pertencentes a um dos bancos genéticos mesoamericano ou andino e possuem baixos níveis de diversidade genética quando comparados com acessos crioulos e selvagens (GEPTS, 1998; BROUGHTON et al., 2003; PATHANIA et al., 2014).

2.1.2 Patógenos radiculares do feijão

As podridões nas raízes do feijoeiro estão amplamente distribuídas e são economicamente importantes no mundo. A severidade e dano pelas doenças radiculares no feijão são maiores quando o ambiente é favorável e existem condições de estresse como seca, excesso de água, lesões ou infecções por outros patógenos. A podridão radicular por *Rhizoctonia solani* Kühn e a murcha e amarelamento por *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, têm-se tornado as doenças de maior importância no feijoeiro por causar severa redução do crescimento e grandes perdas nos rendimentos (ABAWI; PASTOR, 1990).

2.1.2.1 *Rhizoctonia solani* Kühn

A podridão da raiz por *Rhizoctonia solani* é uma doença comum do feijão. As perdas acontecem pela podridão da semente ou pela morte das mudas (*damping-off*). As lesões iniciais nas mudas aparecem no hipocótilo e coifa como um cancro marrom afundado (ABAWI, 1994). Os isolados de *R. solani* têm características de um micélio marrom, há uma constrição basal nas ramificações das hifas, formam septos proeminentes nas novas ramificações perto do ponto de origem e mostram uma condição multinucleada da nova célula da hifa apical. A maioria dos isolados produzem esclerócios (estruturas de sobrevivência) soltos ao longo das hifas nos tecidos do hospedeiro (ABAWI; PASTOR, 1990; SNEH et al., 1996). O patógeno pode penetrar o tecido intacto da planta ou através das aberturas naturais e ferimentos. A disseminação a novas

áreas é dada através da plantação de sementes contaminadas ou pelo movimento de tecidos infectados, solo ou detritos colonizados mediante a água de irrigação, vento e animais (CIAT, 1987; ABAWI, 1994).

Os isolados que causam a podridão da raiz geralmente pertencem aos grupos de anastomose (AG) 2 ou 4. Porém, umas poucas cepas do AG 1 têm sido reportadas como causantes da doença (ABAWI; PASTOR, 1990; ÇEBİ KILIÇOĞLU; ÖZKOÇ, 2010).

2.1.2.2 *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick and Snyder

O amarelamento ou murchamento por *F. oxysporum* é uma doença destrutiva em feijão. (CIAT, 1987; ABAWI, 1994). Os sintomas desta doença dependem da severidade dos pontos da infecção e das condições ambientais, principalmente temperatura. Este patógeno é separado dos outros membros das espécies de *F. oxysporum* pela adaptação fisiológica e patológica ao feijão (ABAWI, 1994). As plantas severamente afetadas tornam-se cloróticas, as folhas murcham e têm senescência prematura. O desenvolvimento sintomático é unilateral segundo à locação dos vasos xilemáticos infectados e seu arranjo no sistema vascular. Além disso, os sintomas na planta geralmente progridem de abaixo para acima. Os caules e pecíolos mortos têm uma cor rosa laranja, pela produção das massas de esporos. As plantas apresentam uma descoloração vascular marrom observada no corte do caule e tecidos radiculares. Os sintomas progridem rapidamente, resultando em defoliação; a morte da planta ocorre entre três e quatro semanas após inoculação (ABAWI; PASTOR, 1990; ABAWI, 1994).

Os isolados caracterizam-se pela abundante produção de micélio aéreo, conidióforos ramificados (esporodóquios) e três tipos de esporos assexuais (microconídios, macroconídios e clamidosporas). O patógeno geralmente ataca perto da ponta das raízes, justo atrás da coifa. A penetração pode acontecer através de ferimentos e aberturas naturais sobre as raízes e caules. A disseminação ocorre através da movimentação de hospedeiros infectados, detritos colonizados, sementes ou solo infestado, pelo vento, água de irrigação ou outros meios (ABAWI; PASTOR, 1990; ABAWI, 1994; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Têm sido descritas cinco raças patogênicas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e existe uma relação entre as raças e a origem geográfica para as raças 2 a 5, sendo a raça 1 uma exceção, pois têm isolados da Carolina do Sul (USA) e de Portici (Itália) (ALVES-SANTOS et al., 2002). A raça 2 inclui isolados do Brasil, raça 3 da Colômbia (WOO et al., 1996), raça 4 de Colorado (USA) (SALGADO et al., 1995) e a raça 5 da Grécia (ALVES-SANTOS et al., 2002).

2.1.3 Supressividade de doenças

Têm sido desenvolvidos vários estudos sobre a variação entre os genótipos de plantas e culturas para que, a supressividade de doenças (MAZZOLA; GU, 2002; MENDES et al., 2011), colonização da rizosfera (RENGEL et al., 1998; LIU et al., 2014), nutrição, promoção do crescimento (ZHU et al., 2001; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; NIHORIMBERE et al., 2011) e indução de resistência sistêmica (MEERA et al., 1995; FOLEY et al., 2013), ocorra através de micro-organismos antagonistas introduzidos (WHIPPS, 2001). Também tem sido encontrado que a variação genética entre os hospedeiros vegetais pode ser aproveitada para reforçar associações benéficas entre plantas e micro-organismos, pois é possível que o melhoramento de culturas pudesse não ter selecionado características para hospedar e sustentar micro-organismos benéficos (SMITH et al., 1999; ZHU et al., 2001; MAZZOLA; GU, 2002).

Um solo supressivo é onde as plantas não sofrem certas doenças ou onde a severidade da doença é reduzida embora um patógeno esteja presente e o hospedeiro seja susceptível à doença; o oposto ao solo supressivo é o solo conducivo (HAAS; DÉFAGO, 2005).

Na maioria dos solos, a supressão de doenças é atribuída à origem do solo e a um consórcio microbiano no solo que inibe o crescimento ou atividade do patógeno em alguma etapa do ciclo de vida da planta. Os mecanismos de supressividade dos patógenos incluem a competição por nutrientes e micro-sítios, parasitismo, micoparasitismo e amensalismo (antibiose) (MENDES et al., 2011; MAZZOLA, 2002; PHILIPPOT et al., 2013; TURNER et al., 2013). Bactérias de novas categorias taxonômicas poderiam servir como indicadoras de supressividade e o espectro de categorias hipotéticas que participam na supressividade de doenças poderia ser mais amplo (KYSELKOVÁ et al., 2009; TURNER et al., 2013).

As bactérias da rizosfera com capacidade de proporcionar controle biológico parecem ser menos de 10% do total da população bacteriana na rizosfera (WELLER, 1988). Em vários trabalhos de supressividade de doenças em beterraba, batata e tabaco, a família bacteriana Pseudomonadaceae desempenha um papel fundamental dentro do *core* microbiano associado à supressão. Porém, o sucesso da inoculação com micro-organismos benéficos na agricultura tem sido limitado devido ao fato de que a supressão de doenças em plantas é dada por um consórcio de micro-organismos e não por apenas um ou pela combinação de poucos isolados (WELLER et al., 2002; MENDES et al., 2011; GOPAL et al., 2013).

2.2 O Microbioma da Planta

As comunidades de micro-organismos associadas às plantas são referidas como o microbioma da planta ou como o "outro genoma" da planta (MENDES et al., 2013; TURNER et al., 2013). Esse microbioma tem um impacto direto sobre as plantas; assim características funcionais, novas vias nutricionais e de defesa podem reforçar ou diminuir a coexistência das espécies e em consequência influir tanto numa única planta como no ecossistema inteiro (TURNER et al., 2013; BERG et al., 2014).

A superfície da planta e tecidos internos são colonizados por micro-organismos que desempenham um papel importante na formação de micro-ecossistemas (BERG et al., 2014), regiões onde existe a interação entre componentes bióticos e abióticos e que são denominados segundo o local na planta como espermosfera (semente), rizosfera (raiz), caulosfera (caule), filosfera (folha), antosfera (flor), carposfera (fruto) e endosfera (tecidos internos).

A espermosfera é uma zona que está influenciada pela deposição de carbono no processo de germinação da semente, onde acontece o primeiro contato dos micro-organismos com as plantas e essas interações marcam impactos duradouros sobre o crescimento e saúde vegetal. As sementes em germinação são colonizadas por populações microbianas autóctones (10^5 a 10^6 células por semente) em poucas horas após plantio (NELSON, 2004).

A filosfera representa a interface entre as partes aéreas das plantas e o ar. Esse hábitat com condições estressantes como a radiação UV, luz solar, mudanças na temperatura, a presença e a composição química de estruturas foliares, tornam-no um ambiente oligotrófico. O genótipo da planta é um importante fator que influencia a composição bacteriana na filosfera (VORHOLT, 2012). As superfícies das folhas são colonizadas por mais de 10^7 micro-organismos por cm^2. Nos níveis taxonômicos superiores, os microbiomas da filosfera parecem ser similares, mas no nível de espécie e cepas aparecem grandes diferenças. Proteobacteria (classes α e γ) é o filo bacteriano dominante, junto com Bacteroidetes e Actinobacteria que geralmente são encontrados (DELMOTTE et al., 2009; TURNER et al., 2013).

A endosfera é uma zona habitada por micro-organismos que residem pelo menos uma parte ou toda sua vida dentro dos tecidos vegetais e são chamados de endofíticos (TURNER et al., 2013). No sistema radicular certos micro-organismos têm mecanismos específicos para uma penetração ativa no sistema radicular que são mediados pela quimiotaxia em relação aos exsudatos e sinais microbianos como acontece com as bactérias simbióticas formadoras de nódulos (COMPANT et al., 2010). Turner et al. (2013) encontraram que Actinobacteria e algumas famílias de Proteobacteria foram enriquecidas na endosfera ao ser comparada com a rizosfera de *Arabidopsis thaliana*. Em caules e folhas os micro-organismos endofíticos atingem

populações cultiváveis de 10^3 a 10^4 UFC g^{-1} de peso fresco em condições naturais. Em flores e frutos as populações de bactérias endofíticas chegam a 10^2 a10^3 UFC g^{-1} de peso fresco o que indica que apenas colonizadores especializados podem colonizar e sobreviver em órgãos reprodutivos vegetais (COMPANT et al. 2010).

2.2.1 O microbioma da rizosfera

A rizosfera é a área de solo influenciada diretamente pelas raízes das plantas através do fornecimento de exsudatos que permite manter populações microbianas que interagem entre si desempenhando funções prejudiciais ou benéficas para as plantas (WHIPPS, 2001; RAAIJMAKERS et al., 2002; PHILIPPOT et al., 2013).

As raízes das plantas, através dos exsudatos, estimulam seletivamente e sustentam aos micro-organismos, regulam as comunidades microbianas benéficas que protegem às plantas de infecções apesar de se encontrar em ambientes com patógenos (WELLER et al., 2002). Isto é produto de uma ativa comunicação entre plantas e micro-organismos e vice-versa e incluso com outras plantas (BAIS et al., 2004; LAU; LENNON, 2011).

O tipo de solo, cultivar e endofíticos, são considerados como os principais condutores da montagem do microbioma rizosférico (GOTTEL et al., 2011; LUNDBERG et al., 2012; PHILIPPOT et al., 2013). O solo é considerado como o reservatório de micro-organismos, pelas propriedades físico-químicas e os processos biogeográficos que nele se desenvolvem (NIHORIMBERE et al., 2011; BOUFFAUD et al., 2012; SCHREITER et al., 2014); o cultivar influencia o microbioma da rizosfera através da morfologia da raiz e com a quantidade e tipo de rizodepósitos (MILLING et al., 2004; HAICHAR et al., 2008; DIAS et al., 2013; ZACHOW et al., 2014). Já os endofíticos das sementes, podem estar presentes por um recrutamento de micro-organismos específicos (*core*) que pode ser transmitido de uma geração a outra (PHILIPPOT et al., 2013).

Algumas bactérias variam quantitativamente entre plantas de diferentes estágios de desenvolvimento e genótipo (MOUGEL et al., 2006; CHAPARRO et al., 2014). Estudos demonstram que a interação de diversas comunidades do solo com as plantas está envolvida na montagem do microbioma rizosférico (LUNDBERG et al., 2012; PHILIPPOT et al., 2013).

No rizoplano há mais micro-organismos do que no resto da rizosfera associada. Tem sido reportado que por cada grama de solo rizosférico há entre 10^6-10^9 bactérias e 10^5-10^6 fungos (SYLVIA et al., 2005). Estudos de microbiomas rizosféricos têm revelado distribuições similares de filos microbianos, porém existem maiores diferenças entre as plantas cultivadas quando são comparados níveis taxonômicos mais baixos como espécies microbianas e cepas

(TURNER et al., 2013). O filo Proteobacteria (classes α e β) geralmente é dominante nas amostras. Outros grandes grupos incluem Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrumicrobia e Acidobacteria (NIHORIMBERE et al., 2011; TURNER et al., 2013).

Muitos estudos descreveram que Proteobacteria é dominante no microbioma da rizosfera. Fungos dos filos Ascomycota (ordem Hypocreales) e Glomeromycota (*Glomus* spp.) também podem responder rapidamente aos rizodepósitos (PHILIPPOT et al., 2013; SANGABRIEL-CONDE et al., 2014).

García-Salamanca et al. (2012), mostraram que a comunidade bacteriana no *bulk soil* foi mais complexa do que na rizosfera. As diferenças entre os estudos sobre diversidade entre rizosfera e *bulk soil* são produto não somente da variabilidade biológica, mas também dos métodos de amostragem (GARCÍA-SALAMANCA et al., 2012; PHILIPPOT et al., 2013).

2.2.2 Rizodepósitos

Estima-se que 12-40% do total de carboidratos produzidos pela fotossíntese é liberado no solo circundante das raízes (LYNCH; WHIPPS, 1990; NIHORIMBERE et al., 2011; HIRSCH et al., 2013). Durante e após a exsudação, os materiais orgânicos sofrem um ataque microbiano o que faz difícil a identificação da composição química e da concentração nos ambientes naturais (KAMILOVA et al., 2006). Os rizodepósitos incluem uma ampla variedade de compostos (nutrientes, exsudatos, enzimas, restos de células epidérmicas e mortas, mucilagem) que são liberados pelas raízes das plantas e atuam como moléculas quimioatraentes ou repelentes (LAMBERS et al., 2009; NIHORIMBERE et al., 2011; GARCÍA-SALAMANCA et al., 2012; PHILIPPOT et al. 2013).

A composição dos exsudatos radiculares é um determinante essencial da estrutura do microbioma rizosférico e pode variar entre as espécies de plantas e com a fase fenológica (CHAPARRO et al., 2014). Porém, também o microbioma influi sobre os exsudatos radiculares, pois plantas crescidas axenicamente têm diferenças marcantes nas composições dos exsudatos quando comparadas com plantas crescidas na presença de micro-organismos (TURNER et al., 2013). Os exsudatos radiculares podem ser divididos em compostos de baixo peso molecular como, aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, fenóis entre outros metabólitos secundários e compostos de alto peso molecular, tais como, mucilagem (polissacarídeos) e proteínas, que são menos diversos e compõem uma proporção maior dos exsudatos radiculares pela massa deles (BAIS et al., 2006).

Os exsudatos radiculares de *Arabidopsis* variam segundo a idade da planta. Nas etapas iniciais, existe acúmulo de álcool e açúcares que logo vão diminuindo, por outro lado, aminoácidos e compostos fenólicos vão incrementando ao longo do tempo. Isto pode indicar que nas etapas iniciais as raízes liberam açúcares como substrato para uma ampla diversidade de micro-organismos e depois a planta libera substratos específicos para selecionar certos micro-organismos que habitarão na rizosfera (CHAPARRO et al., 2014).

2.3 Terra Preta da Amazônia

Mais frequentemente na Amazônia brasileira do que na Amazônia colombiana, venezuelana e peruana, é possível encontrar manchas de solo com um horizonte superficial espesso e de coloração preta ou marrom escura, com pedaços de cerâmicas e recobrindo solos cauliníticos intemperizados (SOMBROEK et al., 2009). Reconhecidos por sua alta fertilidade, tais solos são comumente conhecidos como Terra Preta de Índio (TPI) ou também chamada de Terra Preta Antrópica ou Terra Preta da Amazônia (TPA).

As TPA foram criadas pelas populações ameríndias há aproximadamente 500-2.000 anos. A TPA foi desenvolvida de acordo com as práticas de subsistência e padrões de depósito de resíduos de assentamentos indígenas pré-colombianos na Amazônia que enriqueceram o solo em nutrientes. São solos classificados como Antrossolos, os quais foram formados ou fortemente modificados pelas atividades humanas tais como a adição de detritos domésticos e de culturas (sangue, ossos, fezes, carvão vegetal, cinza, restos de culturas) (NEVES et al., 2004; FERREIRA, 2012). Esse tipo de solo pode ser encontrado numa ampla variedade de tipos de solos, desde os fortemente intemperados Ferrassolos até Nitossolos (KERN et al., 2004). Uma classificação arqueo-pedológica ainda experimental e incompleta é proposta para identificar este tipo de solo ancestral (WOODS, 2004).

2.3.1 Propriedades físico-químicas da TPA

Entre as propriedades físicas da TPA estão, por exemplo, sua coloração que vai da tonalidade preta até bruno acinzentada muito escura numa profundidade de pelo menos 50 cm. Essa propriedade é produto da quantidade e qualidade da matéria orgânica que possui esse solo. Os solos de TPA também apresentam uma densidade aparente baixa (1,08 g cm^{-3}) nas profundidades superiores do horizonte antrópico, a porosidade e o potencial de retenção de água são altos. (TEIXEIRA; MARTINS, 2004; FALCÃO et al., 2009).

Na capa superficial, os valores de pH variam entre 4,15 e 6,71 e são mais elevados comparados com os encontrados nos solos adjacentes (Latossolos e Argissolos) (MADARI et

al., 2004). O teor de fósforo disponível é muito elevado (150 mg kg^{-1}). As quantidades de bases trocáveis são mais elevadas do que nos solos da floresta, mas a saturação por bases é apenas moderadamente alta (20-70%) comparada com solos não enriquecidos e adjacentes (15%) (MADARI et al., 2004; FALCÃO et al., 2009). O teor de carbono orgânico que apresentam as TPA, contribui no melhoramento das propriedades físicas e químicas. A relação C:N da TPA atinge valores entre 12-40 (LEHMANN et al., 2004; SOMBROEK et al., 2004).

2.3.2 Microbiota associada a TPA

A fertilidade da Terra Preta da Amazônia é atribuída à microbiota existente nesse solo que tem permitido essa notável característica ao longo do tempo (O'NEILL et al., 2009). Recentemente, as características físicas e de fertilidade da TPA, têm recebido muita atenção nos estudos; porém, a microbiota existente nesses solos ainda deve ser amplamente descrita. Foi encontrado que as comunidades de Archaea e Bacteria são similares entre as TPA; isso sugere que essa composição microbiana está controlada mais pelo manejo histórico do solo do que pelo tipo ou uso atual do solo (GROSSMAN et al., 2010).

Em amostras de solo de TPA foram abundantes os filos Proteobacteria (24%), Acidobacteria (10%), Actinobacteria (7%), Verrucomicrobia (8%), Firmicutes (3%), Gemmatimonadetes (2,5%) e Nitrospira (0,5%), além dum grupo de bactérias não classificadas (36%) (TSAI et al., 2009; NAVARRETE et al., 2010).

Com métodos dependentes de cultivo aplicados em amostras de TPA do sítio Ilha de Terra (Caxiuanã, Pará), foi encontrado que os fungos são mais numerosos do que as bactérias. Bactérias do tipo de cocos Gram-negativos representaram a maior ocorrência da população total. Os testes de identificação mostraram a presença de gêneros bacterianos Gram-negativos: *Achromobacter, Flavobacterium, Nitrobacter, Nitrosomonas, Pseudomonas, Escherichia, Enterobacter* e *Celovibrio* e Gram-positivos: *Arthrobacter, Bacillus, Micrococcus, Streptomyces* e *Sarcina*. As populações de fungos encontrados em TPA compreendem os gêneros: *Mixotrichum, Rhizopus, Rhizomucor, Sporotrix, Trichoderma, Cladosporium, Penicillium, Mucor, Aspergillus, Fusarium, Geotrichum, Paecilomyces, Helminthosporium, Emmonsia, Epicocum, Chaetomium,* plectomicetos e ascomicetos. As espécies dos fungos predominantes foram *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Sclerotium* sp. e *Trichoderma* spp. (RUIVO et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

As sementes dos genótipos de feijão utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC). O genótipo cultivado IAC Alvorada tem crescimento indeterminado, porte semiereto, apresenta floração aproximadamente aos 38 dias após emergência, o ciclo de cultivo é de 92 dias, as flores são de cor branca e após a fecundação amarelo-desbotado. As sementes têm forma oblonga, o tegumento é marrom com rajas havana, a massa de 100 sementes está em torno de 27,5 g. O teor médio de proteína é 22%. Proveniente de cruzamentos múltiplos, foi lançado em 2007, o estande é de 200.000 a 240.000 plantas ha^{-1}, a produtividade média é de 2.430 kg ha^{-1} na safra de inverno (abril-junho com irrigação), 2.553 kg/ha na safra da seca (janeiro e fevereiro) e 2.810 kg $há^{-1}$ na safra das águas (agosto e setembro), é moderadamente resistente à antracnose e indicado para plantio no Estado de São Paulo com exceção das regiões suscetíveis a geada (IAC, 2007).

Algumas características agronômicas do genótipo de feijão tipo selvagem, de origem mexicana, Wild Mex (Acesso IAC-789), foram obtidas com acompanhamento do desenvolvimento vegetal em casa de vegetação. Trata-se dum genótipo de crescimento indeterminado, flores de cor roxa, as vagens têm riscas na casca e quando amadurecidas apresentam cor marrom, contêm entre três e cinco sementes por vagem. As sementes têm forma oblonga, o tegumento é de cor cinza com rajas havana, a massa de 100 sementes é ~2,70 g.

3.2 Experimento em Casa de Vegetação

O bioensaio foi estabelecido em casa de vegetação na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Meio Ambiente, localizada em Jaguariúna (SP). Os vasos foram irrigados com água destilada de acordo com a necessidade e o experimento foi conduzido em uma temperatura ambiente média de 29,6ºC e 28% de umidade relativa. Antes do plantio, foram coletadas cinco amostras de *bulk soil* a partir de cinco vasos sorteados do experimento, com a finalidade de ter o *bulk soil* como referência para a comparação com o solo rizosférico. As amostras foram coletadas no centro do vaso, no ponto onde as sementes foram posteriormente plantadas. Foi plantada uma semente de cada genótipo de feijão num vaso de 1,5 L contendo TPA proveniente do sítio Hatahara (Amazônia Central, coordenadas geográficas: 03º 16' 28,45" S – 60º 12'17,14" W) em cinco repetições (Figura 1). As propriedades químicas da TPA são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades químicas da Terra Preta da Amazônia (TPA) utilizada no experimento

Atributo químico	TPA
pH ($CaCl_2$)	5,2
MO	53
P	509
Ca	138
Mg	14
Al	0
H+Al	49
SB	153
CTC	200,7

Fonte: Cannavan (2011)

Notas: Matéria orgânica (MO) em g dm^{-3}, fósforo em mg dm^{-3}, Ca, Mg, Al, H+Al (potencial de acidez), SB (soma de bases) e CTC (capacidade de troca catiônica (CTC) são representados em mmolc dm^{-3}, pH em $CaCl_2$

Figura 1 – Bioensaio em casa de vegetação com feijão genótipo cultivado IAC Alvorada (etiquetas com I) e genótipo selvagem Wild Mex (etiquetas com W)

As amostras do genótipo cultivado IAC Alvorada foram coletadas na fase de floração que ocorreu aos 57 dias após plantio. No caso do genótipo selvagem Wild Mex as amostras foram coletadas aos 78 dias após plantio quando houve formação de botões florais. A amostragem da

rizosfera de Wild Mex foi feita neste momento, pois foi observada a queda de alguns botões florais. É importante notar que não há diferença significativa no microbioma da rizosfera nas fases de emissão de botão floral e florescimento como demonstrado por Chaparro et al. (2014).

As plantas foram retiradas cuidadosamente de cada vaso e foram agitadas para tirar o máximo possível de solo em cada sistema radicular. Após, com a ajuda de uma espátula, o solo firmemente aderido às raízes, isto é, a rizosfera, foi coletado e transferido para um tubo cilíndrico de centrífuga de 50 ml.

Na Figura 2 está representado um esquema geral das etapas desenvolvidas nesta pesquisa.

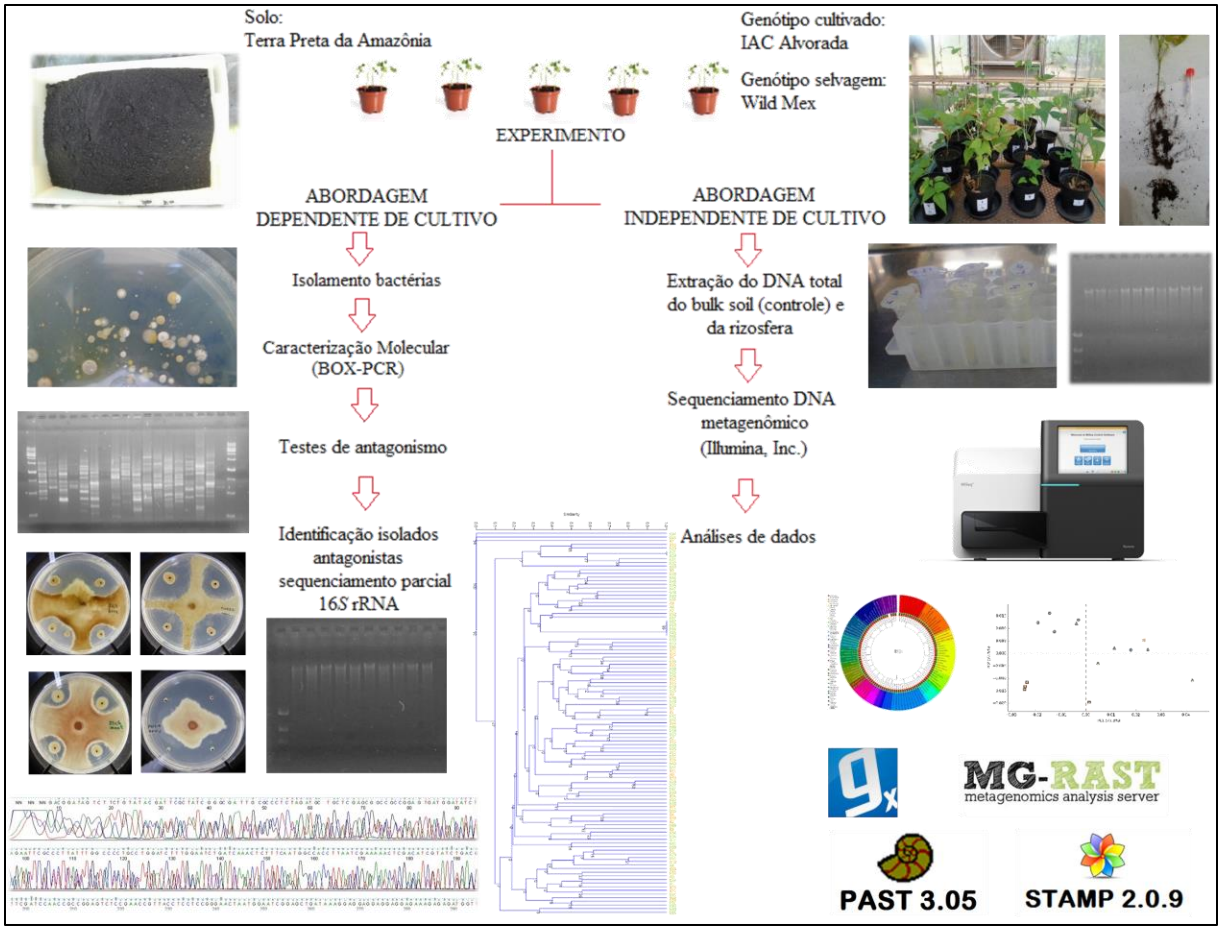

Figura 2 – Esquema da metodologia desenvolvida na pesquisa em casa de vegetação e laboratório

3.3 Abordagem Dependente de Cultivo

3.3.1 Isolamento de bactérias da rizosfera

O cultivo de bactérias foi feito em três tipos de meios de cultura:

1) Meio de cultura geral para bactérias: TSBA (Tripcaseína de Soja Agar) composto de 2,75 g L^{-1} de TSB (caldo de tripcaseína de soja) e 17,50 g L^{-1} de ágar, suplementado com 100 mg L^{-1} de cicloheximida $C_{15}H_{23}NO_4$; pH 7.
2) Para *Pseudomonas:* PSA (Peptona Sacarose Ágar) cuja composição é 20 g L^{-1} de sacarose $C_{12}H_{22}O_{11}$, 5 g L^{-1} de peptona, 0,5 g L^{-1} de fosfato de potássio K_2HPO_4, 0,25 g L^{-1} de sulfato de magnésio $MgSO_4.7H_2O$, 18 g L^{-1} de ágar (Hayward, 1960), 10 ml L^{-1} de glicerol $C_3H_5(OH)_3$, suplementado com 100 mg L^{-1} de cicloheximida $C_{15}H_{23}NO_4$, 12,5 mg L^{-1} de cloranfenicol $C_{11}H_{12}C_{l2}N_2O_5$ e 40 mg L^{-1} de ampicilina; pH 7,2-7,4.
3) Para *Actinobacteria:* meio GA (YANG et al., 2008): 15 g L^{-1} de amido solúvel de batata, 0,5 g L^{-1} de nitrato de potássio KNO_3, 0,5 g L^{-1} de fosfato de potássio K_2HPO_4, 0,5 g L^{-1} de sulfato de magnésio $MgSO_4.7H_2O$, 5 g L^{-1} de cloreto de sódio NaCl, 5 g L^{-1} de cloreto de potássio KCl, 0,01 g L^{-1} de sulfato de ferro $FeSO_4.7H_2O$, 18 de g L^{-1} de ágar; pH 7,0-7,4, adicionar 1 ml L^{-1} de solução de B-vitaminas de Nonomura e Ohara (1969) (cloridrato de tiamina, riboflavina, niacina, cloridrato de pirodoxina, inositol, pantotenato de cálcio, ácido para-aminobenzoico (0,005 g de cada) e biotina (0,0025 g) em 10 ml de água *Milli-Q* autoclavada).

Foram preparadas diluições seriadas de 10^{-1} até 10^{-5} com a rizosfera. Um grama de rizosfera de cada planta (réplica) foi suspendido em 9 ml de solução salina de NaCl (0,85% p/v) autoclavada. Os tubos foram colocados em ultrassom (*Ultra Cleaner 1.400 A*) a 40 kHz de frequência durante 1 min e logo agitados em vórtex durante 10 min para obter a diluição 10^{-1} a partir da qual foram feitas as demais diluições. Foi colocado em placa Petri (Ø 90 cm) 0,1 ml das diluições 10^{-4} e 10^{-5} em cada meio de cultura acima descritos em três repetições.

As placas com o inóculo foram incubadas a 28ºC por 7 dias. Quando apareceram colônias bacterianas ao término dos 7 dias, foram contadas para determinar a abundância de UFC na rizosfera (UFC g^{-1} de solo). As colônias bacterianas foram repicadas em placa Petri (Ø 60 cm) com meio original (TSBA, PSA ou GA) para purificação dos isolados.

O cálculo de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de solo foi feito mediante a fórmula (1).

$$UFC\ g^{-1}\ de\ solo = N^{\underline{o}}\ colônias \times fd \times 10 \qquad (1)$$

Onde, *Nº colônias:* número de colônias bacterianas crescidas na placa e *fd:* fator de diluição (10^4, pois foi considerada a diluição 10^{-4} para a determinar a abundância).

Para a determinação do teor de umidade do solo, uma amostra de solo (~5 g) foi pesada (peso do solo úmido) e colocada na estufa a 110ºC durante 72 h, até peso constante. Após, obteve-se o peso seco para o cálculo do conteúdo de umidade do solo, usando a fórmula (2).

$$U = \frac{su - ss}{ss} \quad (2)$$

Onde, *U:* umidade do solo em centésimos; *su:* peso (g) solo úmido e *ss:* peso (g) solo seco.

Com o valor da umidade do solo, obteve-se o fator de correção mediante a fórmula (3).

$$Fc = 100/(100 - U) \quad (3)$$

Onde, *Fc:* Fator de correção da umidade do solo (adimensional) e *U:* umidade do solo em centésimos.

A correção do parâmetro do peso do solo no cálculo de UFC foi feita com a fórmula (4).

$$UFC/g\ solo\ seco = (UFC/g\ solo\ úmido\ )/(su\ \times Fc) \quad (4)$$

Onde, *UFC/g solo úmido:* número de UFC em solo úmido; *Fc:* Fator de correção da umidade do solo e *su:* peso (g) solo úmido utilizado no preparo das diluições seriadas.

3.3.2 Caracterização genotípica de isolados bacterianos da rizosfera

A caracterização genotípica foi realizada por BOX-PCR de acordo com a metodologia de Rademaker et al. (1997). Preparou-se uma suspensão bacteriana com cada isolado bacteriano com 24 h de crescimento em meio de cultura BDA (39 g L^{-1} de BDA; pH 6,8), coletou-se na ponta de uma haste de madeira de 6 cm autoclavada a biomassa do isolado, a qual foi misturada em 100 µl de água *Milli-Q* autoclavada dentro de um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml de capacidade até obter uma suspensão turva.

Para gerar os perfis BOX-PCR, a reação de PCR foi realizada com o *primer* BOX 1AR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC et al., 1994) e foram feitas reações de amplificação do DNA num volume final de 25 µl, contendo: 13,45 µl de água *Milli-Q* autoclavada, 1,0 µl de *primer* BOX A1R (10 µM), 1,25 µl de dNTPs (25 mM cada), 0,40 µl

de BSA (10 mg/ml), 2,5 µl de DSMO 100%, 5 µl de tampão Gistchier 5X [para 200 ml: 16,6 ml de 1M $(NH_4)_2SO_4$, 67 ml de 1M Tris-HCl pH 8,8, 6,7 ml de 1M $MgCl_2$, 1,3 ml de uma diluição 1:100 de 0,5M EDTA pH 8,8, 2,08 ml de β-mercaptoethanol (14,4M – solução a 99%)], 0,4 µl de *Taq* polimerase (5 U/µl), 1 µl da amostra (suspensão bacteriana). A amplificação foi realizada com termociclador programável por 7 min a 95ºC de desnaturação inicial (um ciclo), desnaturação a 95ºC por 1 min, anelamento 40ºC por 1 min e extensão 65ºC por 8 min (35 ciclos). Foi programado um ciclo de extensão final a 65ºC por 16 min e manutenção a 4ºC.

A visualização das bandas foi feita em gel de agarose 1,5% (p/v) de 10 cm de comprimento em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA), corado com *Gel Red* (*Biotium*®) e 10X *Loading Buffer* (*Invitrogen*®); a eletroforese foi corrida a 80 V durante 100 min a temperatura ambiente. Foi usado o marcador molecular 1 kb *Plus DNA Ladder*™ (*Invitrogen*®) para normalização. As bandas foram visualizadas em transiluminador UV de 254 nm de comprimento de onda.

3.3.3 Testes de inibição do crescimento de fungos patógenos do feijão

Para os testes de inibição do crescimento do micélio, foram utilizados quatro isolados patógenos radiculares do feijão, dois de *Rhizoctonia solani* (Rs144 e Rs) e dois de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fo e Fo160). As cepas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* Fo160 e de *R. solani* Rs foram fornecidas pelo departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP. A cepa de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* Fo foi fornecida pelo IAC e a cepa de *R. solani* Rs144 foi obtida da coleção da Embrapa Arroz e Feijão.

Utilizou-se o meio de cultura BDA (39 g L^{-1} de BDA; pH 6,8) para o crescimento das colônias bacterianas e dos fungos patógenos. Foi repicado em quatro pontos equidistantes, a 3 cm desde o centro da placa Petri (Ø 90 cm), um isolado bacteriano e deixou-se crescer a colônia durante 48 h a 28ºC. Depois desse tempo, foi adicionado um disco de micélio (Ø 5 mm) do patógeno *R. solani* ou *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* no centro da placa. O tratamento controle consistiu dum disco só do patógeno no centro da placa. Foram feitas três réplicas de cada isolado e do controle.

Todas as placas Petri com inóculo foram incubadas a 28ºC durante 7 dias até observar o crescimento total ou o maior crescimento do fungo no tratamento controle. Foi medido o raio (cm) do micélio desde a borda do disco do patógeno em direção ao ponto de inoculação da bactéria e no caso do tratamento controle, foi medido o raio do micélio desde a borda do disco do patógeno até a borda do crescimento máximo do micélio na placa Petri. Primeiro foi

determinada a inibição do crescimento micelial com a fórmula (5) e depois foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento segundo a fórmula (6).

$$I = rc - rt \tag{5}$$

Onde, *I:* Inibição do crescimento micelial (cm); *rc:* raio de crescimento do micélio no tratamento controle (cm) e *rt:* raio de crescimento do micélio no tratamento com bactéria (cm).

$$PIC = \frac{I}{rc} \times 100 \tag{6}$$

Onde, *PIC:* porcentagem de inibição do crescimento do micélio do fungo; *I:* Inibição do crescimento micelial; *rc:* Raio do crescimento do micélio no tratamento controle.

3.3.4 Identificação dos isolados antagonistas por sequenciamento parcial do gene 16*S* rRNA

Fez-se a extração do DNA dos 11 isolados bacterianos que apresentaram alta porcentagem de inibição do crescimento dos fungos patógenos usando o kit *GenElute Bacterial Genomic DNA* (*Sigma-Aldrich*) seguindo as instruções do fabricante. Cada isolado foi inoculado em 100 ml de meio de cultura líquido GY (10 g L^{-1} de D-Glicose $C_6H_{12}O_6$, 10 g L^{-1} de extrato de levedura, pH 6,7) e incubou-se em agitação a 135 rpm durante 7 dias à temperatura ambiente. Após esse tempo, foi coletado 1,5 ml do meio de cultura em tubo de microcentrífuga e centrifugou-se a 16 *g* durante 10 min para obter um pellet. O pellet foi ressuspendido em 200 µl de lisozima e incubado por 30 min a 37ºC. Após isso, foi acompanhado o protocolo com as seguintes etapas da extração de acordo às instruções do kit.

A reação de amplificação do gene 16*S* rRNA de Bactéria foi feita utilizando os *primers:* 27F e 1492R (Tabela 2), em duas repetições e a reação de PCR conteve: 1 µl de DNA genômico (41,3 ng ml^{-1}), 2,5 µl de tampão de PCR 10X, 1,25 µl de solução de $MgCl_2$ (25 mM), 0,5 µl dNTPs (25 mM cada), 0,175 µl do *primer* 27F (10 µM), 0,175 µl do *primer* 1492R (10 µM), 1,25 µl de DMSO 5%, 0,15 µl de *Taq* polimerase 5 U/µl e 18 µl de água *Milli-Q* autoclavada para um volume final de 25 µl. A reação foi feita em um termociclador nas seguintes condições: 4 min a 95ºC para desnaturação inicial, seguida por 30 ciclos com desnaturação a 95ºC por 30 s, anelamento dos *primers* a 55ºC por 1 min, extensão a 72ºC por 1 min e extensão final por 10 min a 72ºC e manutenção a 4ºC.

Tabela 2 – *Primers* da região 16*S* rRNA utilizados nas reações para sequenciamento das bactérias antagonistas

Primers	Sequências (5' – 3')	Fragmento (pb)
27F	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~1.500
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACT	

Fonte: Heuer et al. (1997)

A purificação do produto da PCR do DNA de cada isolado bacteriano foi feita com isopropanol [$CH_3CH(OH)CH_3$] 100% e etanol (C_2H_6O) 80%. O produto da PCR foi repassado para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, adicionou-se 1 ml de isopropanol gelado, homogeneizou-se em vórtex por 5 s e centrifugou-se a 15.000 rpm por 15 min a 4ºC. Foi descartado o sobrenadante cuidadosamente para não desintegrar o pellet. Depois foram adicionados 125 µl de etanol 80% gelado, homogeneizou-se e centrifugou-se a 13.000 rpm por 10 min a 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o microtubo deixou-se secar a temperatura ambiente até não observar vestígios de etanol (30 min). Depois da secagem foram adicionados 20 µl de água *Milli-Q* autoclavada para ressuspensão do pellet.

A visualização tanto das bandas do DNA extraído de cada isolado quanto as da purificação do produto de PCR, foi feita sobre gel de agarose 1,5% (p/v) de 10 cm de comprimento em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA), corado com *Gel Red* (*Biotium*®) e 10X *Loading Buffer* (*Invitrogen*®); a eletroforese foi corrida a 80 V durante 40 min à temperatura ambiente. Foi usado o marcador molecular 200-2.000 pb *Low Mass Ladder*™ (*Invitrogen*®) para normalização. As bandas foram visualizadas em transiluminador UV de 254 nm de comprimento de onda.

Para o sequenciamento de DNA a partir de produto de PCR foi utilizado o *ABI 3730 DNA Analyzer* (*Life Technologies – Applied Biosystems*). As amostras foram encaminhadas para o Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e células-tronco (CEGH-CEL), ligado ao Instituto de Biociências da USP (http://genoma.ib.usp.br/wordpress/?page_id=56). As reações de sequenciamento são feitas utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (código 4337456) e as corridas são feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências são analisadas pelo software *Sequencing Analysis 5.3.1* utilizando o *Base Caller KB*.

3.3.5 Análise dos dados do sequenciamento parcial do gene 16*S* rRNA dos isolados bacterianos antagonistas

As sequências obtidas do sequenciador em formato *.ab1* foram processadas no software *CLCbio*® (*CLCbio, DEMARK*) onde foram tiradas as regiões de baixa qualidade e com ambiguidade 2. As sequências, após processamento, foram comparadas com o banco de dados *EzTaxon* (http://www.ezbiocloud.net/eztaxon) (KIM et al., 2012).

Para a construção da árvore filogenética, as sequências originais foram alinhadas com a referência encontrada no banco de dados *NCBI*. Para a construção da árvore filogenética, as sequências originais foram alinhadas com referências encontradas no banco de dados *NCBI*. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado no programa *MEGA* 6.0 (TAMURA et al., 2013), com o auxílio da ferramenta *CLUSTALW* e posterior correção manual. As análises filogenéticas foram realizadas por Inferência Bayesiana utilizando o programa *MrBayes* (RONQUIST et al., 2011). O melhor modelo de substituição nucleotídica foi escolhido com o auxílio do programa *MrModelTest* (POSADA; CRANDALL, 1998). A confiabilidade de cada nó da árvore foi obtida por meio da probabilidade posterior, calculada pela frequência de cada nó na árvore consenso.

3.3.6 Análise estatística

A abundância de bactérias na rizosfera foi analisada com o número de UFC por grama de solo seco, utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), considerando dois tratamentos (genótipos Wild Mex e IAC Alvorada) em cinco repetições.

Os perfis das bandas observados no gel a partir da técnica BOX-PCR, foram convertidos a uma matriz binária e depois se fez uma análise de agrupamento com o algoritmo sem peso de pares de grupo com médias aritméticas (*unweighted pair-group average – UPMGA*), cálculo do índice de similaridade de Jaccard (para dados binários ausência/presença de banda, codificados como 0 e 1) (HUNGRIA et al., 2008) e 10.000 *bootstrap*. O dendrograma foi gerado usando o software *PAST* (*Paleontological Statistics*) versão 3.05 (HAMMER et al., 2014).

3.4 Abordagem Independente de Cultivo

3.4.1 Extração de DNA da rizosfera e sequenciamento metagenômico

A extração do DNA total do solo foi feita com 0,25 g de rizosfera de cada planta (réplica) e utilizou-se o kit comercial *Power Soil DNA Extraction*™ (MoBio) de acordo com as instruções do fabricante. Depois, a verificação da qualidade do DNA extraído se fez em gel de

agarose 1% em cuba de eletroforese de 10 cm a 80V durante 50 min e usando marcador *Low Mass Ladder*™ (*Invitrogen*®) 200-2.000 pb.

As amostras foram ajustadas à concentração de 5 ng μl^{-1} de DNA e enviadas para sequenciamento no Laboratório Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (http://genfis40.esalq.usp.br/multi/). O sequenciamento do DNA metagenômico foi realizado em sequenciador *MiSeq* (*Illumina*®). As bibliotecas formam preparadas utilizando o kit *Nextera® DNA Sample Preparation* (*Illumina*®).

3.4.2 Análise dos dados do sequenciamento metagenômico

Os dados metagenômicos gerados pelo sequenciador *Illumina MiSeq* (*Illumina*®) em formato *fast.q* foram inseridos no servidor MG-RAST (*Metagenome Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (http://metagenomics.anl.gov/) (MEYER et al., 2008). Para a anotação e classificação taxonômica e funcional, foram utilizados os parâmetros (*default*): *Max. e-Value Cutoff:* 1e-5, *Min. % Identity Cutoff:* 60%, *Min. Alignment Length Cutoff:* 15. As anotações taxonômicas estiveram baseadas no método *Lowest Common Ancestor (LCA)* e comparadas com os bancos de dados *M5NR* e *M5RNA*. A abundância funcional foi anotada usando a *Classificação hierárquica* e o banco de dados *SEED Subsystems*.

3.4.3 Análise estatística dos dados metagenômicos

Os índices de diversidade e a análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) foram obtidos a partir duma planilha com o número de espécies de Bacteria, Archaea e Fungi com auxílio do software *PAST* (*Paleontological Statistics*) versão 3.05 (HAMMER et al., 2014).

Para análise estatística dos dados metagenômicos foram usados os dados da frequência relativa dos táxons e categorias funcionais em cada uma das amostras *bulk soil*, rizosfera de IAC Alvorada e rizosfera de Wild Mex.

Fez-se Análise de Componentes Principais (PCA) para ordenar as amostras de *bulk soil*, rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada e feijão selvagem Wild Mex de acordo ao nível taxonômico de filos de Bacteria, Archaea e Fungi.

A diferença estatística entre a frequência relativa dos filos de Bacteria, Archaea e Fungi, bem como dos gêneros e categorias funcionais (*Subsystem: function*) das amostras de *bulk soil* e rizosferas, foi determinada mediante o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) com auxílio do software *STAMP* (*Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles*) versão 2.0.9 (PARKS; BEIKO, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Abordagem Dependente de Cultivo

4.1.1 Isolamento de bactérias da rizosfera

A abundância total de isolados (UFC g^{-1} de solo rizosférico seco) nas rizosferas não diferiu significativamente entre os dois genótipos de feijão. O número médio de UFC g^{-1} de solo rizosférico seco em IAC Alvorada foi de $3,66 \times 10^7$ e em Wild Mex foi de $4,39 \times 10^7$ (Figura 3).

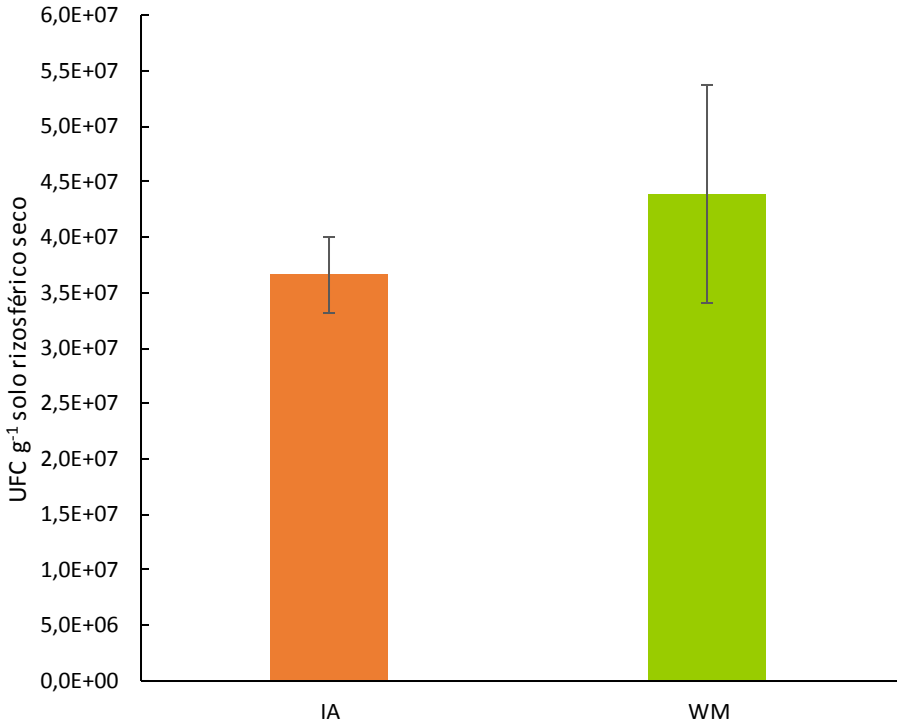

Figura 3 – Abundância de Unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo seco na rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e feijão selvagem Wild Mex (WM), quantificadas em meio de cultura TSBA

Esses números são concordantes com os descritos para outros solos e variam entre 10^7-10^{10} células por grama de solo seco (WHITMAN et al., 1998; LAVELLE; SPAIN, 2003; van ELSAS et al., 2007). Em solos de Terra Preta da Amazônia foi encontrado abundâncias de bactérias entre 32×10^4 até 10×10^7 UFC g^{-1} solo (RUIVO et al., TSAI et al., 2009); valores superiores a 10^7 UFC g^{-1} solo seco foram achados na camada entre 0-30 cm (TSAI et al., 2009). Foi encontrado na rizosfera de 16 espécies vegetais agronômicas que o número de UFC variou entre 10^5 a 10^8 por grama de raiz fresca (SOMEYA et al. 2011). As variações das populações microbianas na rizosfera se devem a muitos dos mesmos fatores que afetam a exsudação radicular (CURL; TRUELOVE, 1986) como: a idade e fase fenológica da planta (LUNDBERG

et al., 2012; GARCÍA-SALAMANCA et al., 2012), tipo de solo, fatores ambientais (luz, temperatura, umidade, pH), aplicação de pesticidas e interações microbianas (NIHORIMBERE et al., 2011; PHILIPPOT et al., 2013).

4.1.2 Caracterização molecular de isolados bacterianos por BOX-PCR

Setenta isolados bacterianos foram obtidos da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex e 34 da rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada, totalizando 104 isolados.

No dendrograma gerado a partir dos perfis de bandas dos fragmentos de DNA através da técnica de BOX-PCR, evidenciou-se a disposição de 92 grupos com 70% de similaridade (Figura 4), o que indicou uma alta riqueza bacteriana, como confirmado pelo método independente de cultivo (Tabela 5). Observou-se que não houve agrupamento dos isolados de acordo com o hospedeiro (feijão cultivado ou selvagem). Portanto, considerando a alta riqueza, foi decidido testar todos os 104 isolados contra os patógenos de feijão, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli.*

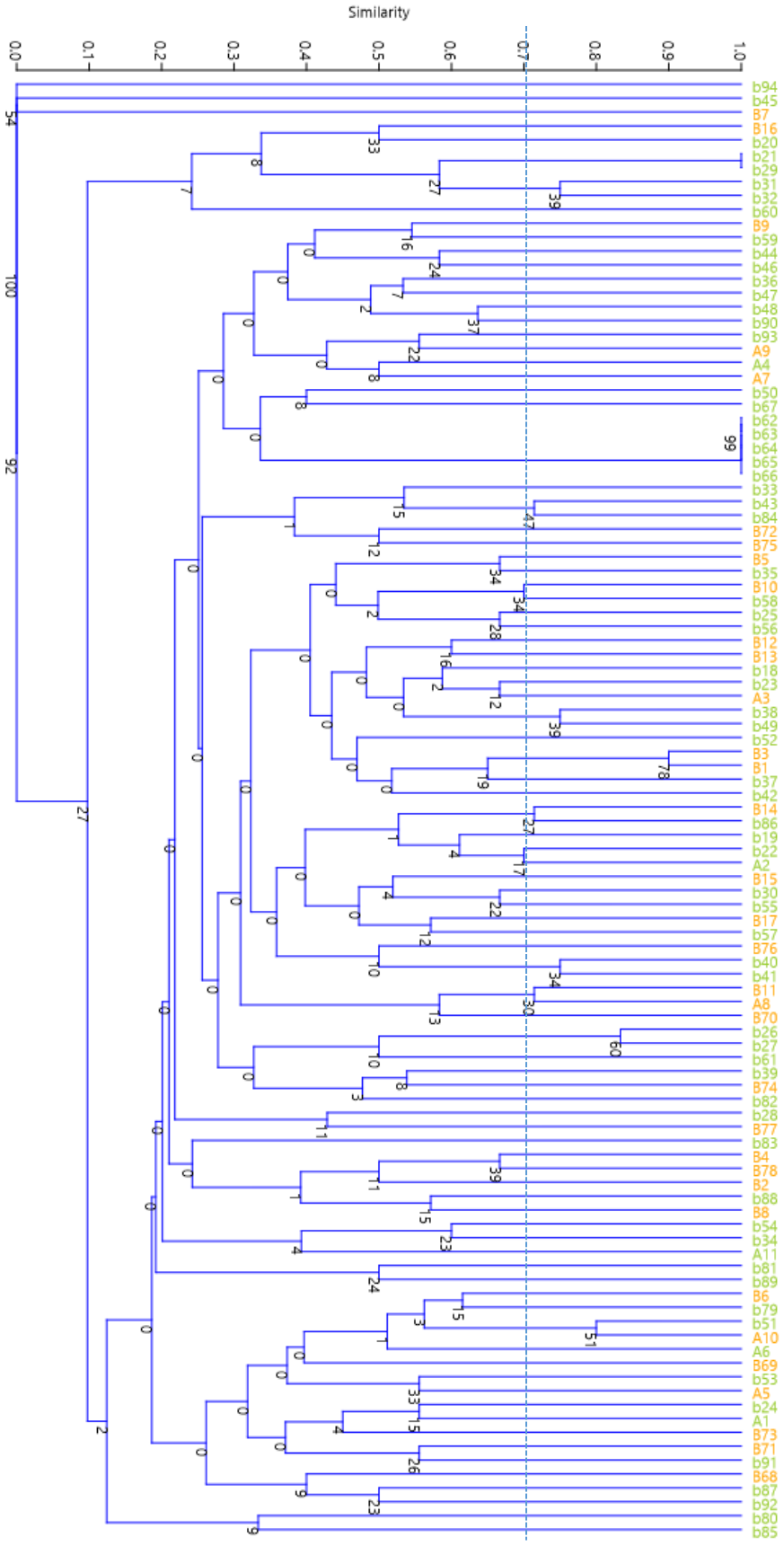

Figura 4 – Dendrograma dos 104 isolados bacterianos da rizosfera de feijão genótipo selvagem Wild Mex (verde) e cultivado IAC Alvorada (laranja) calculado com 10.000 bootstrap e índice de Jaccard. Os isolados antagonistas estão identificados com a letra A

4.1.3 Inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e identificação de antagonistas por sequenciamento parcial do gene 16*S* rRNA

Dos 104 isolados bacterianos que foram avaliados para determinar a inibição do crescimento micelial dos fungos patógenos do feijão, *R. solani* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli.* Apenas 11 isolados exerceram inibição do crescimento do micélio de pelo menos uma cepa patógena testada; seis isolados foram obtidos da rizosfera do genótipo de feijão cultivado IAC Alvorada e cinco do genótipo selvagem Wild Mex (Tabela 3 e Figura 5).

Deve-se considerar que os genótipos selvagens de cultivos assim como a área de distribuição são importantes fontes de isolados com atividade antagonista de fitopatógenos ou com proteção do estresse para seus hospedeiros (ZACHOW et al., 2014).

Tabela 3 – Identificação dos isolados bacterianos antagonistas a partir do sequenciamento parcial do gene 16*S* rRNA e porcentagem de inibição do crescimento (PIC) micelial dos fungos patógenos do feijão *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Código do isolado	Origem[a]	Identificação sequenciamento parcial gene 16*S* rRNA[b]	Identidade (%)[b]	Linhagem de referencia[b]	Porcentagem de inibição (PIC) [c]			
					Rs144	Rs	Fo	Fo160
TW2.4 mapu	WM	*Paenibacillus jamilae*	100,00%	CECT 5266	62,29	50,65	-	52,81
PW1.4 brru	WM	*Brevibacillus brevis*	100,00%	NBRC 100599	48,13	36,09	67,44	39,83
TIS1.5 laci	IA	*Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus*	100,00%	DSM 16503	-	48,11	-	-
GRWS3.1 refu	WM	*Streptomyces phaeopurpureus*	99,50%	NRRL B-2260	-	34,11	-	39,13
TIS1.4 cuat	IA	*Pseudomonas protegens*	100,00%	CHA0	-	40,98	36,51	-
TWS5.4 maci	WM	*Streptomyces olivoverticillatus*	99,49%	NBRC 15273	66,25	52,17	56,45	56,93
GI2.4 brre	IA	*Pseudomonas geniculata*	99,12%	ATCC 19374	63,42	40,76	57,41	50,22
TIS1.4 maat	IA	*Achromobacter animicus*	100,00%	LMG 26690	-	59,24	41,80	54,74
TIS1.4 brat	IA	*Kitasatospora azatica*	100,00%	IFO 13803	57,08	-	-	-
TIS1.4 prat	IA	*Stenotrophomonas daejeonensis*	100,00%	MJ03	-	51,45	-	52,66
TWS3.5 ciat	WM	*Streptomyces ochraceiscleroticus*	100,00%	NBRC 12394	82,50	-	40,8	-

[a] IA: rizosfera feijão cultivado IAC Alvorada; WM: rizosfera feijão selvagem Wild Mex.
[b] Comparação com o banco de dados *EzTaxon* (KIM et al., 2012).
[c] Rs144, Rs: *Rhizoctonia solani;* Fo, Fo160: *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

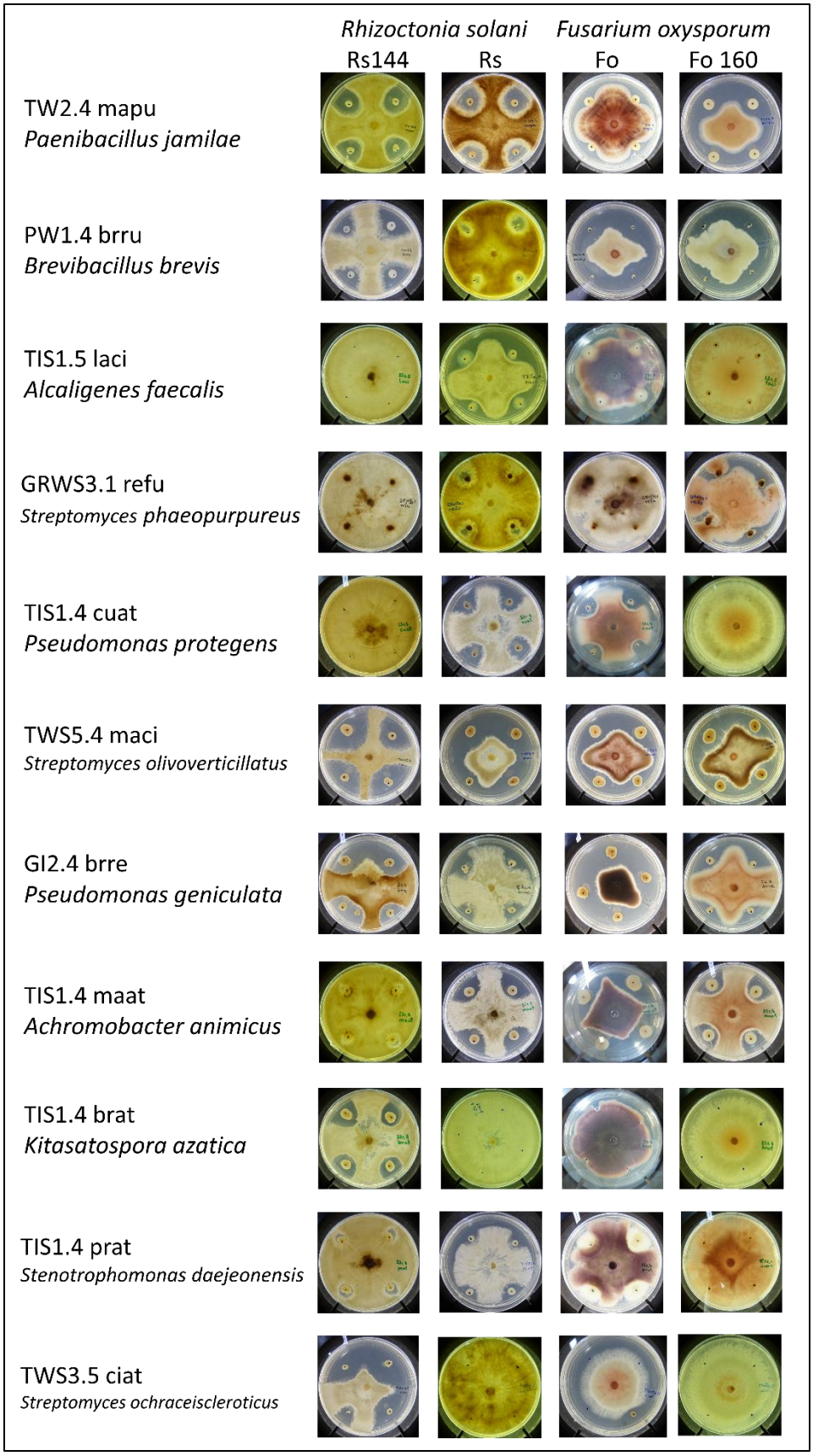

Figura 5 – Inibição do crescimento micelial dos fungos patógenos do feijão *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* pelas bactérias antagonistas isoladas das rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada e feijão selvagem Wild Mex

A comparação das sequências parciais do gene 16*S* rRNA com o banco de dados *NCBI* deu como resultado que a maioria dos isolados teve afiliação taxonômica aos filos Proteobacteria (*Alcaligenes, Achromobacter, Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*) e Actinobacteria (*Streptomyces* e *Kitasatospora*); dois isolados pertenceram ao filo Firmicutes (*Paenibacillus* e *Brevibacillus*) (Figura 6).

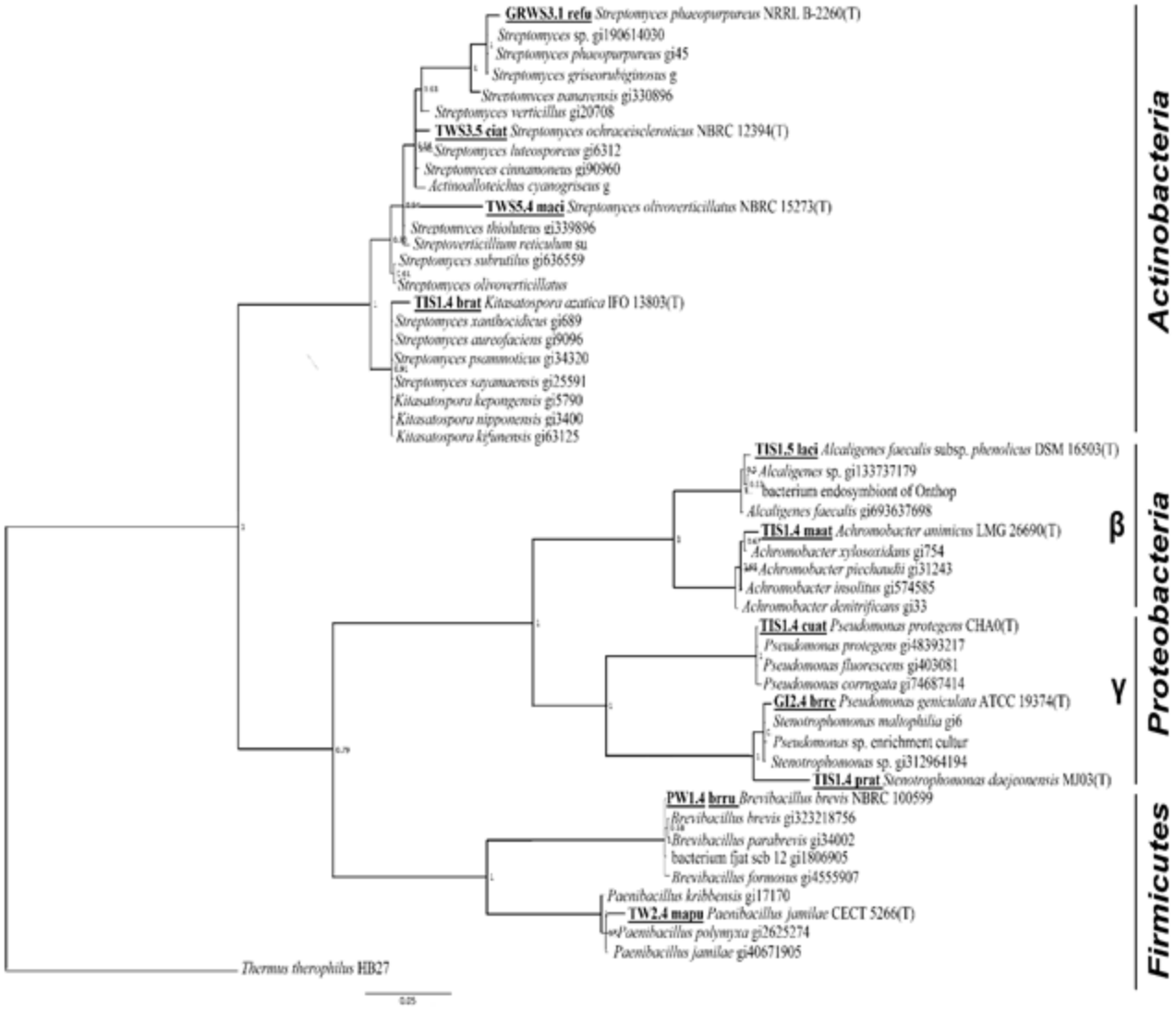

Figura 6 – Árvore filogenética construída a partir do sequenciamento parcial do gene 16*S* rRNA dos isolados bacterianos e das cepas de referência do banco de dados *NCBI*, usando o método de Inferência Bayesiana no programa *MrBayes*. Os códigos dos isolados aparecem em negrito e sublinhados, acompanhados das acessões mais similares encontradas no banco de dados *EzTaxon*

Uma explanação mais ampla sobre as bactérias antagonistas de patógenos do feijão será abordada na seção 4.2.3 "Busca dirigida das bactérias antagonistas de *R. solani* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nos metagenomas de *bulk soil* e rizosferas".

4.2 Abordagem Independente de Cultivo

4.2.1 Sequenciamento metagenômico do microbioma da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex e do cultivado IAC Alvorada

Na Tabela 4 são mostrados os valores médios dos dados do sequenciamento metagenômico do DNA das amostras de *bulk soil* (BS), rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e do feijão selvagem Wild Mex (WM), antes e depois do controle de qualidade utilizado no servidor MG-RAST (http://metagenomics.anl.gov/). Nos Apêndices A, B, C podem ser encontrados os dados completos do sequenciamento que foram obtidos do servidor MG-RAST.

Tabela 4 – Valores médios (n = 5) dos dados do sequenciamento metagenômico das amostras de *bulk soil* de TPA anotados pelo MG-RAST

Dado MG-RAST	Amostras[a]		
	BS	IA	WM
Pré-Controle de qualidade			
Número bp	942.915.548	416.297.151	658.164.196
Número sequências	3.463.425	1.560.122	2.619.267
Comprimento médio (pb)	265,0	268,2	251,0
Cont. Médio CG (%)	63,4	63,6	62,6
Pós-Controle de qualidade			
Número bp	727.226.068	328.262.388	502.630.731
Número sequências	3.217.709	1.414.190	2.460.905
Comprimento médio (pb)	228,8	229,0	212,4
Cont. Médio CG (%)	63,6	63,6	62,6
Predição de proteínas	2.849.132	1.283.982	2.175.562
Proteínas identificadas	1.158.916	539.304	825.431
Categorias funcionais	915.216	424.214	643.413

[a] BS: *bulk soil;* IA: rizosfera feijão cultivado IAC Alvorada; WM: rizosfera feijão selvagem Wild Mex.

Igualmente, no servidor MG-RAST foram geradas as curvas de rarefação a partir das sequências anotadas das amostras de *bulk soil* e rizosferas de IAC Alvorada e de Wild Mex (Figura 7). As amostras WM5, BS3 e BS4 registraram os valores mais altos de riqueza (número de espécies). As curvas se apresentaram bastante íngremes à esquerda, o que indica que ainda é possível atingir uma cobertura maior das espécies que se encontram nesses nichos ecológicos.

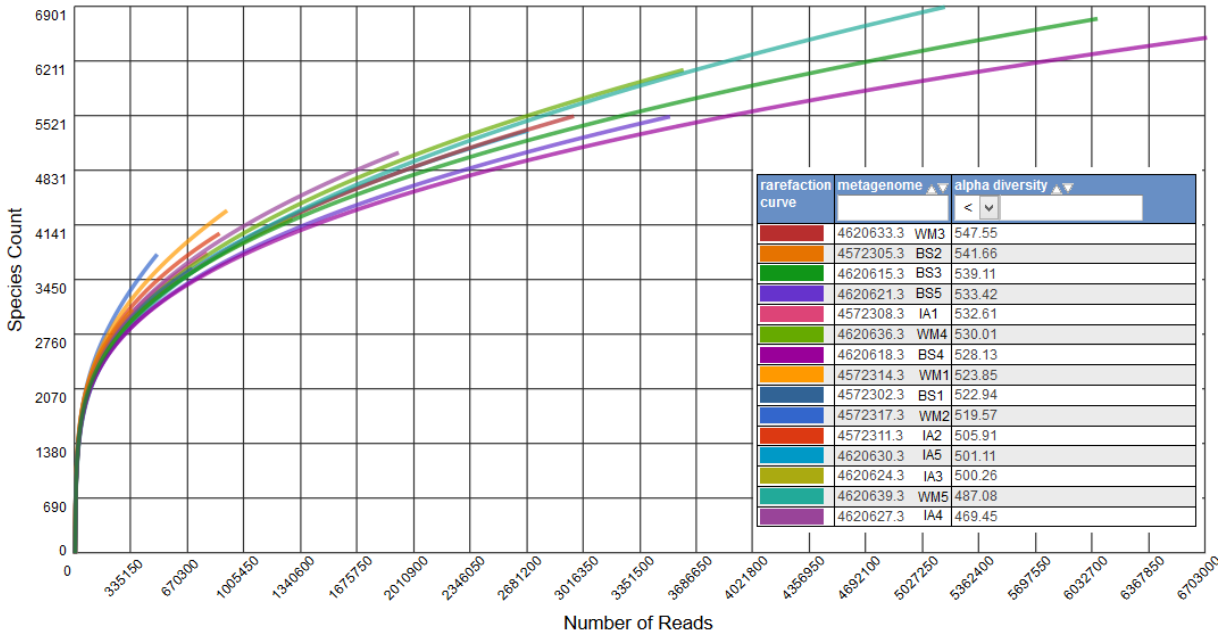

Figura 7 – Curvas de rarefação geradas no MG-RAST a partir dos dados do sequenciamento metagenômico do DNA das amostras de *bulk soil* (BS), rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e rizosfera de feijão selvagem Wild Mex (WM)

As formas das curvas foram similares com as obtidas por Kim et al. (2007) e Cannavan (2007) no estudo de diversidade bacteriana em solos de TPA, onde as curvas de rarefação das TPA mostraram maior riqueza quando comparadas com solo de floresta (KIM et al., 2007) e com os solos originais ou adjacentes (CANNAVAN, 2007). Isto corrobora que os solos de TPA são ecossistemas altamente complexos que abrigam uma vasta diversidade de organismos (micro-organismos, insetos, plantas) que precisam de estudos encaminhados a determinar os serviços ambientais que eles desempenham (KIM et al., 2007; RUIVO et al., TSAI et al., 2009).

O maior número de sequências foi atribuído ao domínio Bacteria (BS: 98,38%; IA: 98,07%; WM: 97,28%), seguido pelos domínios Eukaryota (BS: 0,59%; IA: 1,01%; WM: 1,86%) e Archaea (BS: 0,85%; IA: 0,75%; WM: 0,69%) (Figura 8 e Apêndice D). A subdivisão Fungi do domínio Eukaryota, teve uma frequência relativa de 0,13% no metagenoma do *bulk soil* e 0,16% em ambas as rizosferas de feijão.

Essa distribuição é coincidente com Souza et al. (2013), que através da abordagem de sequenciamento *shotgun* num campo de soja, encontraram que a maioria das sequências foi atribuída a Bacteria seguida de Archaea e Eukaryota, porém o valor da frequência relativa das sequências não classificadas (46%) foi discordante. Apesar disso, deve considerar-se que dentro de cada domínio, a frequência relativa de sequências não classificadas teve uma grande proporção, particularmente nos domínios Bacteria (~28%) e Archaea (~12%) (Figuras 10 e 12).

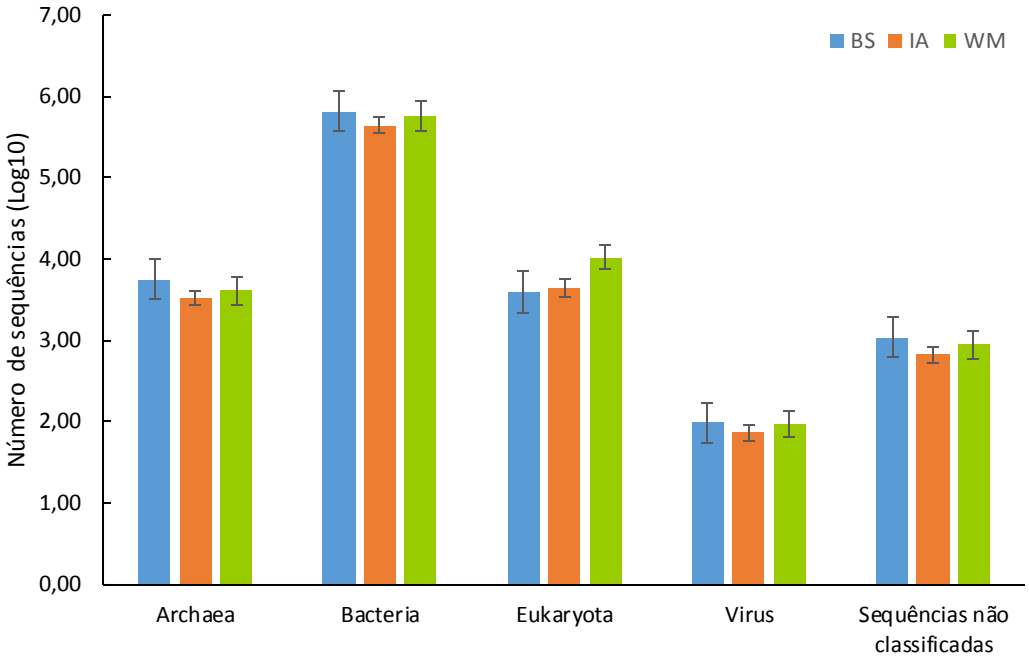

Figura 8 – Número de sequências (Log10) de Bacteria, Archaea, Eukaryota, Virus e sequências não classificadas anotadas no MG-RAST a partir dos dados do sequenciamento metagenômico do DNA das amostras de *bulk soil* (BS), rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e rizosfera de feijão selvagem Wild Mex (WM)

Por outro lado, a respeito das estimativas da riqueza das amostras de *bulk soil* (2.766), rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada (2.528) e rizosfera de feijão selvagem Wild Mex (2.721), como se observa na Tabela 5, não houve diferença significativa entre elas ($p < 0,05$, ANOVA). No entanto, o índice de diversidade de Simpson (1-D) teve diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA) entre as amostras, indicando que o *bulk soil* foi mais diverso do que as rizosferas ($p < 0,05$, teste de Tukey). No índice de diversidade de Shannon não se observou diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$, ANOVA). O valor mais alto de dominância (D) que foi registrado no *bulk soil* foi diferente estatisticamente das rizosferas ($p < 0,05$, teste de Tukey). Esta observação indica que alguns poucos táxons dominam a comunidade microbiana no *bulk soil* e esta dominância é amenizada na colonização da rizosfera.

Tabela 5 – Valores médios ($n = 5$) da riqueza de espécies (domínios Bacteria, Archaea e subdivisão Fungi) e índices de diversidade nas amostras de *bulk* soil (BS) e rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e de feijão selvagem Wild Mex (WM)

Amostra	Indivíduos	Dominância (D)	Chao (1)	Equitabilidade ($e^{H/S}$)	Simpson (D-1)	Shannon (H)
BS	1.082.843 a	0,0956 a	2.766 a	0,0298 a	0,9045 b	4,215 a
IA	498.522 a	0,0885 b	2.528 a	0,0317 a	0,9114 a	4,237 a
WM	768.486 a	0,0888 b	2.721 a	0,0312 a	0,9112 a	4,254 a

Notas: Letras diferentes dentro da mesma coluna indicam diferenças significativas entre amostras ($p < 0,05$, teste de Tukey).

Os resultados concordam com outros estudos, onde se indica que a riqueza é superior no *bulk soil* do que na rizosfera (MAVINGUI et al., 1992; GARCÍA-SALAMANCA et al., 2012). O valor do índice da diversidade de Shannon no *bulk soil,* é similar aos encontrados por Cannavan (2007), quem obteve índices de 4,286 e 4,783 em TPA de dois locais, e por Kim et al. (2007) que encontraram um índice de 5,2 em TPA. Esses autores encontraram índices de diversidade de Simpson muito baixos, Cannavan (2007) observou valores de 0,0259 e 0,0070 e Kim et al. (2007) encontraram valores 0,015 em TPA, isso corrobora que os solos de TPA são um reservatório de uma alta diversidade microbiológica.

Tem-se reportado que a diversidade na rizosfera é menor quando comparada com o *bulk soil* (MARILLEY et al., 1998; GARCÍA-SALAMANCA et al., 2012; PHILIPPOT et al., 2013). Porém, é advertido que a discrepância existente entre os diferentes estudos é devido aos métodos utilizados para a amostragem da rizosfera (PHILIPPOT et al., 2013).

Hawkes et al. (2007), indicam que na rizosfera de plantas herbáceas dicotiledôneas revelam maior riqueza de ordens quando comparadas com árvores e gramíneas e que plantas fixadoras de nitrogênio têm maior riqueza de bactérias quando comparadas com plantas não fixadoras de nitrogênio. A diversidade da comunidade microbiana é importante para ampliar a funcionalidade o que poderia resultar em benefício para a planta.

As Análises de Componentes Principais (PCA), baseadas na abundância dos filos de Bacteria, Archaea e Fungi, mostraram agrupamentos das comunidades microbianas do *bulk soil* e as rizosferas de feijão. A soma dos dois componentes principais correspondeu à explicação de mais de 90% da variância dos dados em todos os domínios microbianos, como se observa na Figura 9. Os filos bacterianos e fúngicos do *bulk soil* e da rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada, mostraram uma ordenação mais homogênea do que os filos da rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex, isso revela que possivelmente o genótipo cultivado seja mais seletivo para o recrutamento de bactérias e fungos do que o feijão selvagem. Além disso, observou-se que as comunidades microbianas de Bacteria e Fungi foram mais similares entre o *bulk soil* e a rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada; enquanto que as comunidades de Archaea foram mais similares entre as rizosferas.

Esses resultados são parecidos com os obtidos por Zachow et al. (2014), os quais encontraram que comunidades bacterianas da rizosfera de beterraba cultivada são mais similares com o *bulk soil* do que com as comunidades da rizosfera da beterraba selvagem. Em outro estudo, utilizando TPA, Souza et al. (2013) encontraram às comunidades bacterianas da rizosfera de feijão-caupi claramente agrupadas, elas foram similares ao *bulk soil* de TPA e notavelmente diferentes das comunidades bacterianas dos solos originários adjacentes da TPA.

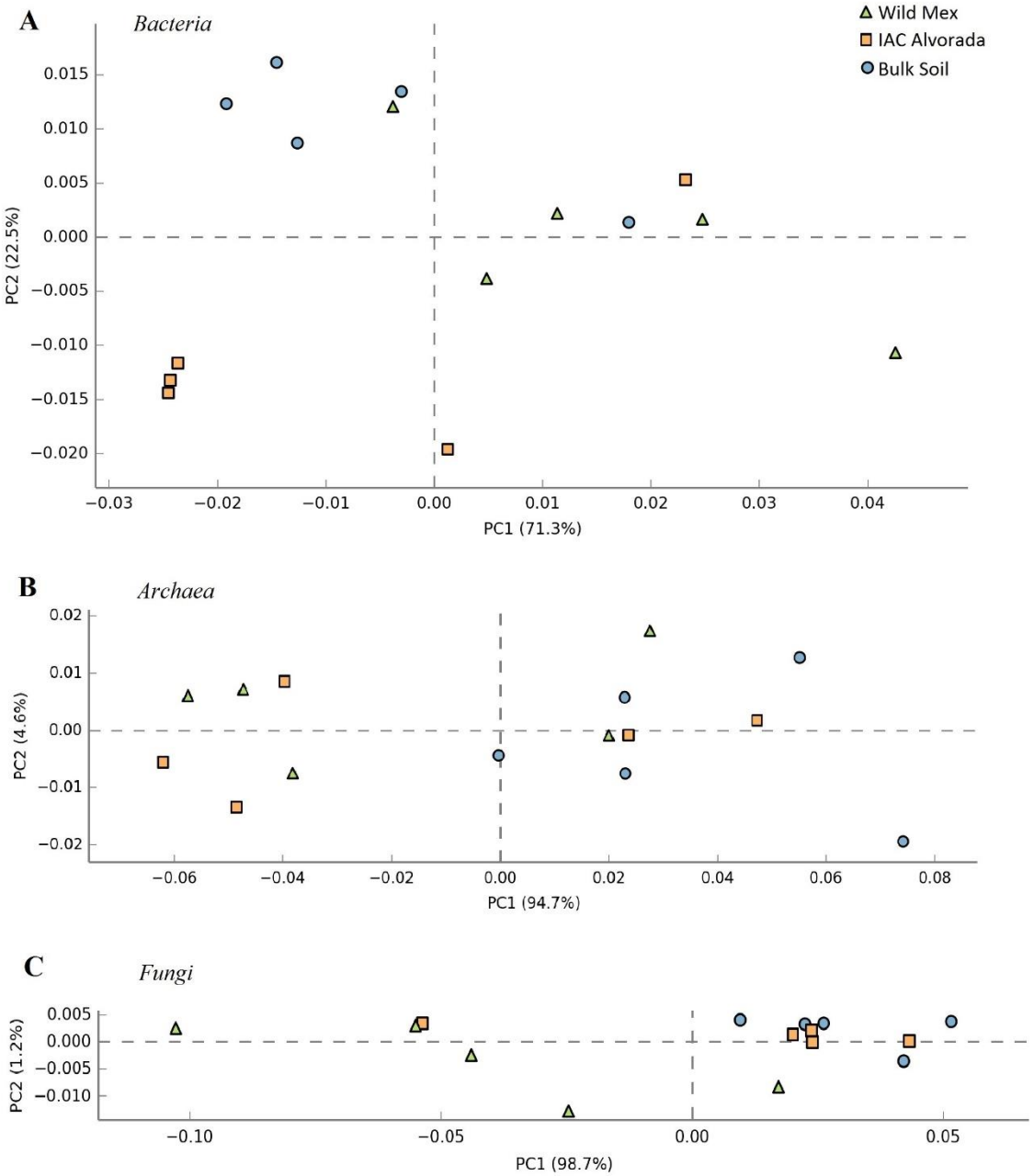

Figura 9 – Análise de Componentes Principais (PCA) de filos de Bacteria (A), Archaea (B) e Fungi (C) em *bulk soil* e rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada e feijão selvagem Wild Mex

Isto pode ser explicado pelo fato de que o solo é considerado um dos determinantes para a montagem da comunidade microbiana na rizosfera por ser um reservatório de micro-organismos e ter propriedades físico-químicas que sustentam essa comunidade (McSPADDEN, 2004; PHILIPPOT et al., 2013). Por outro lado, a planta exerce uma pressão seletiva sobre as populações microbianas do solo através da secreção de exsudatos que atuam como moléculas quimioatraentes ou repelentes de micro-organismos (LAMBERS et al., 2009; GARCÍA-SALAMANCA et al., 2012).

4.2.2 Composição do microbioma da rizosfera do feijão

4.2.2.1 Composição da comunidade de Bacteria na rizosfera do feijão

As sequências de Bacteria foram classificadas em 28 filos e um grupo de bactérias não classificadas. Os filos que tiveram frequência relativa maior do que 1% foram: Proteobacteria, Bacteria não classificadas, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes, Firmicutes, Verrumicrobia, Cyanobacteria e Bacteroidetes (Figura 10).

A abundância de alguns táxons quando comparada a outros que ocorrem em números muito baixos e limitam a sua detecção, é devido provavelmente à restrição aos diferentes sítios na rizosfera onde as condições físico-químicas são favoráveis para sua sobrevivência e crescimento (ELSAS et al., 2007). As frequências relativas bem menores indicariam a alta seletividade que tem a planta para que certos micro-organismos consigam existir na rizosfera.

A estrutura da comunidade bacteriana do *bulk soil* foi similar com a apresentada por Cannavan (2011) em TPA de quatro locais diferentes, onde os filos mais abundantes (> 5%) foram: Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria e Firmicutes. Por outro lado, em solo agrícola, García-Salamanca et al. (2012) encontraram que no *bulk soil* os filos predominantes foram: Acidobacteria, Bacteroidetes e Proteobacteria e na rizosfera do milho na ordem decrescente foi: Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes.

Os filos Proteobacteria e Actinobacteria são muito bem representados na maioria de rizosferas. Na meta-análise da caracterização da comunidade bacteriana pelo gene 16*S* rRNA de rizosferas de plantas herbáceas e lenhosas, o filo Proteobacteria dominou entre os filos bacterianos (HAWKES et al., 2007). Proteobacteria é o maior e mais diverso filo de bactérias; contêm cinco classes onde estão grupos importantes relacionados com os ciclos do carbono e bactérias fixadoras de nitrogênio que formam simbiose com leguminosas. Actinobacteria são altamente diversas morfologicamente, produzem enzimas extracelulares, além da excreção de metabólitos como antibióticos. O processo de fixação biológica de N_2 nesse filo é mediado pelo gênero *Frankia* (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Dos filos bacterianos anotados, só dez mostraram diferença estatística ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis). Oito desses filos foram mais abundantes no *bulk soil* do que nas rizosferas, como se mostra na Figura 10 e na Tabela 6.

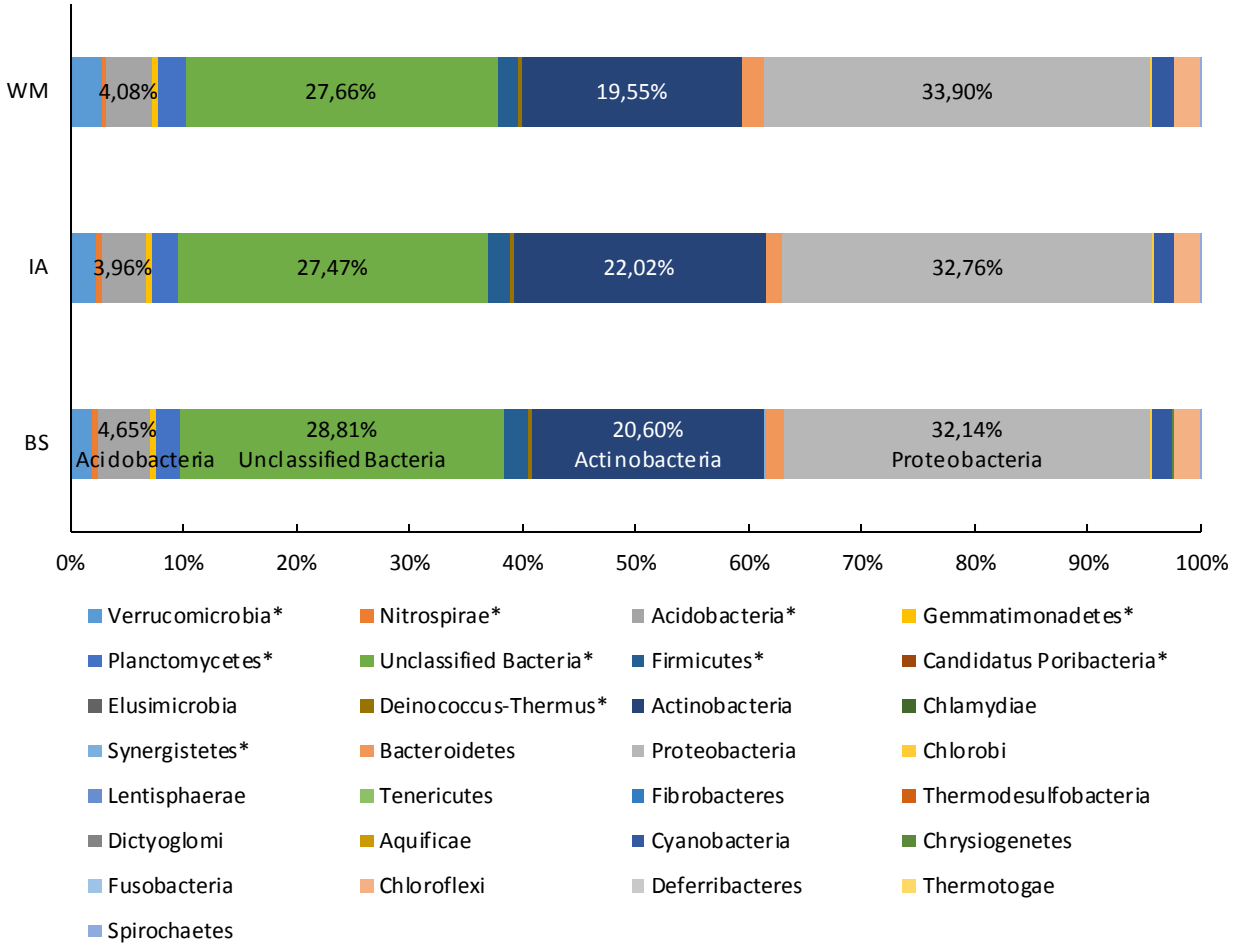

Figura 10 – Frequência relativa média (n = 5) dos filos de Bacteria no *bulk soil* (BS) e nas rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e feijão selvagem Wild Mex (WM) (* indica diferença estatística, p < 0,05, teste de Kruskal-Wallis)

Tabela 6 – Filos de Bacteria significativamente diferentes (p < 0,05, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média (n = 5) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e feijão selvagem Wild Mex (% WM)

Filo	Valor p	% BS	% IA	% WM
Bacteria não classificadas	0,023	28,81	27,47	27,66
Acidobacteria	0,005	4,65	3,96	4,08
Verrucomicrobia	0,004	1,99	2,35	2,74
Planctomycetes	0,010	2,05	2,38	2,34
Firmicutes	0,049	2,04	1,90	1,84
Gemmatimonadetes	0,004	0,63	0,47	0,56
Nitrospirae	0,013	0,57	0,45	0,45
Deinococcus-Thermus	0,046	0,34	0,33	0,31
Synergistetes	0,036	0,05	0,05	0,05
Candidatus Poribacteria	0,023	0,03	0,03	0,03

Considerando apenas as rizosferas, as maiores diferenças estiveram na frequência relativa dos filos: Bacteria não classificadas, Acidobacteria, Verrucomicrobia e Gemmatimonadetes, os quais foram mais abundantes na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex. Enquanto que na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada, apareceram pequenas diferenças na frequência relativa dos filos Firmicutes, Planctomycetes e Deinococcus-Thermus, os quais tiveram uma abundância relativa ligeiramente superior quando comparados com o genótipo selvagem. Os filos *Candidatus* Poribacteria, Nitrospirae e Synergistetes apareceram em frequências relativamente iguais em ambas as rizosferas.

Acidobacteria foi mais abundante no *bulk soil* (4,65%) do que nas rizosferas. Na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (4,08%) se apresentou com maior frequência relativa do que na rizosfera do cultivado IAC Alvorada (3,96%). Este é um dos filos bacterianos detectados mais abundantes nos solos, onde ocorrem em abundâncias relativas entre 10 e 50%. Os membros deste filo são muito difíceis de isolar. As propriedades de degradação de polímeros revelam às acidobactérias como decompositores. O papel de Acidobacteria no ciclo do nitrogênio está relacionada com a capacidade de redução de nitratos e nitritos. Membros deste filo têm potencial para a resistência à dissecação, formação de biofilme, contribuição à estrutura do solo e à produção de novos compostos antimicrobianos (WARD et al., 2009; CHALLACOMBE et al., 2011). Essas características fazem provavelmente que este filo esteja mais associado com o *bulk soil* do que com as rizosferas (FIERER et al., 2007; ROCHA et al., 2013).

O grupo de filos Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae é conhecido como o superfilo PVC (KAMKE et al., 2014). Neste trabalho, dois membros desse superfilo tiveram diferenças significativas entre as amostras de *bulk soil* e rizosferas, o filo Planctomycetes e o filo Verrumicrobia. Esses filos estiveram entre os mais abundantes com frequência relativa superior a 2% nas rizosferas de ambos os genótipos de feijão.

O filo Planctomycetes apresentou uma frequência relativa superior na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (2,38%) do que na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (2,34%) e no *bulk soil* (2,05%). Membros desse filo têm sido descobertos em solos (cultivados, pastagens, floresta, e até solos térmicos) e não só em ambientes aquáticos. Estas bactérias são muito difundidas no solo e numericamente abundantes em solos agrícolas e florestais (4-7%). As variações no solo da matéria orgânica, conteúdo de Ca^{2+} e pH estão associadas com as variações na composição da comunidade de Planctomycetes nos solos (BUCKLEY et al., 2006). *Planctomycetes* é o único grupo bacteriano que não possui peptidoglicano nas paredes celulares, é por isso que são resistentes aos antibióticos que inibem a síntese da parede celular

como os β-lactâmicos e vancomicina. A maioria de isolados crescem vagarosamente, são aeróbicos ou quimiorganotróficos facultativos especializados no metabolismo de carboidratos. Porém existe evidência que alguns grupos deste filo podem ser metilotróficos e alguns membros deste filo possuem genes que codificam enzimas de transferência de C1, as quais têm sido encontradas também em arqueias metanogênicas e Proteobacteria oxidadoras de metano (FUERST; SAGULENKO, 2011).

O filo Verrucomicrobia mostrou uma frequência relativa maior na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (2,74%) do que na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (2,35%). Verrucomicrobia é estimado que compreenda entre 1,2-10,9% do total de bactérias no solo. Ocorrem em muitos habitats, a maioria são eutróficos, inclusive ambientes gravemente contaminados e em variadas temperaturas (SANGWAN et al., 2004). São bactérias Gram-negativas, com forma de cocos ou de haste. Tem poucos representantes cultivados (SCHLESNER et al., 2006). Em solos de pastagem a classe Spartobacteria é encontrada abundantemente, isso é possível pela abundância do hospedeiro dessas bactérias (nematoides do gênero *Xiphinema*) naqueles solos. Nos horizontes superficiais do solo a abundância de Verrucomicrobia pode estar relacionada ao estilo oligotrófico que tem Verrucomicrobia e poderia corresponder à oxidação de metano que ocorre em profundidades similares em solos de floresta (BERGMANN et al., 2011). Em sistemas de plantio direto, Verrucomicrobia foi um dos filos predominantes (QUADROS et al., 2012). No estudo de Rocha et al. (2013), foi encontrado que o gênero *Candidatus* Rhizospheria teve mais abundância na rizosfera de alho-poró do que no *bulk soil* e o gênero *Luteolibacter* foi mais cosmopolita, apresentando-se nas rizosferas de grama, batata e alho-poró.

O filo Gemmatimonadetes apresentou frequência relativa maior no *bulk soil* (0,63%). Entre as rizosferas, o genótipo selvagem Wild Mex teve a maior frequência relativa (0,56%) do que na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (0,47%). É reportado que Gemmatimonadetes compreende entre 0,2-6,5% das comunidades bacterianas do solo. As mais altas abundâncias deste filo são encontradas em solos e desertos áridos e semiáridos com pH neutro. Pode ser encontrado num amplo espectro de concentrações de nutrientes e estados redox, o que sugere que tem metabolismo versátil, permitindo ser organismos cosmopolitas (DeBRUYN et al., 2011). Foi descoberto que a adubação nitrogenada dos solos incrementou a abundância relativa de Gemmatimonadetes (CARBONETTO et al., 2014; YIN et al. 2010).

O filo Firmicutes teve a maior frequência relativa no *bulk soil* (2,04%) e entre as rizosferas foi superior na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (1,90%) do que na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (1,84%). Este filo tem bactérias principalmente Gram-

positivas com baixo conteúdo mol% G + C no DNA (ZHANG; LU, 2015). As classes Bacilli e Clostridia contêm espécies formadoras de endósporos que lhes permitem tolerar condições ambientais severas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; BUECHE et al., 2013).

O filo Deinococcus-Thermus foi mais abundante no *bulk soil* (0,34%) e entre as rizosferas a frequência relativa foi similar, sendo na rizosfera do feijão cultivado superior (0,33%) do que na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,31%). Este filo é conhecido por ser uma das bactérias mais extremófilas. As bactérias de Deinococcus são extremamente resistentes à radiação UV, dissecação e radiação ionizante (THEODORAKOPOULOS et al., 2013). São resistentes a agentes que prejudicam o DNA devido ao altamente eficiente sistema de reparação do DNA (GRIFFITHS; GUPTA, 2004). Por outro lado, Thermus são bactérias termófilas ou hipertermófilas isoladas de córregos térmicos poluídos, água corrente doméstica e industrial e de fontes hidrotermais com pH neutro a alcalino (THEODORAKOPOULOS et al., 2013; GRIFFITHS; GUPTA, 2004). O papel funcional deste filo na rizosfera ou no crescimento da planta permanecem bastante inexplorados. A espécie *Deinococcus ficus* foi isolada da rizosfera de *Ficus religiosa* L. é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, cresce em pH 5,5-10, resistente à irradiação UV (LAI et al., 2006). Na Antártica, Deinococcus-Thermus foi encontrado em solos secos com menos de 4% de umidade e de baixa produtividade (NIEDERBERG et al., 2008). No Brasil, foi encontrado em uma mina de cobre e sua presença esteve correlacionada positivamente com o cobre e com outros metais como zinco e níquel (PEREIRA et al., 2014).

O filo *Candidatus* Poribacteria foi mais abundante no *bulk soil* do que nas rizosferas e entre as rizosferas registrou valores similares (~0,26%). Filogeneticamente está situado como um filo contíguo ao superfilo PVC (KAMKE et al., 2014). Este filo é reportado por ter membros quase exclusivos encontrados em esponjas marinhas, mas também tem sido encontrado em solos. É um filo que contém bactérias mixotróficas com capacidade para fixar CO_2 pela via da acetil coenzima A (CoA) (SIEGL et al., 2011; LUO et al., 2014). Proteínas da família PhyH nos membros deste filo, conferem a capacidade para a absorção de fósforo orgânico dissolvido (KAMKE et al., 2014).

O filo Nitrospirae também foi encontrado com alta frequência relativa no *bulk soil* (0,57%) do que nas rizosferas, as quais tiveram similar frequência relativa (~0,45%). São bactérias de forma de haste espiral ou curvado, oxidadoras de ferro, redutoras quimiorganotróficos de sulfato e micro-organismos termófilos. Este filo contém o gênero *Nitrospira*, o qual é oxidador de nitritos (CAUMETTE et al., 2011). Nitrospirae pode ser encontrado em sistemas com manejo orgânico e pH elevado (ORR et al., 2011).

Já o filo Synergistetes teve uma frequência relativa ligeiramente superior no *bulk soil* (0,05%) do que nas rizosferas (~0,048%). Esse filo é encontrado em vários ambientes anaeróbicos como solo, poços de petróleo, tratos gastrointestinais e digestores anaeróbicos onde contribuem na produção de biogás. São bactérias Gram-negativas, com forma de haste e degradadoras de aminoácidos (JUMAS-BILAK et al., 2009). Várias cepas e espécies deste filo têm interesse para uso na área pecuária e de biodegradação (DOMÍNGUEZ-BELLO et al., 1997; DAVIS et al., 2012; SCHERR et al., 2012).

A presença diferencial dos filos Verrucomicrobia, Acidobacteria e Gemmatimonadetes na rizosfera de Wild Mex, sugere que esse genótipo foi capaz de recrutar micro-organismos com metabolismos versáteis, o filo Gemmatimonadetes pode ser indicador da maior fixação de nitrogênio desse genótipo, pois como foi indicado, este filo é estimulado pelo nitrogénio (CARBONETTO et al., 2014; YIN et al. 2010). Contrariamente, a abundância dos filos na rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada, como Firmicutes, Planctomycetes e Deinococcus-Thermus, indica que na rizosfera desse genótipo existem locais com algum tipo de estresse, pois bactérias desses filos ocorrem nessas condições (NIEDERBERG et al., 2008; FUERST; SAGULENKO, 2011; BUECHE et al., 2013).

Quanto aos gêneros de Bacteria, 150 gêneros apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) na frequência relativa entre as amostras de *bulk soil* e as rizosferas de feijão (Tabela 7).

Desses gêneros, 85 foram mais abundantes no *bulk soil*, 48 gêneros na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex e 17 gêneros na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada. Considerando apenas as rizosferas, como se mostra na Tabela 7, o genótipo selvagem Wild Mex conseguiu recrutar mais gêneros bacterianos (98) com frequência relativa superior do que o genótipo cultivado IAC Alvorada (52 gêneros).

Os gêneros bacterianos encontrados apresentam várias características como: simbiose, atenuação de estresses, formação de estruturas de sobrevivência, degradação de produtos xenobióticos no solo, patogenicidade e promoção do crescimento vegetal. Vários gêneros são generalistas, ou seja, aqueles que sobrevivem e são encontrados em grandes números no solo, como por exemplo, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, actinobactérias e acidobactérias. O outro tipo são os gêneros especialistas que mostram preferência por tipos de solo ou condições específicas para sobreviver, prosperam sob condições extremas no solo e estresses ambientais (ELSAS et al., 2007).

Tabela 7 – Gêneros de Bacteria significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média ($n = 5$) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM)

(continua)

Filo	Classe	Gênero[a]	*p*	% BS	% IA	% WM
Gêneros com maior frequência relativa na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada						
Proteobacteria	α-Proteobacteria	U. α-Proteobacteria	0,0081	3,398	3,118	3,156
Actinobacteria	Actinobacteria	*Conexibacter*	0,0242	2,376	2,455	2,142
Planctomycetes	Planctomycetacia	*Gemmata*	0,0464	0,669	0,768	0,727
Acidobacteria	U. Acidobacteria	U. Acidobacteria	0,0081	0,739	0,614	0,634
Planctomycetes	Planctomycetacia	U. Planctomycetaceae	0,0104	0,487	0,581	0,581
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Methylobacterium*	0,0060	0,573	0,554	0,501
Actinobacteria	Actinobacteria	*Micromonospora*	0,0090	0,471	0,359	0,351
Actinobacteria	Actinobacteria	*Arthrobacter*	0,0493	0,180	0,291	0,171
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Cupriavidus*	0,0493	0,255	0,271	0,232
Planctomycetes	Planctomycetacia	*Pirellula*	0,0087	0,187	0,249	0,247
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Variovorax*	0,0263	0,129	0,209	0,183
Firmicutes	Bacilli	*Bacillus*	0,0081	0,243	0,203	0,190
Actinobacteria	Actinobacteria	*Geodermatophilus*	0,0478	0,173	0,173	0,156
Actinobacteria	Actinobacteria	*Nakamurella*	0,0324	0,142	0,155	0,140
Proteobacteria	δ-Proteobacteria	*Desulfovibrio*	0,0263	0,163	0,150	0,145
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Hyphomicrobium*	0,0087	0,179	0,149	0,144
Planctomycetes	Planctomycetacia	*Blastopirellula*	0,0185	0,124	0,142	0,138
Actinobacteria	Actinobacteria	*Thermomonospora*	0,0063	0,128	0,137	0,122
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Agrobacterium*	0,0140	0,075	0,115	0,096
Actinobacteria	Actinobacteria	*Salinispora*	0,0271	0,116	0,113	0,103
Firmicutes	Bacilli	*Paenibacillus*	0,0271	0,117	0,109	0,107
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Starkeya*	0,0324	0,113	0,104	0,098
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	*Nitrosococcus*	0,0263	0,116	0,100	0,100
Firmicutes	Clostridia	*Thermaerobacter*	0,0140	0,105	0,100	0,091
Cyanobacteria	Gloeobacteria	*Gloeobacter*	0,0075	0,110	0,100	0,095
Deinococcus-Thermus	Deinococci	*Deinococcus*	0,0455	0,100	0,099	0,089
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Bordetella*	0,0424	0,101	0,088	0,087
Proteobacteria	δ-Proteobacteria	U. δ-Proteobacteria	0,0070	0,091	0,082	0,078
Deinococcus-Thermus	Deinococci	*Meiothermus*	0,0424	0,086	0,081	0,079
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Parvibaculum*	0,0092	0,077	0,065	0,065
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Xanthobacter*	0,0392	0,066	0,062	0,059
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Methylocella*	0,0155	0,067	0,059	0,056
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Roseomonas*	0,0090	0,072	0,059	0,059
Firmicutes	Bacilli	U. Bacillaceae	0,0068	0,060	0,044	0,039
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Roseobacter*	0,0185	0,043	0,041	0,037
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Nitrosospira*	0,0178	0,040	0,037	0,036
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Verminephrobacter*	0,0178	0,038	0,036	0,033
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Beijerinckia*	0,0344	0,041	0,035	0,034
Actinobacteria	Actinobacteria	*Thermobifida*	0,0140	0,029	0,033	0,026
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Acidiphilium*	0,0178	0,033	0,033	0,031
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Aurantimonas*	0,0271	0,036	0,031	0,030

Tabela 7 – Gêneros de Bacteria significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média ($n = 5$) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM)

(continuação)

Filo	Classe	Gênero	*p*	% BS	% IA	% WM
Actinobacteria	Actinobacteria	U. Micrococcaceae	0,0128	0,013	0,025	0,012
Planctomycetes	Planctomycetacia	U. Planctomycetales	0,0140	0,019	0,025	0,022
Actinobacteria	Actinobacteria	*Dermacoccus*	0,0324	0,016	0,016	0,013
Proteobacteria	α-Proteobacteria	U. Hyphomicrobiaceae	0,0178	0,018	0,014	0,013
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Ca.* Puniceispirillum	0,0478	0,011	0,011	0,009
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Dinoroseobacter*	0,0424	0,011	0,010	0,008
Proteobacteria	β-Proteobacteria	U. Nitrosomonadaceae	0,0063	0,011	0,009	0,008
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	*Chromohalobacter*	0,0305	0,008	0,007	0,006
Acidobacteria	Acidobacteria	U. Acidobacteriales	0,0455	0,008	0,006	0,006
Aquificae	Aquificae	*Hydrogenobaculum*	0,0088	0,003	0,002	0,001
Firmicutes	Clostridia	*Catonella*	0,0248	0,001	0,001	0,001
Gêneros com maior frequência relativa na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex						
U. Bacteria	U. Bacteria	U. Bacteria	0,0226	28,814	27,466	27,662
Proteobacteria	U. Proteobacteria	U. Proteobacteria	0,0124	6,487	5,881	6,071
Acidobacteria	Solibacteres	*Ca.* Solibacter	0,0113	2,470	2,157	2,197
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Rhizobium*	0,0090	0,260	1,905	2,047
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	U. Verrucomicrobia sub. 3	0,0045	0,642	0,878	1,039
Proteobacteria	α-Proteobacteria	U. Rhizobiaceae	0,0092	0,151	0,860	0,919
Proteobacteria	β-Proteobacteria	U. Burkholderiales	0,0344	0,715	0,709	0,813
Proteobacteria	β-Proteobacteria	U. β-Proteobacteria	0,0263	0,766	0,663	0,726
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Burkholderia*	0,0242	0,734	0,673	0,680
Acidobacteria	U. Acidobacteria	*Ca.* Koribacter	0,0052	0,721	0,585	0,621
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	*Gemmatimonas*	0,0037	0,615	0,463	0,549
Proteobacteria	δ-Proteobacteria	*Anaeromyxobacter*	0,0271	0,607	0,516	0,547
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	U. γ-Proteobacteria	0,0185	0,409	0,342	0,410
Nitrospirae	Nitrospira	*Nitrospira*	0,0113	0,516	0,403	0,406
Verrucomicrobia	U. Verrucomicrobia	U. Verrucomicrobia	0,0031	0,288	0,332	0,383
Acidobacteria	Acidobacteria	*Acidobacterium*	0,0060	0,413	0,348	0,363
Planctomycetes	Planctomycetacia	*Planctomyces*	0,0093	0,301	0,346	0,358
Verrucomicrobia	Opitutae	*Opitutus*	0,0059	0,237	0,274	0,342
Actinobacteria	Actinobacteria	U. Micromonosporaceae	0,0090	0,388	0,250	0,254
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	U. Xanthomonadaceae	0,0060	0,208	0,094	0,182
Proteobacteria	α-Proteobacteria	U. d. α-Proteobacteria	0,0059	0,209	0,184	0,170
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	*Verrucomicrobium*	0,0240	0,126	0,143	0,155
Proteobacteria	α-Proteobacteria	U. Sphingomonadales	0,0019	0,225	0,081	0,134
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	U. d. γ-Proteobacteria	0,0167	0,148	0,128	0,131
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Phenylobacterium*	0,0464	0,113	0,098	0,120
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Polaromonas*	0,0498	0,118	0,109	0,118
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	*Xanthomonas*	0,0081	0,126	0,083	0,112
Acidobacteria	Acidobacteria	*Terriglobus*	0,0093	0,119	0,101	0,108
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Sphingomonas*	0,0019	0,153	0,089	0,108
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Methylibium*	0,0263	0,065	0,068	0,096

Tabela 7 – Gêneros de Bacteria significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média ($n = 5$) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM)

(continuação)

Filo	Classe	Gênero	*p*	% BS	% IA	% WM
Proteobacteria	α-Proteobacteria	U. Sphingomonadaceae	0,0019	0,179	0,068	0,096
Firmicutes	Bacilli	U. Bacillales	0,0365	0,106	0,095	0,096
Bacteroidetes	Sphingobacteria	*Rhodothermus*	0,0380	0,098	0,085	0,090
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	U. Enterobacteriaceae	0,0265	0,089	0,080	0,089
Proteobacteria	δ-Proteobacteria	*Syntrophobacter*	0,0133	0,104	0,088	0,088
Bacteroidetes	Sphingobacteria	*Mucilaginibacter*	0,0380	0,045	0,058	0,077
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Azospirillum*	0,0498	0,083	0,075	0,075
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Leptothrix*	0,0437	0,063	0,061	0,074
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Achromobacter*	0,0090	0,080	0,073	0,073
Acidobacteria	Acidobacteria	U. Acidobacteriaceae	0,0207	0,079	0,065	0,070
Verrucomicrobia	Opitutae	U. Opitutaceae	0,0059	0,030	0,043	0,069
Verrucomicrobia	Opitutae	U. d. Opitutaceae	0,0108	0,038	0,048	0,068
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	*Marinobacter*	0,0358	0,075	0,065	0,067
Acidobacteria	U. Acidobacteria	U. Acidobacteria	0,0128	0,080	0,067	0,066
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Novosphingobium*	0,0092	0,054	0,039	0,055
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Rhodomicrobium*	0,0081	0,067	0,052	0,054
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Sphingobium*	0,0019	0,066	0,043	0,051
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Sphingopyxis*	0,0209	0,066	0,030	0,048
Cyanobacteria	U. Cyanobacteria	*Acaryochloris*	0,0189	0,052	0,046	0,047
Deinococcus-Thermus	Deinococci	*Truepera*	0,0189	0,051	0,046	0,046
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Erythrobacter*	0,0040	0,051	0,031	0,040
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Brevundimonas*	0,0087	0,037	0,029	0,039
Bacteroidetes	Cytophagia	*Microscilla*	0,0455	0,031	0,034	0,037
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Oceanicola*	0,0185	0,038	0,033	0,034
Bacteroidetes	Sphingobacteria	U. Sphingobacteriaceae	0,0162	0,018	0,023	0,033
Bacteroidetes	Flavobacteria	U. Flavobacteriaceae	0,0263	0,025	0,026	0,033
Proteobacteria	δ-Proteobacteria	*Desulfuromonas*	0,0498	0,040	0,032	0,033
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Dechloromonas*	0,0324	0,035	0,028	0,032
Cyanobacteria	U. Cyanobacteria	*Microcystis*	0,0271	0,031	0,027	0,032
Proteobacteria	β-Proteobacteria	U. d. Burkholderiales	0,0240	0,016	0,021	0,032
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	*Pseudoxanthomonas*	0,0068	0,036	0,021	0,031
Bacteroidetes	Cytophagia	U. Cytophagales	0,0478	0,017	0,017	0,028
Ca. Poribacteria	U. Ca. Poribacteria	U. *Ca.* Poribacteria	0,0226	0,030	0,026	0,026
Chlorobi	Chlorobia	*Chloroherpeton*	0,0380	0,023	0,020	0,026
Chlorobi	Chlorobia	U. Chlorobiaceae	0,0478	0,025	0,023	0,026
Proteobacteria	β-Proteobacteria	U. Oxalobacteraceae	0,0365	0,024	0,018	0,023
Firmicutes	Bacilli	*Brevibacillus*	0,0077	0,027	0,020	0,023
Verrucomicrobia	Opitutae	*Coraliomargarita*	0,0183	0,016	0,019	0,022
Bacteroidetes	Flavobacteria	*Maribacter*	0,0455	0,015	0,014	0,017
Proteobacteria	β-Proteobacteria	*Curvibacter*	0,0380	0,012	0,015	0,017
Acidobacteria	U. Acidobacteria	*Ca.* Chloracidobacterium	0,0305	0,018	0,014	0,016
Chlamydiae	Chlamydiae	U. Chlamydiales	0,0437	0,010	0,012	0,015

Tabela 7 – Gêneros de Bacteria significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média ($n = 5$) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM)

(conclusão)

Filo	Classe	Gênero	*p*	% BS	% IA	% WM
Bacteroidetes	Flavobacteria	U. Flavobacteria	0,0226	0,009	0,009	0,013
Bacteroidetes	Cytophagia	*Leadbetterella*	0,0189	0,014	0,010	0,013
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Citromicrobium*	0,0025	0,017	0,009	0,012
Actinobacteria	Actinobacteria	*Leifsonia*	0,0242	0,007	0,011	0,012
Bacteroidetes	Flavobacteria	*Zunongwangia*	0,0113	0,008	0,006	0,009
Cyanobacteria	U. Cyanobacteria	*Synechocystis*	0,0092	0,011	0,007	0,008
Chlamydiae	Chlamydiae	*Waddlia*	0,0207	0,005	0,008	0,008
Bacteroidetes	U. Bacteroidetes	*Ca.* Amoebophilus	0,0271	0,005	0,005	0,008
Verrucomicrobia	Opitutae	U. Opitutae	0,0324	0,004	0,006	0,008
Firmicutes	Clostridia	*Syntrophomonas*	0,0140	0,009	0,006	0,008
Bacteroidetes	Flavobacteria	*Capnocytophaga*	0,0090	0,004	0,004	0,007
Bacteroidetes	Flavobacteria	*Gramella*	0,0189	0,007	0,005	0,007
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	*Colwellia*	0,0324	0,006	0,005	0,007
Proteobacteria	α-Proteobacteria	*Zymomonas*	0,0162	0,010	0,005	0,006
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	*Neptuniibacter*	0,0347	0,005	0,005	0,006
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	*Methylophaga*	0,0185	0,005	0,004	0,005
Aquificae	Aquificae	*Thermocrinis*	0,0122	0,005	0,003	0,005
Elusimicrobia	Elusimicrobia	*Elusimicrobium*	0,0493	0,004	0,003	0,005
Actinobacteria	Actinobacteria	U. Microbacteriaceae	0,0271	0,001	0,002	0,003
Proteobacteria	ε-Proteobacteria	U. Campylobacterales	0,0493	0,001	0,001	0,003
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	*Thiomicrospira*	0,0380	0,003	0,002	0,002
Aquificae	Aquificae	U. Hydrogenothermaceae	0,0388	0,001	0,001	0,002
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	U. Oceanospirillales	0,0081	0,002	0,001	0,002
Proteobacteria	α-Proteobacteria	U. Rhodospirillales	0,0324	0,002	0,001	0,001
Actinobacteria	Actinobacteria	U. Dermacoccaceae	0,0221	0,000	0,001	0,001
Proteobacteria	ε-Proteobacteria	U. Helicobacteraceae	0,0292	0,000	0,000	0,001

[a] U.: Unclassified (não classificado); U. d.: não classificado derivado de; *Ca.*: *Candidatus.*

4.2.2.2 Gêneros bacterianos fixadores de nitrogênio na rizosfera de feijão

O nitrogênio é requerido por todos os organismos vivos para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos que contêm nitrogênio. O nitrogênio atmosférico (N_2) contido na atmosfera precisa ser fixado ou reduzido (combinado com hidrogênio) para amônia (NH_3) para ser usado pelas plantas. Essa conversão do N_2 para NH_3 (amônia) é realizada por várias bactérias. Uma vez fixado, as plantas usam este nitrogênio para construir proteínas que entram e passam através da cadeia trófica (PENA-CABRIALES; ALEXANDER, 1983).

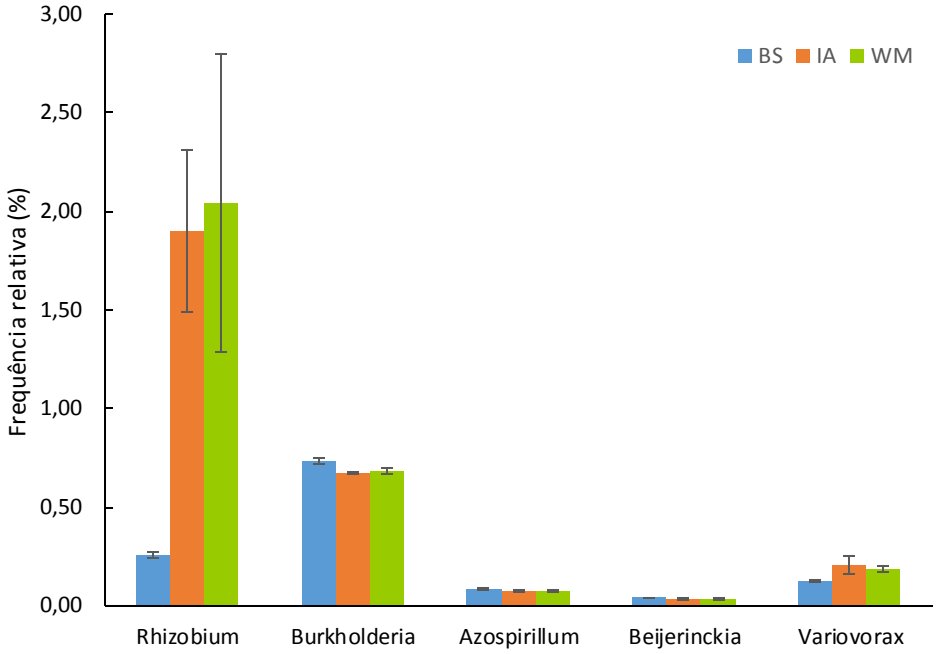

Figura 11 – Frequência relativa média (n = 5) dos gêneros fixadores de nitrogênio significativamente diferentes (p < 0,05, teste de Kruskal-Wallis) entre o *bulk soil* (BS) e as rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e feijão selvagem Wild Mex (WM)

Comparando as rizosferas, os gêneros *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Azospirillum* foram relativamente mais abundantes na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex do que na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada, onde *Beijerinckia* e *Variovorax* apresentam uma frequência relativa maior (Figura 11).

O gênero *Rhizobium* (α-Proteobacteria) é bem conhecido pela sua capacidade para fixar N_2. Este gênero foi relativamente maior na rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex (2,05%) do que no genótipo cultivado IAC Alvorada (1,90%) e muito superior, como era esperado, do que o *bulk soil* (0,26%). Isto leva a inferir que o solo rizosférico pode ser um indicador do nível da simbiose entre *Rhizobium* e diferentes genótipos de feijão e que a rizosfera é um microambiente mais favorável para a manutenção de *Rhizobium* do que o solo sem plantas ou sem leguminosas parceiras, onde têm que usar rapidamente uma variedade de compostos orgânicos do solo como fontes nutricionais para o crescimento, além de lidar competindo com outras bactérias e ser consumidos por protozoários (PENA-CABRIALES; ALEXANDER, 1983; GERMIDA, 1988).

O feijão é considerado um hospedeiro promíscuo e é nodulado por uma variedade de rizóbios. O estresse ambiental, como acidez, altas temperaturas do solo e baixo conteúdo de umidade nos solos, é limitante para a fixação de nitrogênio e para a simbiose rizóbios-feijão em grandes áreas no mundo (GUTIERREZ; BARRAQUIO, 2010; KASCHUK et al., 2006). Nos

solos do Brasil, tem sido reportada a simbiose do feijão com *Rhizobium tropici, R. etli, R. leguminosarum* e *R. girdinii* e com bactérias dos gêneros, *Azorhizobium, Bradyrhizobium, Burkholderia, Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* (KASCHUK et al., 2006; TORRES et al., 2009; SILVA et al., 2012).

A diferença encontrada entre as frequências relativas de *Rhizobium* nas rizosferas do feijão cultivado e selvagem concorda com outros estudos onde se reporta que a seletividade de *Rhizobium* é afetada pelo tipo de solo, manejo do cultivo e pelo cultivar utilizado. Assim, Kaschuk et al. (2006), encontraram que em sistemas de plantio direto, onde a oscilação da temperatura e umidade no solo é homogênea e há grande disponibilidade de C e N, houve maior capacidade de fixação de N_2 do que nos sistemas convencionais de plantio, onde as bactérias precisam metabolizar um maior número de compostos de C e N, desempenhando várias funções para sobreviver além da sua função de fixar nitrogênio. Em outro estudo no México, foi encontrado maior eficiência na interação entre *R. etli* e raças locais de feijão do que em áreas com manejo convencional. O uso de adubos químicos nitrogenados e de novas e homogêneas variedades de feijão tiveram efeito sobre a interação de *Rhizobium* com os genótipos de feijão (SOUZA et al., 1997). Também foi demonstrado que *Rhizobium elti* têm altos níveis de simbiose com feijões selvagens, a maioria de isolados foram obtidos desses feijões e as populações se agruparam de forma homogênea em comparação com os feijões cultivados (SOUZA et al., 1994). No Brasil, Torres et al. (2009) encontraram que o feijão Mineiro Precoce (origem andina) capturou a maioria dos rizóbios isolados (*Mesorhizobium loti* e *Rhizobium tropici*) do que o feijão Ouro Negro (origem mesoamericana). Kawaka et al. (2014) observaram incremento do peso seco, concentração de nitrogênio e maior simbiose nas plantas de feijão com os rizóbios nativos do que nas plantas com os inoculantes comerciais.

O gênero *Burkholderia* (β-Proteobacteria) foi encontrado com maior frequência no *bulk soil* (0,73%) do que nas rizosferas nas quais foi similar (~0,68%). Isto é explicado pelo fato de que se trata de uma bactéria capaz de fixar N_2 tanto como bactéria de vida livre bem como em simbiose com espécies leguminosas. Esta bactéria tem sido isolada no Brasil em solos da Amazônia muito ácidos e demostrou a habilidade de fixar nitrogênio como micro-organismo de vida livre, solubilizar fosfato de cálcio e possuir atividade antifúngica *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (SILVA et al., 2012). Essas características fazem que várias espécies *Burkholderia* sejam consideradas como rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) (CABALLERO-MELLADO et al., 2007; PEIX et al., 2001; SILVA et al., 2012). Esta bactéria é o principal simbionte nodulador de espécies de leguminosas *Mimosa* spp. (CYRIL et al., 2010; ELLIOT et al. 2007). Peix et al. (2001), observaram incremento

significativo do conteúdo de fósforo e nitrogênio nas plantas de feijão inoculadas com a cepa *B. cepacia* SAOCV2 do que as plantas não inoculadas, além do aumento do número de nódulos e inibição do crescimento de *F. solani* f. sp. *phaseoli* nas plantas. Resultados similares foram obtidos por Sánchez et al. (1994) que inocularam sementes de feijão com a cepa de *B. cepacia* UPR 5C e a severidade de *Macrophomina phaseolina* diminuiu 71% e encontraram compatibilidade com *Rhizobium phaseoli* CIAT 632.

O gênero *Azospirillum* (α-Proteobacteria) teve ligeiras variações na frequência relativa entre o *bulk* e as rizosferas de feijão, sendo maior no *bulk soil* (0,083%) do que nas rizosferas (0,075%). *Azospirillum* pode sobreviver no solo devido a que forma estruturas celulares dormentes chamados cistos que também podem ser formas ativas capazes de fixar nitrogênio na ausência duma fonte externa de carbono (BASHAN; HOLGUIN, 1996). Este gênero se caracteriza por conter bactérias de vida livre fixadoras de nitrogênio. Se pode encontrar associado tanto com raízes de gramíneas quanto como com espécies não gramíneas como as leguminosas nas quais tem sido descoberto que incrementa a nodulação por rizóbios (ANTOUN; PRÉVOLST, 2006). É uma rizobactéria muito versátil, pois além da fixação de nitrogênio, é capaz de mineralizar nutrientes do solo, sequestrar Fe (BARASSI et al., 2007) e produzir fitohormônios (BASHAN; HOLGUIN, 1996).

O gênero *Beijerinckia* (α-Proteobacteria) também ocorreu mais abundantemente no *bulk soil* (0,04%) do que nas rizosferas (~0,03%). Provavelmente isso seja devido ao fato de serem bactérias de vida livre, aeróbicas também com capacidade de fixar N_2 e extremamente tolerantes à acidez (até 2,7 pH). Este gênero é encontrado em solos tropicais, por exemplo, um isolado *Beijerinckia derxii* obtido do solo de Cerrado produziu AIA, poliaminas e etileno, além disso, produziu muco pode melhorar a retenção de água no solo o que beneficia às plantas (THULER et al., 2003).

O gênero *Variovorax* (β-Proteobacteria) mostrou maior frequência relativa nas rizosferas (~0,20%) do que no *bulk soil* (0,13%). Este gênero está associado à promoção do crescimento vegetal como parte do consórcio com diazotróficos noduladores (JAMIESON et al., 2009) e também desempenha um importante papel como biodegradador celulolítico e formador de biofilmes complexos (MAIMAITI et al., 2007; GHIO et al., 2012).

4.2.2.3 Gêneros bacterianos nitrificadores na rizosfera de feijão

A nitrificação (oxidação de amônia e de nitritos) é feita por bactérias litotróficas nitrificantes presentes numa grande variedade de habitats como solos, roxas, água doce e marinha e sedimentos (KOOPS et al., 2001); é realizada pelas bactérias oxidadoras de amônia

(AOB) e pelas bactérias oxidadoras de nitritos (NOB), geralmente a primeira etapa (oxidação de amônia) é dada numa taxa limitante (FREITAG et al, 2005). Ao contrário das AOB, as NOB são altamente diversas em ambientes complexos do solo (XIA et al., 2011).

Os micro-organismo litotróficos AOB são *Nitrosococcus* (γ-Proteobacteria), *Nitrosospira* e *Nitrosomonas* (β-Proteobacteria) (KOOPS et al., 2001; XIA et al., 2011).

Os gêneros significativamente diferentes de AOB encontradas no *bulk soil* e rizosferas foram *Nitrosococcus* e *Nitrosospira*. O gênero *Nitrosomonas* não teve diferenças significativas na frequência relativa entre as amostras de *bulk soil* e rizosferas, e foi mais abundante no *bulk soil* (0,05%, dado não mostrado). *Nitrosococcus* e *Nitrosospira* tiveram maior frequência relativa no *bulk soil* (respectivamente 0,116% e 0,040%) do que nas rizosferas (respectivamente ~0,100% e ~0,036%), onde a diferença nas frequências relativas foi menor. Estes gêneros ocorrem em solos naturais (charnecas, pastagens e solos de floresta) ácidos (pH 4-6), roxas (naturais e pedras para construção) e ocasionalmente em água doce (KOOPS et al., 2001). O gênero *Nitrosococcus* foi mais abundante que *Nitrosospira*, isto é esperado, pois *Nitrosococcus* colabora como o dominante nitrificador dentro das bactérias oxidadoras de amônia nas camadas hipóxicas de várias zonas com oxigênio mínimo nas quais a oxidação de amônia domina o processo de remover nitrogênio do sistema (MATSUBA et al., 2003; CAMPBELL et al., 2011). *Nitrosospira* é sensível à variação da temperatura, umidade e fertilidade do solo. A abundância desse gênero tende a ser maior quando a umidade do solo e a temperatura aumentam (AVRAHAMI; BOHANNAN, 2007) e é restringida a solos ácidos (MARTIKAINEN; NURMIAHO-ASSILA, 1985; BOER et al., 1995; NUGROHO et al., 2006).

A comunidade de NOB é composta por *Nitrotoga* (β-Proteobacteria), *Nitrobacter* (α-Proteobacteria), *Nitrococcus* (γ-Proteobacteria), *Nitrospina* (δ-Proteobacteria) e *Nitrospira* (Nitrospirae) (KOOPS et al., 2001; XIA et al., 2011).

O único gênero das NOB significativamente diferente entre o *bulk soil* e as rizosferas, foi *Nitrospira* e foi o mais abundante no *bulk soil* (0,516%) do que nas rizosferas. Entre as rizosferas, apresentou frequência relativamente maior na rizosfera de feijão selvagem Wild Mex (0,406%) do que na rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada (0,403%). Com o sequenciamento metagenômico também foram detectados outros gêneros NOB, como *Nitrobacter* e *Nitrococcus*, mas não foram significativamente diferentes entre as amostras de *bulk soil* e rizosferas, esses gêneros mostraram uma frequência relativa superior no *bulk soil* (0,17% e 0,04%, respectivamente; dados não mostrados) do que nas rizosferas (~0,16% e ~0,03%, respectivamente; dados não mostrados). *Nitrospira* como NOB são bactérias estrategistas *K* (ATTARD et al., 2010). *Nitrospira* estão entre as bactérias oxidadoras de nitritos

mais diversas e amplamente difundidas nos ecossistemas naturais. Possuem a enzima nitrito óxido-redutase (NXR) e outras proteínas para a oxidação de nitritos e parecem ser bastante eficientes em substratos com baixas concentrações de nitritos (KOOPS et al., 2001; LÜCKER et al., 2010), isso pode corroborar o estilo de vida mixotrófico que lhe permite competir com sucesso nos ambientes naturais e pode fornecer mais evidência da seleção para nitrificadores pouco adaptados nos solos (DAEBELER et al., 2014). Novos grupos de *Nitrospira* apareceram em solos de pastagem que foram adubados com nitrogênio durante um longo período do que nos solos não adubados. A ubiquidade e alta abundância de *Nitrospira* em comunidades naturais, poderia indicar que *Nitrospira* desempenha outras funções nos processos do ecossistema além da oxidação de nitritos, pois essa função não poderia suportar esses altos níveis populacionais (FREITAG et al., 2005).

4.2.2.4 Gêneros bacterianos solubilizadores de fosfato na rizosfera de feijão

Do mesmo modo como o nitrogênio, o fósforo também é um elemento essencial para a sobrevivência da célula devido à sua presença nos lipídios e ácidos nucleicos, bem como seus papéis na modificação proteica pós-tradução e transferência de energia (GOLDSMITH et al., 2011). Os micro-organismos aumentam a disponibilidade de P às plantas através da mineralização do fósforo orgânico no solo e através da solubilização de fosfatos precipitados. A solubilização do fósforo é uma atividade determinada pelos micro-organismos que produzem metabólitos como ácidos orgânicos, os quais através dos seus grupos hidroxila e carboxila quelatam o cátion (Al, Fe, Ca) ligado ao fosfato e o fosfato é convertido para formas solúveis. As bactérias são mais eficientes na solubilização de fósforo do que fungos. Da população microbiana inteira, 1-50% é constituído por bactérias solubilizadoras de fósforo, enquanto que fungos solubilizadores de fósforo alcançam 0,1-0,5% da solubilização potencial do fósforo (KHAN et al., 2009). Espécies bacterianas de: *Pseudomonas, Bacillus, Rhizobium* e *Enterobacter*, *Nitrosomonas* e *Thiobacillus* podem dissolver fosfatos mediante a produção de ácidos. Cepas de *Enterobacter, Arthrobacter, Azotobacter* possuem a habilidade de solubilizar fosfato de tri-cálcio (TCP), além disso, essas cepas produzem uma significativa quantidade de EPS. Fungos como *Penicillium* e *Aspergillus* são os mais potentes solubilizadores de fósforo. O fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora* tem a habilidade de solubilizar roxas fosfóricas (SHARMA et al., 2013). Neste trabalho, os gêneros *Rhizobium, Bacillus* e *Arthrobacter* foram os gêneros que apresentaram diferença significativa na frequência relativa entre as amostras de *bulk soil* e as rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada e selvagem Wild Mex, como foi descrito anteriormente.

O gênero *Bacillus* (Firmicutes) apareceu relativamente mais abundante no *bulk soil* (0,24%) do que nas rizosferas onde teve frequências relativas similares (~0,20%). Isso pode ser possivelmente porque muitas espécies podem crescer no solo como saprofíticas e têm a capacidade de formar esporos para sua sobrevivência durante períodos desfavoráveis (VILAIN et al., 2006; PANDEY; PALNI, 1997; RAMOS et al., 1998). Os valores nas rizosferas podem ser devido a diferenças dos exsudatos radiculares para atrair essas espécies, pois foi demonstrado em plantas de pepino que o exsudato ácido cítrico funcionou como quimioatraente e o ácido fumárico como um estimulador da formação do biofilme por *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 (LIU et al., 2014). No feijão, o ácido fumárico, o ácido oxálico e o ácido maleico são detectados nos exsudatos radiculares (TAWARAYA et al., 2014). Este gênero tem sido de grande interesse por ser uma das rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR). Em vários estudos *in vitro* e *in vivo* com vários cultivos, cepas e espécies de *Bacillus* têm mostrado promoção do crescimento vegetal e atividade antagonista. Membros deste gênero são capazes de formar sideróforos, fitase, AIA (KARIMI et al., 2012; HUANG et al., 2015), ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) deaminase, cianógenos, enzimas líticas como xilanase, oxalato oxidase e solubilização de várias fontes de fosfatos orgânicos e inorgânicos bem como potássio e zinco (ROY; HABIB, 2009; KUMAR et al., 2012). Várias espécies têm sido efetivas para o biocontrole de fitopatógenos como: *Macrophomina phaseolina, Fusarium oxysporum, F. solani, Sclerotinia sclerotiorum, Rhizoctonia solani, Colletotrichum* sp. e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (KUMAR et al., 2012; HUANG et al., 2015). Cepas de *B. subtilis* produzem os antibióticos iturina A e surfactina os quais estariam envolvidos na supressão de doenças (McSPADDEN, 2004).

O gênero *Arthrobacter* (Actinobacteria) teve maior frequência relativa na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (0,29%) do que no *bulk soil* e na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (~0,18%). Este gênero é frequentemente isolado do solo, são bactérias aeróbicas, metabólica e ecologicamente diversas, têm a habilidade de sobreviver em ambientes com condições adversas (limitação nutricional, radiação ionizante, químicos tóxicos) por longos períodos de tempo (ESCHBACH et al., 2003; MONGODIN et al., 2006). É um ótimo solubilizador de fosfatos através da secreção de ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido glucônico, ácido lático, ácido sucínico, ácido propiônico) e demonstrou atividade de promoção do crescimento vegetal (CHEN et al., 2006; BANERJEE et al., 2010).

4.2.2.5 Gêneros bacterianos oxido-redutores do enxofre na rizosfera de feijão

O enxofre é requerido pelos organismos para a síntese de proteínas. A transformação biológica do enxofre é um processo cíclico que compreende componentes aeróbicos e anaeróbicos. A máxima oxidação que o enxofre apresenta é como sulfato (SO_4^{2-}) o qual é reduzido para sulfito (S^{2-}) pela maioria de bactérias, fungos e plantas antes da incorporação em aminoácidos. Este processo é chamado como redução assimilatória do sulfato e é puramente um processo biosintético. Virtualmente todo o sulfato reduzido é liberado como sulfito (S^{2-}) e poderia ser convertido para ácido sulfídrico (H_2S) ou sulfeto (HS^-). A redução dissimilatória do sulfato é feita anaeróbicamente pelas bactérias redutoras de sulfato (GIBSON, 1990).

O gênero *Thiomicrospira* (γ-Proteobacteria) teve uma frequência relativa extremamente baixa nas amostras e foi ligeiramente superior no *bulk soil* (0,003%) em comparação com as rizosferas (0,002%). Esse gênero, junto com *Thiobacillus* (β-Proteobacteria) e *Thiosphaera* (α-Proteobacteria), são bactérias Gram-negativas atualmente conhecidas como micro-organismos oxidadores de enxofre, que exibem crescimento quimiolitotrófico sobre compostos de enxofre inorgânico, principalmente como sulfureto, enxofre e tiossulfato, mas heterótrofos como *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Algaligenes* e *Pseudomonas* também conseguem oxidar enxofre (VIDYALAKSHMI et al., 2009). O principal produto da oxidação é o sulfato, mas enxofre também é formado em meio de crescimento *in vitro*. A forma celular de *Thiomicrospira* lhe permite penetrar facilmente em pequenos capilares nas partículas de lama. *Thiomicrospira* é altamente tolerante ao sulfureto (KUENEN; VELDKAMP, 1972).

Os gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfuromonas* (δ-Proteobacteria), conhecidas como bactérias redutoras de sulfato, tiveram uma frequência relativa superior no *bulk soil* (~0,10%) do que nas rizosferas (0,09%) e *Desulfovibrio* foi dominante sobre *Desulfuromonas*. O sulfato é reduzido a sulfito hidrogênio (H_2S) através das bactérias anaeróbicas obrigatórias do gênero *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas* e *Desulforomonas*. Esse processo ocorre facilmente em situações onde a compactação do solo contendo sulfato e o encharcamento de água, restringem a difusão do oxigênio e fornecem o suficiente sulfato como o aceptor terminal de elétrons para as bactérias anaeróbicas (DALSGAARD; BAK, 1994; MOORE et al., 1976). *Desulfovibrio* pode ocupar diferentes nichos dentro do habitat do solo e, portanto, é esperado que uma cepa supere a outra num ambiente altamente heterogêneo como o solo, isto possibilita que um vasto número de organismos similares coexista dentro de um ecossistema (ROSENCRANTZ et al., 1999).

4.2.2.6 Ocorrência de gêneros de Cyanobacteria na rizosfera de feijão

O filo Cyanobacteria esteve representado por quatro gêneros que apresentaram diferenças significativas na frequência relativa entre as amostras de *bulk soil* e as rizosferas (*Gloeobacter, Acaryochloris, Microcystis* e *Synechocystis*). Cyanobacteria no solo exercem funções como a fotossíntese oxigênica, fixação de nitrogênio, liberam AIA, a mucilagem que secretam pode contribuir na formação de agregados do solo e podem solubilizar fosfatos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O gênero *Gloeobacter* apresentou uma frequência relativa ligeiramente superior no *bulk soil* (0,11%) do que nas rizosferas (~0,10). Este gênero contém bactérias que desenvolvem a fotossíntese no citoplasma porque não têm tilacoides; pode ser isolada de roxas calcárias e de cavernas, têm crescimento lento (72 h), temperatura 27-37ºC e luz fraca (NAKAMURA et al., 2003; SAW et al., 2013).

O gênero *Acaryochloris* teve uma frequência relativamente superior no *bulk soil* (0,051%) do que nas rizosferas, onde apresentou frequências relativas similares (~0,045%). Este gênero é particular devido a que usa a clorofila *d* como seu principal pigmento fotossintético. É encontrada em vários nichos ecológicos. A vantagem de usar a clorofila *d* e clorofilas de comprimentos de onda longa em cianobactéria, é que tem propriedades únicas de absorção e seu potencial incremento na eficiência fotossintética (SWINGLEY et al., 2008; LOUGHLIN et al., 2013; NARIKAWA et al., 2015).

O gênero *Microcystis* mostrou valores de frequências relativas similares no *bulk soil* e nas rizosferas, foi ligeiramente superior na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,032%). Estas cianobactérias são capazes de crescer com baixos níveis de fósforo e também têm a habilidade para acumular fósforo (BALDIA et al., 2007). Utiliza eficientemente o fósforo de lugares onde é limitante, pode utilizar tanto o fósforo disponível ligado a alumínio, ferro ou argila bem como o fósforo ligado a carbonato, apatita e fósforo residual, pelo qual é dominante em lagos eutróficos (BALDIA et al. 2007; OKUBO et al., 2012).

O gênero *Synechocystis* teve baixos e similares valores de frequências relativas no *bulk soil* e rizosferas, e foi relativamente maior no *bulk soil* (0,01%). Este gênero libera oxigênio que permite a proliferação de metanotróficos, o que contribui na aceleração da oxidação do metano. A oxidação do metano pode consumir até 90% do metano potencial; essa função é realizada pelos metanotróficos que são abundantes em sítios óxicos como água estancada na superfície do solo e rizosfera do arroz, eles oxidam o metano para dióxido de carbono obtendo energia desta reação (PRASANNA et al., 2002).

4.2.2.7 Gêneros de Acidobacteria, Planctomycetes, Verrucomicroba e Bacteroidetes na rizosfera de feijão

Candidatus Solibacter foi único gênero significativamente diferente de Acidobacteria entre as amostras de *bulk soil* e rizosferas, além disso foi um dos gêneros mais abundantes, teve maior frequência relativa no *bulk soil* (2,47%) do que nas rizosferas, onde apresentou frequência relativa maior na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (2,20%) do que na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (2,16%). A dominância de *Candidatus* Solibacter no *bulk soil* pode ser devido a sua característica especialista, dado que tem a habilidade de biogênese da parede celular o que incrementa a percepção e a resposta às mudanças ambientais para manter o seu metabolismo (CHALLACOMBE et al., 2011). Espécies como *Ca.* Solibacter usitatus cepa Ellin6076 têm habilidade de usar substratos complexos em baixas concentrações como xileno, hemicelulose, pectina, amido e quitina o que as torna mais competitivas do que outras espécies (WARD et al., 2009; CHALLACOMBE et al., 2011).

Gêneros do filo Planctomycetes como *Planctomyces* foi mais abundante na rizosfera de Wild Mex (0,36%) do que no *bulk soil* (0,30%) e rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (0,35%). Esse gênero resulta mais abundante quando existem condições anóxicas como nos solos alagados de arroz onde a diversidade de *Planctomyces* é maior no *bulk soil* do que na rizosfera óxica, isso pode indicar que a distribuição do oxigênio no solo afeta a comunidade de membros do filo Planctomycetes (BUCKLEY et al., 2006).

O outro gênero de Planctomycetes foi *Pirellula* que teve valores superiores e similares de frequência relativa nas rizosferas (~0,25%) do que no *bulk soil* (0,19%). Esse gênero é aeróbico e heterotrófico que pode ocorrer tanto em habitats terrestres quanto marinhos. Podem crescer em condições limitantes de nitrogênio e carbono, o que lhes permite sobreviver até por longos períodos quando existe esgotamento de nutrientes. Além disso, a expressão de carotenoides protege às células da irradiação UV (GLÖCKNER et al., 2003)

O filo Verrucomicrobia esteve representado significativamente pelo gênero *Verrucomicrobium* que apresentou frequência relativa similar nas rizosferas do que no *bulk soil* (~0,14%), sendo maior na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (~0,15%). Esse gênero está conformado por bactérias com múltiplas prostecas (extensões ou apêndices) que ajudam na fixação das células às superfícies. *Verrucomicrobium spinosum* é a única espécie do gênero. Tem sido isolado de ambientes aquáticos eutróficos (SCHLESNER et al., 2006; YOON, 2011).

Outro gênero de Verrucomicrobia foi *Opitutus* o qual também foi mais abundante na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,34%). Tem-se reportado a espécie *Opitutus terrae* como uma bactéria anaeróbica obrigatória. A cepa *O. terrae* PB90-1 foi isolada de solo da

cultura de arroz. O metabolismo de *Opitutus* parece ser apropriado para o crescimento neste solo pelos polissacarídeos derivados da planta e pela interação com metanógenos em resposta às pressões parciais do hidrogênio. É capaz de reduzir nitrato para nitritos e cresce em pH 5,5-9,0 a temperaturas entre 10-37ºC (CHIN et al., 2001; PASSEL et al., 2011).

O gênero *Zunongwangia* (Bacteroidetes: Flavobacteria) teve frequências relativas extremamente baixas, sendo superior ligeiramente na rizosfera no *bulk soil* e na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex. São bactérias que possuem versatilidade metabólica e extensas capacidades hidrolíticas para utilizar recursos do ambiente, hidrolisam materiais orgânicos no sedimento, especialmente carboidratos e nitrogênio orgânico proteico como quitina e proteínas além de produzir exopolissacarídeos (EPS) (QIN et al., 2010; SUN et al., 2014).

4.2.2.8 Composição da comunidade de Archaea na rizosfera do feijão

Archaea constitui uma fração importante da biomassa microbiana na Terra; desempenha um papel importante nos ciclos geoquímicos globais e membros deste domínio influenciam nas emissões de gases de efeito estufa. A parede da membrana celular em Archaea é única e pode estar relacionada às condições extremas de temperatura, salinidade e pressão onde elas habitam. (OFFRE et al., 2013). O domínio possui cinco filos: Euryarchaeota (metanogênicas, halofílicas e termófilas) (TIMONEN; BOMBERG, 2009), Crenarchaeota (termófilas ligadas ao ciclo do enxofre) (SCHLEPER et al., 1997; PRESTON et al., 1996; HALLAM et al., 2006), Thaumarchaeota (oxidadoras de amônia, mesofílicas, abundantes em ambientes terrestres) (PESTER et al., 2011), Korarchaeota (não possui representantes cultiváveis) e Nanoarchaeota (organismos muito pequenos de 400 nm, hipertermófilas) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os filos Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota e arqueias não classificadas mostraram maior frequência relativa tanto no *bulk soil* quanto nas rizosferas de feijão (Figura 12). Porém, nenhum dos filos de Archaea apresentou diferença significativa na frequência relativa entre as amostras de *bulk soil* e rizosferas de feijão ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis).

Os filos Crenarchaeota e Euryarchaeota foram detectados como mais abundantes em amostras de TPA do sítio Hatahara por Cannavan (2011), porém a proporção de Crenarchaeota (88,8%) foi muito superior à encontrada aqui. Isso provavelmente é devido a que por muito tempo houve a confusão entre a definição dos filos Crenarchaeota e Thaumarcheaota; recentemente o filo Thaumarcheaota foi separado de Crenarchaeota (GUPTA; SHAMI, 2011; PESTER et al., 2011).

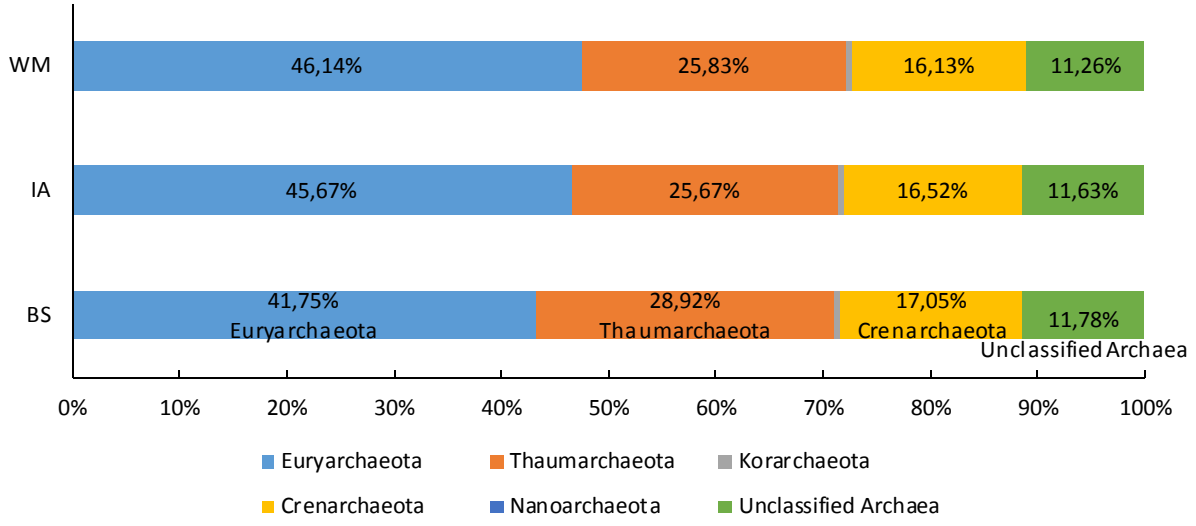

Figura 12 – Frequência relativa média (n = 5) dos filos de Archaea no *bulk soil* (BS) e nas rizosferas de feijão tipo cultivado IAC Alvorada e feijão selvagem Wild Mex (WM)

O fato de não terem sido detectadas diferenças significativas entre os filos de Archaea no *bulk soil* e nas rizosferas, é provável porque a maioria das arqueias são generalistas, sua ecologia não depende da concentração de nitrogênio ou do estado da matéria orgânica, nem da presença de raízes vivas ou da abundante presença de outros organismos (DONG et al., 2015).

O filo Euryarchaeota incrementou a frequência relativa nas rizosferas de feijão, o contrário ocorreu com Thaumarchaeota, Crenarchaeota e arqueias não classificadas, que diminuíram nas rizosferas quando comparados com o *bulk soil*.

Quanto aos gêneros de Archaea, foram oito gêneros que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre as amostras de *bulk soil* e rizosferas de feijão (Tabela 8).

Tabela 8 – Gêneros de Archaea significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média (n = 5) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM)

Filo	Classe	Gênero[a]	Valor p	% BS	% IA	% WM
Crenarchaeota	Thermoprotei	U. Desulfurococcaceae	0,0087	0,071	0,128	0,067
Crenarchaeota	Thermoprotei	U. Thermoproteales	0,0445	0,030	0,063	0,024
Euryarchaeota	U. Euryarchaeota	U. Euryarchaeota	0,0124	2,871	3,368	3,800
Euryarchaeota	Halobacteria	*Natrialba*	0,0263	0,649	0,748	0,882
Euryarchaeota	U. Euryarchaeota	*Ca.* Micrarchaeum	0,0464	0,169	0,320	0,248
Euryarchaeota	Methanomicrobia	*Methanoregula*	0,0498	0,812	0,715	0,982
Thaumarchaeota	U. Thaumarchaeota	U. Thaumarchaeota	0,0178	4,955	4,220	4,239
Thaumarchaeota	U. Thaumarchaeota	*Nitrosopumilus*	0,0263	5,539	4,448	4,410

[a] U.: Unclassified (não classificado); *Ca.*: *Candidatus*

Dois gêneros pertenceram ao filo Crenarchaeota (um gênero não classificado da família Desulfurococcaceae e outro não classificado da ordem Thermoproteales), dois ao filo Thaumarchaeota (não classificado do filo Thaumarchaeota e *Nitrosopumilus*) e quatro corresponderam ao filo Euryarchaeota (não classificado do Euryarchaeota, *Natrialba*, *Candidatus* Micrarchaeum e *Methanoregula*).

4.2.2.9 Crenarchaeota na rizosfera de feijão

O filo Crenarchaeota compreende a única classe de arqueias Thermoprotei a qual contém três ordens: Thermoproteales, Desulforococcales e Sulfolobales. Têm sido identificados marcadores moleculares para distinguir membros entre Crenarchaeota e Thaumarchaeota em diferentes ambientes. É preciso de mais estudos para o descobrimento de novas características bioquímicas e fisiológicas que são únicas desse grupo de arqueias e que poderiam ser responsáveis pela sua adaptação a ambientes específicos (GUPTA; SHAMI, 2011).

Ambos os gêneros não classificados do filo Crenarchaeota foram mais abundantes na rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada. Foi determinado em tomate que Crenarchaeota têm maior frequência nas raízes jovens de uma semana de idade e colonizam as regiões mais velhas dessas raízes (SIMON et al., 2000). Sliwinski e Goodman (2004) encontraram que a diversidade de Crenarchaeota na rizosfera é distinta do *bulk soil* e que há incremento da riqueza na rizosfera quando comparada com a riqueza do *bulk soil* e parece que as associações de Crenarchaeota com as plantas em ambientes nativos não são resultado das interações entre plantas e micro-organismos, mas são mediadas pelas condições ambientais, pelo que se acredita que Crenarchaeota não depende da linhagem da planta para ocorrer. Por outro lado, foi reportado que Crenarchaeota é atraído pelo fungo micorrízico *Paxillus involutus* em espécies arbóreas (BOMBERG; TIMONEN, 2008).

4.2.2.10 Euryarchaeota na rizosfera de feijão

O filo Euryarchaeota é um filo ubíquo que contém espécies produtoras de metano, porém também pode conter oxidadoras de metano, fixadoras de nitrogênio e redutoras de nitrato. O conhecimento sobre a diversidade de Euryarchaeota em solos é escasso (POPLAWSKI et al., 2007; TIMONEN; BOMBERG, 2009). Têm sido encontradas espécies desse filo em solos de pastagem, cevada e arroz (POPLAWSKI et al., 2007; HU et al., 2013). O pH do solo parece ser o fator predominante na formação das comunidades terrestres de Euryarchaeota (HU et al., 2013). Nicol et al. (2003) determinaram que as populações de metanogênicos se incrementaram com mudança da cobertura vegetal e aplicação de nitrogênio

inorgânico nos solos de pastagem. Em solos alagados da Amazônia foram encontrados membros do filo Euryarchaeota pertencentes as classes Methanococci e Methanomicrobia, ambos os grupos metanógenos (PAZINATO et al., 2010). O incremento de Euryarchaeota nas rizosferas de feijão pode ser devido à fixação de nitrogênio, pois o H_2 que é usado um agente redutor para converter o CO_2 a metano durante a respiração anaeróbica por metanógenos, é um subproduto da fixação de N_2 pelas leguminosas (NELSON et al., 2010).

Os gêneros do filo Euryarchaeota mostraram maiores abundâncias nas rizosferas do que no *bulk soil*. Na rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex foram encontradas as maiores abundâncias de três dos quatro gêneros significativamente diferentes. *Candidatus* Micrarchaeum foi o gênero mais abundante encontrado na rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada (0,32%).

O gênero *Natrialba* (Euryarchaeota) registrou a maior frequência relativa na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,88%) em comparação com o *bulk soil* (0,65%) e a rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada (0,75%). Membros do gênero *Natrialba* têm mostrado capacidade para produzir xilanase, amilase, caseinase, gelatinase e celulase, são capazes de crescer sob condições haloalcalifílicas (15-20% de sal e pH 9,5) (PATIL; BAJEKAL, 2013).

O gênero *Methanoregula* (Euryarchaeota) apresentou a maior frequência relativa na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,98%). *Methanoregula* compreende um grupo de metanogênicos fortemente acidófilos (pH 4,0-5), são encontrados principalmente em ambientes alagados como lamas e pântanos (JUOTTONEN et al., 2008; BRÄUER et al., 2011). Por outro lado, o gênero *Candidatus* Micrarchaeum (Euryarchaeota) teve maior frequência relativa na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (0,32%). Esse gênero codifica genes capazes da beta-oxidação de ácidos orgânicos e pode ter respiração aeróbica (HEDLUND et al., 2014).

4.2.2.11 Thaumarcheaota na rizosfera de feijão

Arqueias do filo Thaumarcheaota inicialmente foram classificadas como Crenarchaeota mesofílicas. Compreende arqueias oxidadoras de amônia (AOA) que são encontradas numa ampla gama de pH, temperatura, salinidade e concentrações de fosfato. A oxidação de amônia recentemente foi expandida para Archaea e em ambientes terrestres pouco se conhece sobre isso (PRATSCHER et al., 2011). Algumas AOA são adaptadas a ambientes sulfídicos (PESTER et al., 2011). São capazes de usar a oxidação de amônia como fonte de energia nos ambientes oligotróficos e fixar carbono pela via 3-hidroxipropionato/4-hidroxibutrirato (KIM et al., 2011; PRATSCHER et al., 2011). Em alguns solos a abundância e diversidade deste grupo pode abranger até 10% do total da comunidade de procariotos e em

outros menos de 0,5% (CHELIUS; TRIPLETT, 2001). Tem-se encontrado maiores abundâncias em solos adubados organicamente do que naqueles adubados quimicamente (TAYLOR et al., 2010; XU et al., 2012). Estudar a abundância e composição das arqueias oxidadoras de amônia e o entendimento de como as propriedades do solo influenciam este grupo, tem implicações ao longo prazo para agricultura sustentável porque poderiam habitar nos nichos onde as bactérias oxidadoras de amônia não são capazes de sobreviver (CHEN et al., 2008; TAYLOR et al., 2010; QUADROS et al., 2012).

Os gêneros do filo Thaumarchaeota apresentaram maior abundância no *bulk soil* (~5,25%) do que nas rizosferas (4,33%). Esses micro-organismos são conhecidos por ser oxidadores de amônia (AOA). Os resultados obtidos, sugerem que no *bulk soil*, esses micro-organismos podem ter maiores populações por ser oxidadores de amônia e fixar carbono em ambientes oligotróficos (TAYLOR et al., 2010; KIM et al., 2011; XIA et al., 2011; AMIN et al., 2013). Os valores da frequência relativa do gênero *Nitrosopumilus* nas rizosferas pode ser justificado porque espécies como *Nitrosopumilus maritimus* podem também sobreviver em ambientes como a rizosfera onde existe alta disponibilidade de nutrientes (SCHLEPER, 2010; NAKAGAWA; STAHL, 2013; CHEN et al., 2008).

4.2.2.12 Composição da comunidade de Fungi na rizosfera do feijão

Os fungos podem ser unicelulares e/ou filamentosos. Os unicelulares são as leveduras com diâmetro das células entre 1-6 µm. Os fungos filamentosos consistem em hifas que se ramificam em várias direções coletivamente. Chytridiomycota podem ser unicelulares ou formar cadeias de células com rizoides para apoio ou absorção. Zygomycota têm geralmente micélios não septados, mas podem ocorrer septos em alguns grupos. Glomeromycota possuem hifas coenocíticas a esparsamente septadas e produzem esporos com parede celular quitinosa e rígida, são conhecidos como fungos arbusculares ou vesículo-arbusculares que formam simbiose com plantas. Ascomycota são geralmente de micélio septado, mas podem ocorrer formas unicelulares (leveduras). Basidiomycota têm um septo complexo com doliporos e algumas vezes com grampos de conexão; algumas espécies crescem como leveduras (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Geralmente os fungos são saprófitos, o micélio ocupa um grande volume no solo e produz uma ampla variedade de enzimas que atuam sobre a matéria orgânica e compostos minerais para liberar os nutrientes e energia que o fungo precisa para crescer (AISLABIE; DESLIPPE, 2013).

Em Fungi, os filos Basidiomycota, Glomeromycota e fungos não classificados aumentaram a frequência relativa nas rizosferas quando comparadas com o *bulk soil*.

Contrariamente, o filo Ascomycota teve menor frequência relativa nas rizosferas do que no *bulk soil*, como se observa na Figura 13.

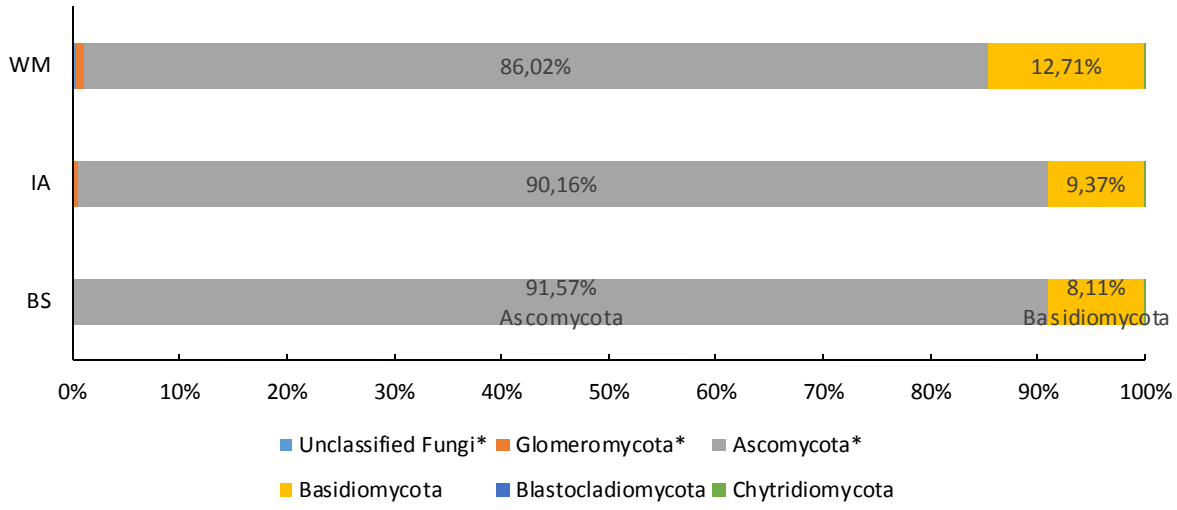

Figura 13 – Frequência relativa média (n = 5) dos filos da subdivisão Fungi no *bulk soil* (BS) e nas rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada e feijão selvagem Wild Mex (WM) (* indica diferença estatística de acordo ao teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$)

Os filos Glomeromycota, Ascomycota e o grupo de fungos não classificados, apresentaram diferença estatística significativa entre o *bulk soil* e as rizosferas, segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), como se mostra na Tabela 9.

É reportado que os filos Ascomycota (ordem Hypocreales) e Glomeromycota (*Glomus* spp.) podem responder rapidamente aos rizodepósitos (PHILIPPOT et al., 2013). Isso sugere que o genótipo selvagem Wild Mex é capaz de secretar exsudatos que contribuem à colonização por fungos micorrízicos, ao contrário do genótipo cultivado IAC Alvorada cujos exsudatos poderiam selecionar ascomicetos, alguns dos quais, como espécies patógenas de *Fusarium*, podem ter impactos negativos no desenvolvimento da planta.

Tabela 9 – Filos da subdivisão Fungi significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média (n = 5) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM)

Filo	Valor p	% BS	% IA	% WM
Ascomycota	0,030	91,57	90,16	86,02
Glomeromycota	0,008	0,17	0,32	0,88
Unclassified Fungi	0,023	0,07	0,13	0,33

Por outro lado, 11 gêneros de fungos mostraram diferença significativa na frequência relativa ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre o *bulk soil* e as rizosferas. Eles correspondem aos filos, Ascomycota, Basidiomycota e Glomeromycota e a um grupo de não classificados, como se observa na Tabela 10.

No *bulk soil* foram encontrados cinco gêneros mais abundantes, todos pertencentes ao filo Ascomycota. Apenas um gênero não classificado de Ascomycota foi mais abundante na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada. Os gêneros dos filos Basidiomycota e Glomeromycota e a fungos não classificados, apresentaram frequências relativas significativamente maiores na rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex do que na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada e *bulk soil*.

Tabela 10 – Gêneros de Fungi significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média ($n = 5$) nas amostras de *bulk soil* (% BS) e rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM)

Filo	Classe	Gênero[a]	Valor *p*	% BS	% IA	% WM
Ascomycota	Sordariomycetes	*Sordaria*	0,0077	2,761	1,004	1,762
Ascomycota	Eurotiomycetes	U. Trichocomaceae	0,0098	4,640	3,883	2,615
Ascomycota	Sordariomycetes	U. Nectriaceae	0,0263	0,313	1,555	1,089
Ascomycota	Dothideomycetes	*Cochliobolus*	0,0314	0,083	0,000	0,000
Ascomycota	Pneumocystidomycetes	*Pneumocystis*	0,0316	0,172	0,000	0,014
Ascomycota	Dothideomycetes	*Pyrenophora*	0,0324	1,631	1,079	1,474
Basidiomycota	U. Basidiomycota	*Hemileia*	0,0037	0,000	1,361	4,261
Basidiomycota	U. Basidiomycota	U. Basidiomycota	0,0081	0,585	0,769	1,298
Glomeromycota	Glomeromycetes	U. Glomeromycetes	0,0318	0,000	0,000	0,052
Glomeromycota	Glomeromycetes	*Glomus*	0,0463	0,173	0,250	0,604
U. Fungi	U. Fungi	U. Fungi	0,0234	0,073	0,132	0,331

[a] U.: Unclassified (não classificado).

4.2.2.13 Ocorrência de Ascomycota e Basidiomycota na rizosfera do feijão

O filo Ascomycota foi mais abundante no *bulk soil* (91,57%) do que nas rizosferas. Comparando entre as rizosferas, este filo apresentou a maior frequência relativa na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (90,16%). O filo Ascomycota é o maior e mais diverso dos filos de Fungi, compreende gêneros colonizadores do solo bem conhecidos como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Algumas espécies como *Tuber* spp. formam ectomicorrizas com árvores (FINLAY, 2007). Estudos de Liu et al. (2015) e Vujanovic et al. (2007) também obtiveram que o filo Ascomycota dominou sobre Basidiomycota e outros filos na rizosfera de espécies arbóreas. A maior diversidade e maior número de membros de Ascomycota foi encontrado em sistemas com manejo orgânico sob rotação de culturas trigo-batata do que em

pastagem e solo com aração (VIEBAHN et al., 2005). Em outro estudo, foi encontrado que na rizosfera da cana-de-açúcar o incremento da dosagem de adubo nitrogenado tem impacto negativo no ciclo do carbono no solo e promove fungos com características patogênicas (PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2015).

O gênero não classificado da família Trichocomaceae (Ascomycota) apresentou a maior frequência relativa entre os gêneros de fungos significativamente diferentes no *bulk soil* (4,64%), na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (3,88%) e rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (2,62%). Fungos da família Trichocomaceae: *Penicillium, Aspergillus, Paecilomyces* e *Trichoderma,* foram encontrados em solo e serrapilheira de floresta amazônica com diferentes graus de antropização. Nas áreas mais impactadas de solo e serrapilheira houve o maior número de UFC, *Penicillium* foi o gênero mais representativo (FRAGA; PEREIRA, 2012). Encontrou-se uma alta diversidade de *Penicillium* em solos da Caatinga e da Mata Atlântica no Brasil (CRUZ et al., 2013). As espécies de Trichocomaceae são predominantemente saprófitos e capazes de crescer em variáveis condições ambientais como umidade e temperatura, várias espécies produzem metabólitos como as micotoxinas e antibióticos e outras produzem ácidos orgânicos e diversas enzimas degradadoras de uma ampla variedade de moléculas e contribuem na formação transitória de agregados no solo quando existe um ativo crescimento (HOUBRAKEN; SAMSON, 2011; DAYNES et al., 2012).

Outro gênero mais abundante de Ascomycota, foi o gênero *Sordaria,* que apresentou maior frequência relativa no *bulk soil* (2,76%) do que nas rizosferas. Entre as rizosferas, a rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex apresentou a maior frequência relativa (1,76%). Tem-se reportado que a espécie *Sordaria macrospora* tem como habitat natural o esterco de herbívoros (NOWROUSIAN et al., 2010), também foi encontrada em solos de soja no Brasil participando na decomposição de material orgânico (CASTRO et al., 2008; SOUZA et al., 2013); por outro lado, foi encontrado que tem potencial biodegradador do herbicida linuron (BORDJIBA et al., 2001).

Outro ascomiceto foi o gênero *Pyrenophora* que teve uma proporção similar do que *Sordaria;* foi mais abundante no *bulk soil* (1,63%) e na rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex (1,47%). Este gênero alberga os agentes causais de doenças nas gramíneas como a necrose bronzeada ou a clorose extensa no trigo *Pyrenophora tritici-repentis* (OROLAZA et al., 1995; MORENO et al., 2012) e a mancha-reticular da cevada *Pyrenophora teres* f. *teres* (BROWN et al., 1993; JALLI, 2011). *Pyrenophora* é capaz de sobreviver no restolho sobre a superfície do solo pelo menos durante dois anos. Quando o restolho é enterrado a frequência do fungo pode diminuir consideravelmente em oito meses (SUMMERELL; BURGESS, 1989).

Um gênero de Ascomycota não classificado da família Nectriaceae, foi mais abundante na rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada (1,55%), membros dessa família podem ser encontrados comumente nos trópicos sobre resíduos vegetais na serapilheira e outros substratos lenhosos (ROSSMAN et al., 2013; DECOCK et al., 2006).

O gênero *Hemileia* (Basidiomycota) é relacionado quase exclusivamente à espécie *H. vastatrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro, uma das doenças de maior importância econômica desse cultivo no mundo. A frequência relativa de *Hemileia* incrementou-se assombrosamente quando se compara as rizosferas e o *bulk soil*, especialmente na rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex (4,26%). Até agora, não há estudos que tenham reportado a associação de *Hemileia* com raízes das plantas. Porém, é sabido que *H. vastatrix* pode sobreviver e se reproduzir muito bem através de urediniósporos sós e não precisa de um hospedeiro alternativo. Na estação seca, os urediniósporos podem sobreviver cerca de seis semanas sobre folhas no chão (ANERSON, 2000). A germinação do urediniósporo bem como a formação do haustório precisam obrigatoriamente de água livre, não é suficiente a alta umidade para induzir a germinação e se a umidade for baixa logo da germinação a infecção é inibida (AVELINO et al., 2004).

Na rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex também apareceu um gênero não classificado de Basidiomycota com mais frequência relativa (1,30%) em comparação com o *bulk soil* e a rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada (Tabela 10). Tem sido encontrado que Basidiomycota poder ser abundante em solos agrícolas (LYNCH e THORN, 2006; FRACETTO et al., 2013) e está relacionado com a decomposição de materiais lignificados (KURAMAE et al., 2013), este filo contém espécies que formam ectomicorrizas e cogumelos, assim como fungos patógenos como as ferrugens e carvões que são de importância econômica na agricultura (HOORMAN, 2011).

A rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex foi capaz de albergar gêneros de patógenos como *Pyrenophora* e *Hemileia*. Por outro lado, observou-se em ambas as rizosferas a diminuição da frequência relativa de *Cochilobolus*, que tem espécies responsáveis pela mancha marrom do milho e da cana-de-açúcar, isso sugere que os exsudatos radiculares permitem a proliferação e supressão de patógenos foliares no solo. Essa particularidade pode ser considerada no campo da Fitopatologia sobre os hospedeiros alternos dos patógenos para o seu controle ou para a rotação de cultivos.

4.2.2.14 Ocorrência de Glomeromycota na rizosfera do feijão

O filo Glomeromycota apresentou a maior frequência relativa na rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex (0,88%) em comparação com a rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada

(0,32%) e *bulk soil* (0,17%), isso indica que o genótipo selvagem de feijão é capaz de recrutar maior quantidade de fungos micorrízicos do que o genótipo cultivado. Glomeromycota é um filo de Fungi que compreende umas 200 espécies e é reconhecido pela simbiose mutualística de micorrizas arbusculares formada entre plantas e membros deste filo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; REDECKER et al., 2013). A maior vantagem dessa simbiose é o fornecimento de fósforo que o fungo passa diretamente à planta. As práticas agronômicas poderiam diminuir o inóculo no solo e a subsequente colonização como resultado do uso frequente de adubos fosfatados e da aração na preparação dos solos (SMITH et al., 2011). Foi demonstrado que os genótipos de plantas são um determinante para a montagem das comunidades de Glomeromycota e que altas concentrações de fósforo no solo reduzem a diversidade de fungos micorrízicos (GOSLING et al., 2013; SANGABRIEL-CONDE et al., 2014). Em milho, Glomeromycota apresentou os mais altos valores de colonização micorrízica (1-64%) seguido da soja (1-50%) e *Viola* (0-27%). (GOSLING et al., 2013).

O gênero *Glomus* incrementou notavelmente a frequência relativa (0,60%) na rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex em comparação com a rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada (0,25%) e o *bulk soil* (0,17%), como se observa na Figura 14.

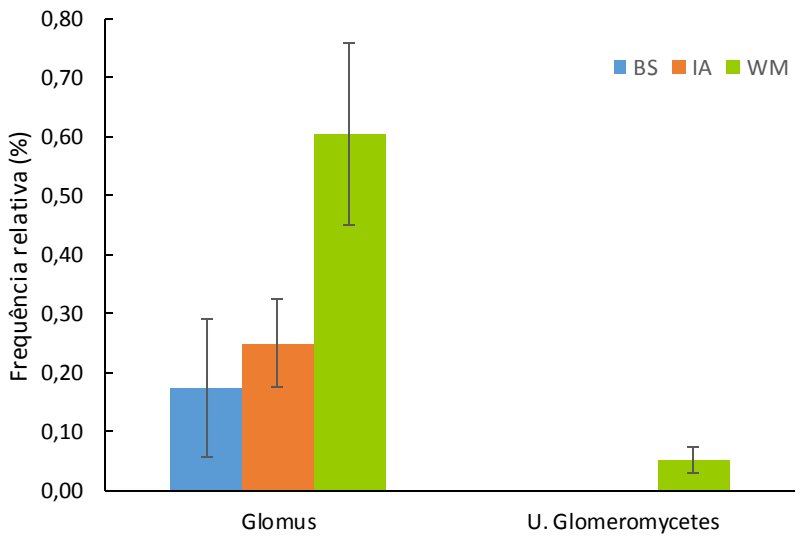

Figura 14 – Frequência relativa média (n = 5) dos gêneros de Glomeromycota significativamente diferentes (p < 0,05, teste de Kruskal-Wallis) entre o *bulk soil* (BS) e as rizosferas de feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e feijão selvagem Wild Mex (WM)

Esses resultados concordam com Hacisalihoglu et al. (2005), os quais mostraram que a resposta à micorrização é variável entre genótipos de feijão. Trabalhos em feijão indicaram que o rendimento foi significativamente superior nas plantas micorrizadas por *Glomus* spp. e *Gigaspora* spp. e mobilizaram mais nitrogênio e fósforo quando comparadas com plantas sem

micorrização, além de diminuir a severidade da podridão radicular por *Fusarium solani* (HASSAN et al., 1997; HACISALIHOGLU et al., 2005; AL-ASKAR; RASHAD, 2010).

Tem sido demonstrado que há uma forte interação entre o filo bacteriano Firmicutes e o filo fúngico Glomeromycota. Por exemplo, a interação entre *Brevibacillus brevis* e *Glomus mosseae* em trevo aumentou o crescimento da raiz, produção de nódulos e desenvolvimento da micorrização além de diminuir as concentrações de Cd, Cr, Mn, Cu, Mo, Fe e Ni no tecido vegetal (VIVAS et al., 2005). A inoculação com *Bacillus pumillus* e *Glomus deserticola* nas plantas de alfafa produziram maior biomassa e raízes mais longas (MEDINA et al. 2003). Em trigo, a inoculaçãocom *Paenibacillus polymyxa* e *Glomus mosseae*, resultou na estimulação da micorrização e absorção de fósforo pela planta sob condições limitantes de fósforo (ARTHURSON et al., 2011). Os antibióticos e fitohormônios produzidos pelas bactérias estimularam o desenvolvimento vegetal a través da supressão de patógenos e promoção alongamento e divisão celular em soja e sorgo (McSPADDEN, 2004; SELIM et al., 2005).

Também foi descoberto que *Glomus* pode interagir com *Azospirillum*. A inoculação misturada de *Azospirillum* e *Glomus intraradices* em sorgo teve uma interação sinérgica que resultou no incremento significativo do crescimento da planta e conteúdo de N, P, Zn, Cu e Fe. Em trigo, a dupla inoculação entre *Azospirillum brasilense* e *Glomus* sp. incrementaram o peso fresco e seco da planta (BASHAN; HOLGUIN, 1996). Da mesma forma, a inoculação de plantas de feijão com *Rhizobium leguminosarum*, incrementou a colonização por fungos micorrízicos (HASSAN et al., 1997), bem como em plantas de trevo a micorrização melhorou quando foram inoculadas com *Glomus mosseae* e actinobactérias (FRANCO-CORREA et al., 2010; GOPALAKRISHNAN et al., 2014).

4.2.3 Busca dirigida das bactérias antagonistas de *R. solani* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nos metagenomas de *bulk soil* e rizosferas

A partir do sequenciamento parcial do gene 16*S* rRNA e comparação das sequências com o banco de dados *EzTaxon* (KIM et al., 2012), foram identificados oito gêneros bacterianos antagonistas de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* que foram isolados das rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada e do feijão selvagem Wild Mex (Tabela 3 e Figura 15).

Os gêneros identificados foram: *Achromobacter, Alcaligenes, Brevibacillus, Kitasatospora, Paenibacillus, Pseudomonas, Stenotrophomonas* e *Streptomyces*. Desses gêneros, encontrou-se apenas que as frequências relativas dos gêneros: *Paenibacillus* (p = 0,027), *Brevibacillus* (p = 7,67e-3) e *Achromobacter* (p = 9,00e-3) mostraram diferença

significativa ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) na frequência relativa entre as amostras de *bulk soil* e rizosferas (Figura 15).

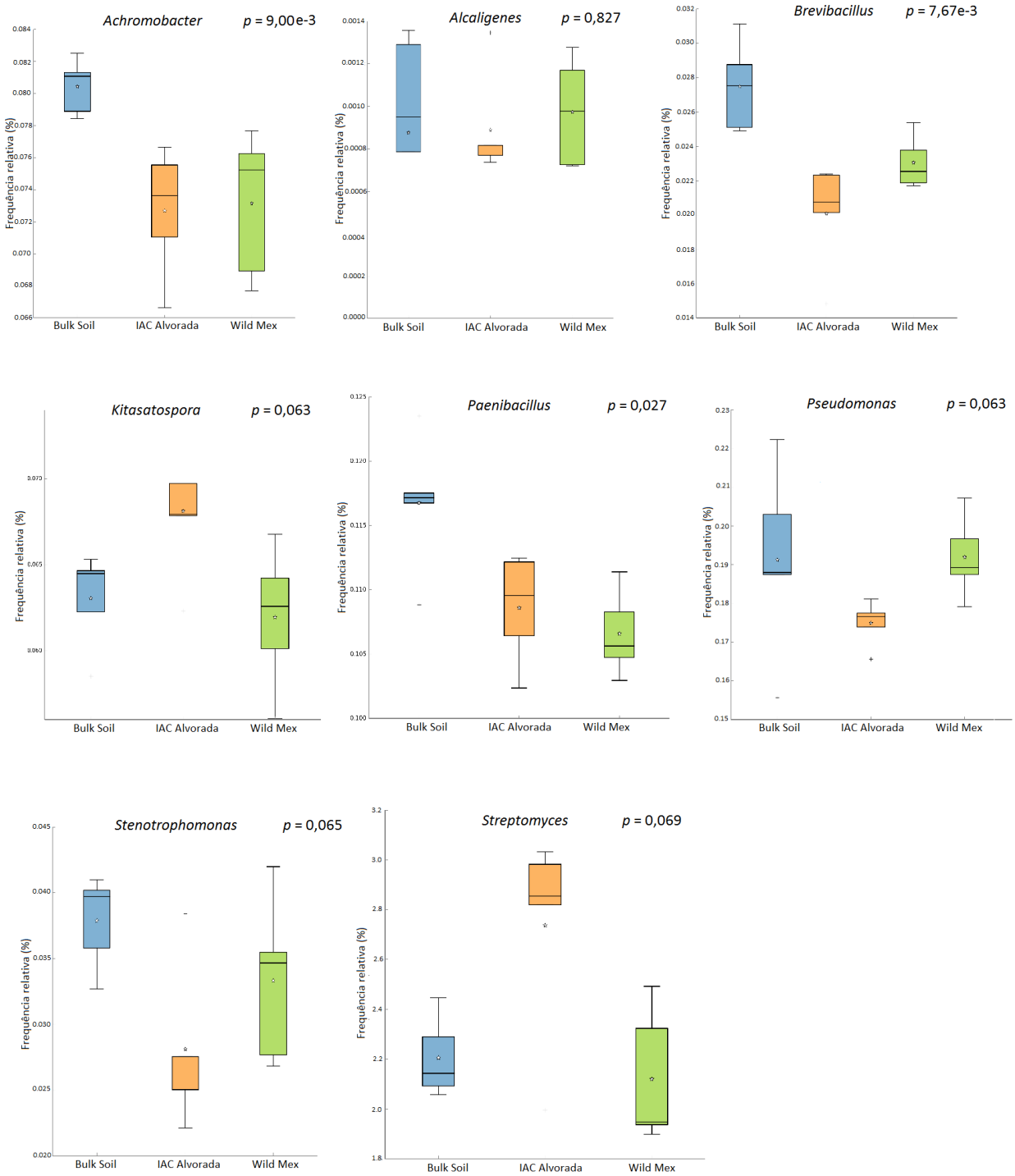

Figura 15 – Diagramas de box-plot da frequência relativa e valor *p* (teste de Kruskal-Wallis) dos gêneros correspondentes aos isolados bacterianos antagonistas de fungos patógenos do feijão encontrados nos dados metagenômicos de *bulk soil* (cor azul), rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada (cor laranja) e rizosfera de feijão selvagem Wild Mex (cor verde)

Foi encontrado que a diferença entre as frequências relativas das Actinobacteria, *Streptomyces* e *Kitasatospora* foi mais acentuada, essas bactérias foram mais abundantes na rizosfera do feijão genótipo cultivado IAC Alvorada. Diferenças menores foram encontrados nos gêneros de γ-Proteobacteria, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas,* as quais foram mais abundantes na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex. De modo similar, os gêneros de Firmicutes, *Paenibacillus* e *Brevibacillus,* embora registraram pouca diferença entre a frequência relativa nas rizosferas, foram mais abundantes também na rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex. Por outro lado, a diferença da frequência relativa entre as rizosferas das β-Proteobacteria, *Achromobacter* e *Alcaligenes* foi praticamente nula, apresentando frequências relativas bastante similares na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada quanto comparada com a rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex (Figura 15).

Esses resultados sugerem que o feijão selvagem Wild Mex recrutou maior riqueza de antagonistas (γ-Proteobacteria e Firmicutes) do que o genótipo cultivado IAC Alvorada, o qual recrutou abundantemente actinobactérias (*Streptomyces* e *Kitasatospora*).

As bactérias dos gêneros: *Streptomyces, Paenibacillus, Pseudomonas, Achromobacter* e *Brevibacillus*, apresentaram maior inibição do crescimento dos patógenos testados, esses isolados tiveram a habilidade de inibir o crescimento micelial de três e quatro cepas patógenas (Tabela 3 e Figura 5).

4.2.3.1 Proteobacteria antagonistas contra fungos radiculares do feijão

O gênero *Achromobacter* (β-Proteobacteria) foi mais abundante no *bulk soil* (0,08%) do que nas rizosferas dos dois feijões (~0,07%) (Figura 15). O isolado *Achromobacter animicus* TIS1.4 maat, foi obtido da rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada. Nos testes de antagonismo, esse isolado inibiu o crescimento das duas cepas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (inibição Fo: 41,80% e Fo160: 54,74%) e uma cepa de *R. solani* (Rs: 59,24%) (Tabela 3).

Espécies do gênero *Achromobacter* têm sido isoladas de diferentes fontes, principalmente solo e água e inclusive de amostras clínicas (GOMILA et al. 2014). Este gênero foi encontrado na Amazônia central e nos solos agrícolas na região alta do rio Solimões na Amazônia ocidental (RUIVO et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2012). Várias cepas desse gênero exercem atividade antagonista contra patógenos radiculares (MANGENOT; DIEM, 1979). Minerdi et al. (2008), determinaram que as cepas *Achromobacter* sp. têm capacidade para aderir-se às hifas das formas especiais de *Fusarium oxysporum* e que a bactéria deve interagir com uma *forma specialis* específica para eliminar a virulência e induzir habilidades de biocontrole (MINERDI et al., 2008). A cepa de *Achromobacter xylosoxidans* MM1 diminuiu

a incidência de *Fusarium* no tomateiro por volta de 50% utilizando como mecanismo para o biocontrole a competição por ferro (MORETTI et al., 2008) e Jenana et al. (2009), encontraram outra cepa (E1-8) que teve efeito antagonista *in vitro* de 34% no crescimento do patógeno *Pythium aphanidermatum*.

Além de serem antagonistas, *Achromobacter* foram capazes de nodular o feijão-de-corda e foram eficientes na fixação de nitrogênio (GUIMARÃES et al., 2012). *Achromobacter* também é capaz de reduzir N_2O a N_2 (desnitrificação), solubilizar fosfatos, produzir sideróforos e AIA (McGUIRL et al., 1998; MARQUES et al., 2010; MORETTI et al., 2008; JHA; KUMAR, 2009; QAISRANI et al., 2014).

Várias espécies de *Achromobacter* têm mostrado habilidade para biodegradação e resistência a metais pesados, como *A. marplatensis* que foi capaz de mineralizar altas concentrações de pentaclorofenol (PCP) em efluentes contaminados (GOMILA et al. 2010). *A. xylosoxidans,* isolado de solos contaminados de zonas industriais do estado do Qatar, degradou os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH): naftaleno, fenantreno e antraceno (AL-THANI et al., 2009). A cepa de *Achromobacter* sp. AO22 estimulou o crescimento das raízes da crotalária (*Crotalaria juncea*) e observou-se baixos níveis de acumulação de Cd (50 ppm de Cd) nos tecidos da planta (STANBROUGH et al., 2013) e Shee et al. (2012) determinaram que essa cepa foi tolerante também a cobre e mercúrio (SHEE et al., 2012).

O gênero *Alcaligenes* (β-Proteobacteria) apresentou uma frequência relativa extremamente baixa. Foi maior na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,00097%) quando comparado com o *bulk soil* (0,00088%) e com a rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada (0,00089%) (Figura 15). A cepa de *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* TIS1.5 laci, foi obtida da rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada e mostrou antagonismo apenas com uma cepa de *R. solani* (Rs: 48,11%) (Tabela 3).

Alcaligenes é conhecido por conter bactérias que têm atividade antagonista. *Alcaligens faecalis* mostrou atividade antifúngica contra *Aspergillus niger, Paecilomyces variotii, Candida albicans* e *Fusarium oxysporum* e revelou sua habilidade para inibir um amplo espectro bactérias. Produz substâncias inibitórias não proteicas que não foram identificadas, as quais poderiam contribuir contra doenças infecciosas em mamíferos e plantas (ZAHIR et al., 2013). A cepa de *A. faecalis* YMF 3.175 apresentou como constituintes químicos sete compostos isolados de caldo de fermentação da bactéria, três desses compostos (1, 3 e 6) demonstraram ser antibacteriais contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e o composto 7 teve atividade para a formação da armadilha no fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora* (XU et al., 2015).

O gênero *Pseudomonas* (γ-Proteobacteria) registrou uma maior frequência relativa na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex e *bulk soil* (~0,19%) do que na rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada (0,17%) (Figura 15). Esta diferença é comparável com os resultados de Milling et al. (2004), os quais encontraram diferenças na diversidade de *Pseudomonas* entre genótipos de batata, pois na rizosfera do cultivar transgênico SIBU S1 e no cultivar parente SIBU houve menor diversidade de *Pseudomonas* do que no cultivar não transgênico SOLANA.

Dois isolados antagonistas de fungos patógenos do feijão corresponderam ao gênero *Pseudomonas*, ambos os isolados foram obtidos da rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada. O isolado de *Pseudomonas protegens* TIS1.4 cuat, mostrou inibição do crescimento do micélio duma cepa de *R. solani* (Rs: 40,98%) e uma cepa de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fo: 36,51%). O outro isolado *Pseudomonas geniculata* GI2.4 brre apresentou inibição do crescimento micelial de todas as cepas patógenas testadas de *R. solani* (Rs144: 63,42%; Rs: 40,76%) e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fo: 57,41%; Fo160: 50,22%) (Tabela 3).

Pseudomonas estão entre os gêneros que frequentemente são recuperados de solos através de técnicas de cultivo. Este gênero também foi encontrado em TPA por Ruivo et al. (2009). Atualmente, *Pseudomonas* é considerado um dos gêneros dominantes que fazem parte do microbioma do solo que proporciona a capacidade para a supressividade de doenças nas plantas (KYSELKOVÁ et al., 2009; MENDES et al., 2013; GOPAL et al., 2013).

Para muitas *Pseudomonas*, a produção de metabólitos como antibióticos, sideróforos e cianeto de hidrogênio (HCN) é o mecanismo primário de biocontrole (SIDDIQUI, 2006). *Pseudomonas* produzem vários antibióticos como: fenazina-1-ácido carboxílico (Pca), 2,4-diacetil floroglucinol (Phl), oomicina, pioverdina ou pseudobactina (Pvn), pioluteorina (Plt) e pirrolnitrina (Prn ou Pyr) (LAMONT; MARTIN, 2003; BAKKER et al., 2007; PINTON et al., 2007; FERNANDO et al., 2009).

As espécies de *Pseudomonas* fluorescentes que sintetizam dois compostos antimicrobianos, 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) e pioluteroina (Plt), pertencem a espécies novas que são identificadas como *Pseudomonas protegens* (RAMETTE et al., 2011; TAKEUCHI, et al., 2014). Essa espécie produz vários compostos bioativos (antibióticos, sideróforos, HCN, AIA) os quais permitem que esta espécie tenha o espectro mais amplo de biocontrole potencial e mecanismos de promoção do crescimento vegetal dos micro-organismos promotores do crescimento conhecidos (SIDDIQUI, 2006).

Pseudomonas fluorescentes secretam os sideróforos amarelo-esverdeados pioverdina (Pvn), responsáveis pela fluorescência. A capacidade de formar os sideróforos pioverdina tem sido associada com a promoção do crescimento vegetal através do efeito direto sobre a planta

ou através do controle de organismos patógenos. A nitrogenase é um complexo enzimático intensivo de ferro; bactérias fixadoras de nitrogênio como *Rhizobium* spp., podem requerer um sistema intacto de sideróforos para expressar este catalisador exclusivo desses procariotos (NEILANDS, 1995; LAMONT; MARTIN, 2003).

Foi reportado que compostos orgânicos voláteis não identificados, emitidos por *Pseudomonas fluorescens* L13-6-12 e *Burkholderia cepacia* 1S18, permitiram a redução de 30% do crescimento *in vitro* do patógeno *R. solani* (KAI et al., 2007)

P. fluorescens and *P. putida* são as principais candidatas para o controle do murchamento por *Fusarium* spp. (SIDDIQUI, 2006). *Pseudomonas aeuroginosa* e *Bacillus subtilis* mostraram melhor capacidade de controle de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* e a promoção do crescimento vegetal (altura e peso da planta) do grão-de-bico foi significativamente incrementado (KARIMI et al., 2012). *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 suprimiu a formação de ascósporos de *Pyrenophora tritici-repentis* quando resíduos de palha foram inoculados com essa cepa. *P. aeruginosa* PAO1 biocontrolou o nematóide *Caenorhabditis elegans* mediante o envenamento com cianeto (SIDDIQUI, 2006; NAIK et al., 2008).

Tem-se observado o incremento da produção em batata, rabanete, beterraba e milho com a inoculação *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida*. Os efeitos benéficos de *Pseudomonas* são atribuídos à habilidade de promover o crescimento vegetal e a proteção das plantas contra patógenos (WELLER, 1988). Várias espécies de *Pseudomonas* têm sido descritas como efetivas solubilizadoras de fosfatos (KHAN et al., 2009; SHARMA et al., 2013). *P. putida* GR12-2 produz AIA que promoveu o crescimento radicular mediante a estimulação do alongamento ou da divisão celular. *P. putida* GR12-2, bem como outras bactérias, produzem ACC-deaminase, enzima que degrada o ACC que é o precursor direto do etileno, um inibidor do crescimento radicular, assim essas bactérias evitam a produção de níveis inibitórios de etileno para o crescimento radicular. *P. fluorescens* G20-18 produz grandes quantidades de três citoquininas: adenosina isopentenil, ribose trans-zeatina e ribósido diidrozeatina (SIDDIQUI, 2006).

Pseudomonas também têm potencial de biodegradação e biorremediação como uma cepa de *Pseudomonas* sp. que biodegradou 40,5% de polietileno *in vitro* (NANDA; SAHU, 2010) e *P. geniculata* que mostrou degradação *in vitro* de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (naftaleno, fenantreno e antraceno) (ELSAS, 2007; AL-THANI et al., 2009).

O gênero *Stenotrophomonas* (γ-Proteobacteria) foi mais abundante no *bulk soil* (0,04%) do que nas rizosferas onde apresentou frequência relativa similar (~0,03%) (Figura 15). O isolado de *Stenotrophomonas daejeonensis* TIS1.4 prat foi obtido da rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada e apresentou inibição do crescimento do micélio de apenas uma cepa

de *R. solani* (Rs: 51,45%) e uma cepa de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fo160: 52,66%) (Tabela 3). Tem sido encontrado *Stenotrophomonas* entre os gêneros que foram os mais abundantes na rizosfera de trigo (VELÁSQUEZ-SEPÚLVEDA et al., 2012). As espécies *S. maltophilia* e *S. rhizophila* são encontradas com frequência associadas com plantas e podem ser isoladas da rizosfera ou de tecidos internos na raiz e caule. *S. maltophilia* produz várias fímbrias que estão implicados na adesão às superfícies das raízes e na formação de complexos biofilmes. Esses mecanismos nas superfícies das raízes também são importantes na colonização de dispositivos médicos que levam à infecção nos humanos (RYAN et al., 2009).

Stenotrophomonas spp. têm demonstrado biocontrole de oomicetos e patógenos fúngicos e bacterianos em cultivos de mono e dicotiledôneas. *S. maltophilia* tem atividade antifúngica pela produção de maltofilina e xantobactina e compostos orgânicos voláteis. Além disso, têm atividade hidrolítica, produzem diversas proteases, quitinases, glucanases, DNAases, RNAses, lipases e lacases que contribuem no biocontrole (RYAN et al., 2009). *S. maltophilia* e *S. rhizophila* inibiram o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* mais de 90% pelos compostos orgânicos voláteis β-feniletanol e dodecanal (KAI et al., 2007).

Stenotrophomonas spp. podem melhorar crescimento da planta e podem ter aplicações na biorremediação e fitorremediação devido a que várias espécies produzem AIA, fixam nitrogênio e oxidam enxofre elementar (S^0) e em volta fornecem sulfato para as plantas. *Stenotrophomonas* podem capturar sideróforos como o ferricromo que são produzidos por outros micro-organismos, o que contribui a controlar a infecção por fungos pela competição por ferro. *S. maltophilia* pode degradar p-nitrofenol e 4-clorofenol, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos de selênio, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xenobióticos (RYAN et al., 2009; GURJEET et al., 2014).

4.2.3.2 Firmicutes antagonistas contra fungos radiculares do feijão

O gênero *Brevibacillus* foi significativamente diferente entre o *bulk soil* e as rizosferas de feijão. Apresentou maior frequência relativa no *bulk soil* (0,03%) do que nas rizosferas, nas quais a frequência relativa teve valores similares (~0,02%) (Figura 15). A cepa isolada de *Brevibacillus brevis* PW1.4 brru foi obtida da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex e apresentou inibição do crescimento do micélio em todas as cepas dos patógenos testados. A inibição do crescimento foi maior nas cepas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fo: 57,44%; Fo160: 39,83%) do que nas cepas de *R. solani* (Rs144: 48,13%; Rs: 36,09%) (Tabela 3).

Brevibacillus contém também bactérias formadoras de endósporos que lhe permite sobreviver em vários ambientes (SHIDA et al., 1996). Alguns membros de *Brevibacillus* são

importantes para a agricultura por ser agentes biocontroladores, desnitrificantes e biodegradadores (BAEK et al., 2006; TAKEBE et al., 2011; JOSHI et al., 2013). Tem sido reportado que *Brevibacillus brevis* é antagonista de vários fitopatógenos como, *Pectobacterium carotovorum*, *Alternaria solani* e *Rhizoctonia solani* em batata (REINOSO, 2007), *Fusarium graminearum* em espigas de cevada (ZHANG et al., 2005), *F. moniliforme* e *Rhizoctonia solani* em arroz (YANG et al., 2007) e *Botrytis cinerea* (EDWARDS; SEDDON, 2001). A produção de tirocidinas e gramicidina D poderiam ser os responsáveis pelo biocontrole (EDWARDS; SEDDON, 2001; ZHANG et al., 2005). *B. laterosporus* tem potencial bioinseticida (OLIVEIRA et al., 2004) e cepas como *Brevibacillus* sp. B65 produzem AIA (OBERÁ et al., 2012; NÁPOLES et al., 2014). Arya e Sharma (2014), encontraram que *Brevibacillus borstelensis* é capaz de degradar o fungicida carbedazim e Nanda e Sahu (2010) encontraram que *Brevibacillus* teve atividade biodegradadora de polietileno em laboratório de 37,5%.

O gênero *Paenibacillus* foi significativamente mais abundante no *bulk soil* (0,12%) do que nas rizosferas de ambos feijões, onde apresentou valores similares (~0,11%) (Figura 15). O isolado de *Paenibacillus jamilae* TW2.4 mapu foi proveniente da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex e inibiu o crescimento das duas cepas de *R. solani* (Rs144: 62,29%; Rs: 50,65%) e uma cepa de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fo160: 52,81%) (Tabela 3).

Paenibacillus é também formador de endósporos e tem habilidade para produzir diferentes tipos de antibióticos e pode se encontrar em diferentes nichos como solos, raízes, rizosfera de vários cultivos, árvores e sedimentos marinhos. A maioria de espécies pode sobreviver como saprófitos nos solos. Vários pesquisadores encontraram que no *bulk soil* foram observadas maiores abundâncias de *Paenibacillus* do que em raízes e rizosfera (MAVINGUI et al., 1992; SELDIN et al., 1998; McSPADDEN, 2004). A espécie *Paenibacillus polymyxa*, está entre as rizobactérias que têm importância pelo seu potencial em diferentes processos industriais e em agricultura sustentável (SENEVIRATNE et al., 2010; BERGE et al., 2002).

Entre os compostos antifúngicos e antibacterianos produzidos por *Paenibacillus polymyxa* estão: bacteriocina, fusaricidina (A, B, C, D), gatavalina, gavaserina, jolipeptina, LI-F03, LI-F04, LI-F05, LI-F07, LI-F08, polimixina A, B, D, E, M (matacina), S, T, polypeptina A, polixina e saltavalina. Porém, a supressividade é garantida por um processo de interação, por isso é indispensável que a bactéria esteja viva como um pré-requisito para que a supressividade do patógeno continue (MARTIN et al., 2003; SELIM et al., 2005; RAZA et al., 2008). A interação ocorre entre os antibióticos e enzimas, por exemplo, em *P. ehimensis* a beta-1,3-glucanase é o iniciador da hidrólise da parede celular e o processo de degradação do micélio é reforçado pela ação das quitinases (AKTUGANOV et al., 2008).

Essa capacidade de produzir antibióticos e enzimas, permitiu entender o antagonismo de várias espécies de *Paenibacillus* contra diferentes patógenos de diferentes cultivos, como *P. ehimensis* IB-X-b que diminuiu a produção de biomassa de vários fungos patógenos (*Fusarium* spp., *Drechlera sorokiniana* e *Alternaria alternata*) entre 45-75% nos ensaios de co-cultivo com meios líquidos (AKTUGANOV et al., 2008). *P. brasiliensis* PB177 inibiu os fungos patógenos *Fusarium moniliforme* e *Diplodia macrospora* no milho (WEID et al., 2005). Ensaios *in vitro* demonstraram atividade antagonista de *P. kribbensis* cepa T-9 contra *Botrytis, Colletotrichum, Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici, Rhizoctonia solani* (XU et al., 2014). *P. polymyxa* mostrou antagonismo contra vários fitopatógenos (*Aphanomyces cochlioides, Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*) *in vitro* (NIELSEN; SØRENSEN, 1997). E *P. elgii* HOA73 reduziu a eclosão de estádios juvenis e aumentou a mortalidade *in vitro* contra o nematóide *Meloidogyne incognita; in vivo* reduziu o número de galhas nas raízes do tomateiro, número de massas de ovos e a população dos nematóides, além de aumentar o peso fresco da planta (NGUYEN et al., 2013). *Paenibacillus* também pode fixar nitrogênio, como a espécie *P. azotofixans,* encontrada com frequência em solo e rizosferas de pastos, tem maior capacidade para fixar nitrogênio atmosférico do que outras espécies de *Paenibacillus* (ROSADO et al., 1998; SELDIN et al., 1998; RAZA et al., 2008).

4.2.3.3 Actinobacteria antagonistas contra fungos radiculares do feijão

O gênero *Kitasatospora* mostrou a maior frequência relativa na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (0,07%) do que no *bulk soil* e a rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex, os quais apresentaram valores similares (~0,06%) (Figura 15). O isolado de *Kitasatospora azatica* TIS1.4 brat foi obtido da rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada e mostrou atividade antagonista apenas com uma cepa de *R. solani* (Rs144: 57,08%) (Tabela 3).

Vários estudos reportaram *Kitasatospora* isolada de amostras de rizosfera (GROTH et al., 2003; HAESLER et al., 2008; ARUNACHALAM et al., 2013). Foi reportado que um isolado de *Kitasatospora* proveniente da rizosfera da faia europeia (*Fagus sylvatica*), exibiu forte antibiose *in vitro* contra o oomiceto *Phytophthora citricola*. Foi encontrado que produziu um composto idêntico ao antibiótico cicloheximida (HAESLER et al., 2008). Shrivastava et al. (2008) recomenda o uso de técnicas baseadas nas sequências do gene *rpo*β (subunidade beta do gene RNA polimerase) e em microarranjos de diagnóstico microbiana (MDM) para diferenciar espécies entre os gêneros *Streptomyces* e *Kitasatospora*.

Finalmente, o gênero *Streptomyces* foi mais abundante na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (2,74%), seguido do *bulk soil* (2,21%) e da rizosfera do feijão selvagem Wild

Mex (2,12%) (Figura 15). Os três isolados desse gênero foram recuperados da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex. O isolado de *Streptomyces phaeopurpureus* GRWS3.1 refu mostrou inibição do crescimento de uma cepa de *R. solani* (Rs: 34,11%) e uma de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fo160: 39,13%); o isolado *Streptomyces olivoverticillatus* TWS5.4 maci teve um espectro maior de inibição do crescimento micelial de *R. solani* (Rs144: 66,25%; Rs: 52,17%) e de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fo: 56,45%; Fo160: 56,93%). O outro isolado de *Streptomyces ochraceiscleroticus* TWS3.5 ciat, inibiu o crescimento de uma cepa de *R. solani* (Rs144: 82,50) e uma de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fo: 40,8%) (Tabela 3).

Ruivo et al. (2009), encontraram *Streptomyces* em Terra Preta da Amazônia. Este gênero tem sido reportado por conter as bactérias produtoras de um amplo espectro de antibióticos, pelo que são potenciais fontes de compostos bioativos devido à rica produção de metabólitos secundários (QIN et al., 2011; RANA; SALAM, 2014). Aproximadamente 75% dos antibióticos isolados de actinobactérias são produzidos por membros do gênero *Streptomyces*. Além disso, vários membros deste gênero são capazes de produzir fitases, solubilizar de fosfatos, produzir sideróforos, protease, quitinase, endo-celulase e β-glucanase, amilase, AIA, e crescer sobre meio de cultura livre de nitrogênio (fixar nitrogênio). O antibiótico fenzina está relacionado com o antagonismo de patógenos (FERNANDO et al., 2006; FUENTES-RAMIREZ; CABALLERO-MELLADO, 2006; FRANCO-CORREA et al., 2010; ARUNACHALAM et al., 2013; MOHAMED et al., 2015).

Vários estúdios têm mostrado a atividade antagonista de *Streptomyces* spp. contra diversos patógenos de plantas. Quecine et al. (2008), testaram várias cepas de *Streptomyces* que induziram *in vitro* maior inibição do crescimento para os fungos do que para oomicetos; *S. diastatochromogenes* teve alta atividade quitinolítica que esteve relacionada com a alta inibição contra fungos. O estudo de Zhao et al. (2012), demonstrou que *S. bikiniensis* inibiu *in vitro* o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* e em casa de vegetação, teve marcados efeitos de biocontrole de 53,7% de *Fusarium* nas plantas de pepino.

S. mutabilis e *S. cyaneofuscatus* isoladas de plantas nativas mostraram significativas diferenças na redução da doença por *Rhizoctonia solani* (86,6% e 85,3%, respectivamente) em mudas de tomate, além disso incrementaram o peso fresco, comprimento da planta e comprimento da raiz (GOUDJAL et al., 2014). Em casa de vegetação *S. africanus* e *Streptomyces* sp. reduziram 45 e 75% a incidência de *Rhizoctonia bataticola,* agente causal da podridão radicular do grão-de-bico doença e em campo houve uma redução da doença de 4 e 19% (GOPALAKRISHNAN et al., 2011).

As espécies de *S. albovinaceus, S. griseus* e *S. virginiae* inibiram a germinação do basidiósporo de *Moniliophthora perniciosa* agente causal da vassoura-de-bruxa no cacaueiro quando foram cultivadas em meio com deficiência de ferro, o que sugere que a formação de sideróforos como mecanismo antagonista destas actinobactérias (MACAGNAN et al., 2008). Proteases extracelulares inibiram a germinação e adesão de esporos à superfície de poliestireno e formação de apressórios de *Colletotrichum coccodes* (PALANIYANDI et al., 2013). *S. griseus* teve a habilidade de solubilizar roxa fosfórica e estimulou o crescimento aéreo do trigo mais de 30% (HAMDALI et al., 2008). *S. filipinensis* produziu ACC deaminase e AIA *in vitro* e em casa de vegetação reduziu os níveis do ACC tanto em raízes como nos brotos do tomateiro e promoveu o crescimento vegetal (EL-TARABLY, 2008).

4.2.4 Funcionalidade do microbioma da rizosfera de feijão

De acordo à abundância das funções encontradas nos metagenomas analisados, gerou-se um heatmap no MG-RAST que mostrou a disposição das categorias funcionais Nível 1 mais abundantes nas amostras e o correspondente agrupamento das amostras do *bulk soil* e das rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada e do genótipo selvagem Wild Mex. Os subsistemas funcionais mais abundantes do Nível 1 foram: Aminoácidos e Derivados, Subsistemas baseados em agrupamento e Carboidratos, como se observa na Figura 16.

A Análise de Componentes Principais (PCA) das funções anotadas no banco *SEED Subsystems*, indicou uma ordenação diferente das amostras de *bulk soil* e rizosferas de feijão. Enquanto as amostras da rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada apresentaram um padrão de distribuição espacial similar com as amostras de *bulk soil*, as amostras da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex apresentaram um agrupamento distinto e menos disperso (Figura 17). Essa observação sugere que o feijão selvagem Wild Mex e capaz de realizar um recrutamento mais elaborado, selecionando uma comunidade microbiana com funcionalidade diferente da comunidade microbiana presente no *bulk soil* e na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada.

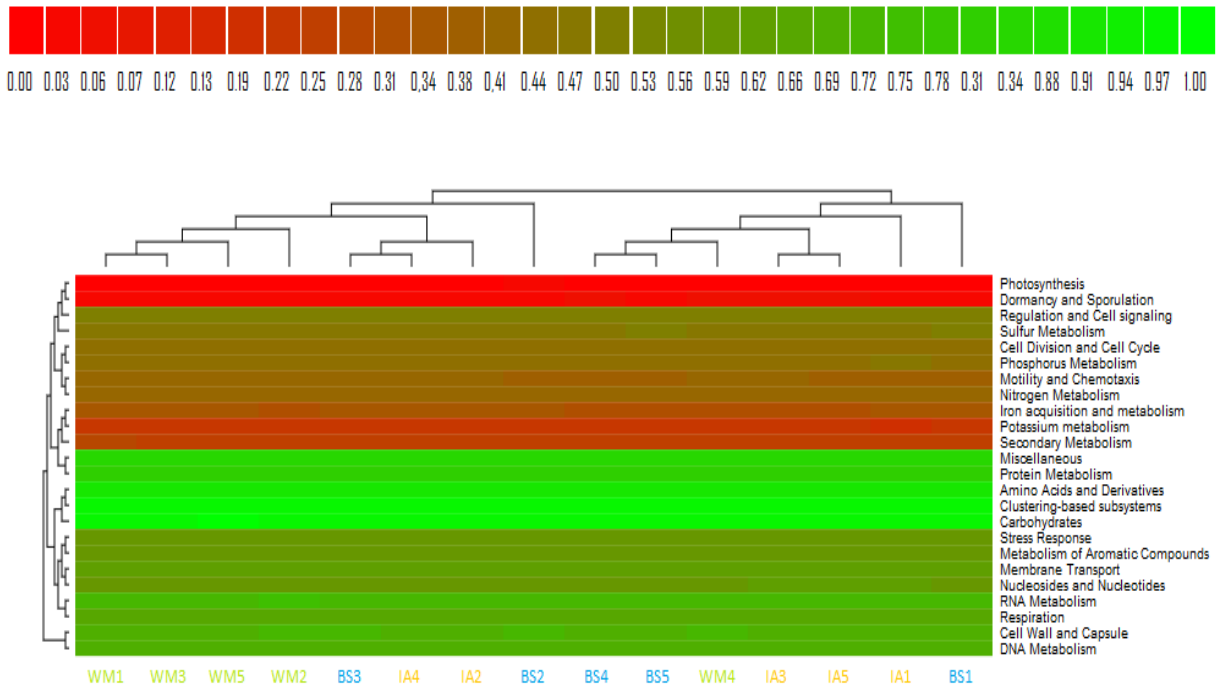

Figura 16 – Análise de agrupamento da classificação funcional usando *heatmap* gerado no MG-RAST segundo o banco de dados *SEED Subsystems* e baseado na abundância de proteínas funcionais no subsistema Nível 1 (BS: *bulk soil;* IA: rizosfera IAC Alvorada; WM: rizosfera Wild Mex)

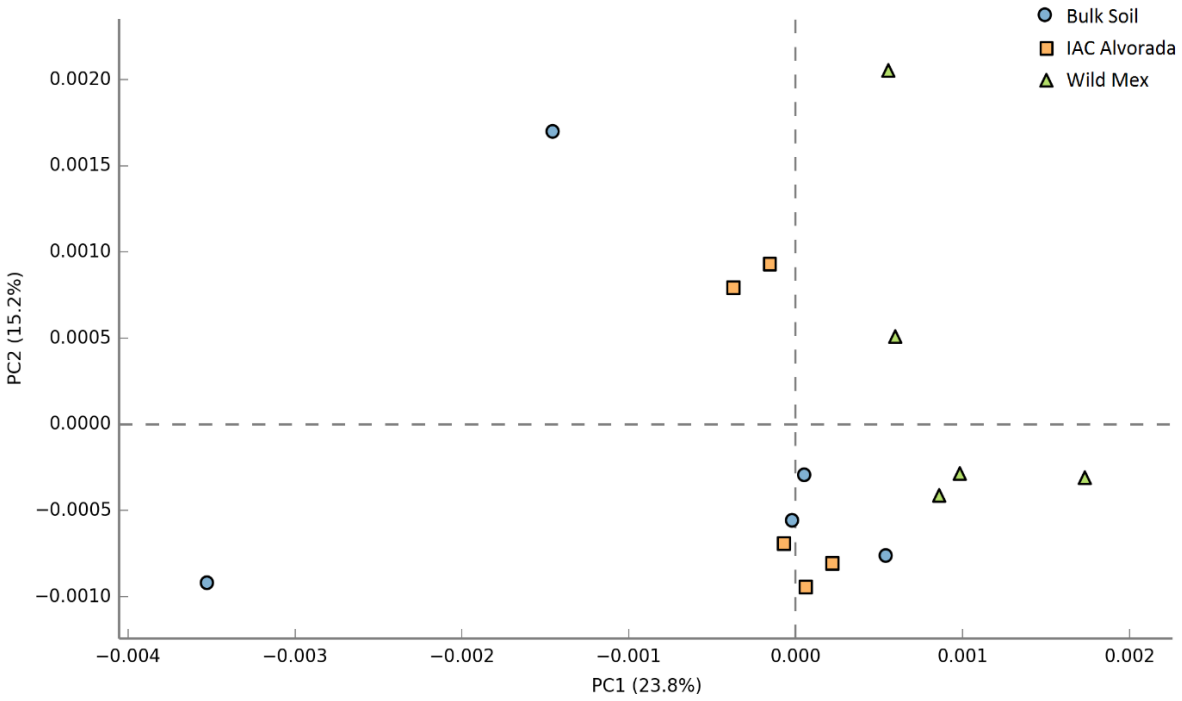

Figura 17 – Análise de Componentes Principais (PCA) das funções anotadas com o banco de dados *SEED Subsystems* nas amostras de *bulk soil*, rizosfera de feijão cultivado IAC Alvorada e feijão selvagem Wild Mex

4.2.5 Busca de genes microbianos relacionados com funções benéficas para as plantas

Entre as categorias de função anotadas no banco de dados *SEED Subsystems* (Level *function*), 517 funções foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) de 9.335 funções anotadas no MG-RAST. Desse grupo foram escolhidas, com base na literatura, 15 funções relacionadas com atividade antibiótica, nutrição e promoção do crescimento vegetal. Na Tabela 11 são mostradas as funções significativamente diferentes entre as amostras de *bulk soil* e das rizosferas de Wild Mex e IAC Alvorada.

A maioria das funções selecionadas foram mais abundantes na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (dez funções) em comparação com a rizosfera de IAC Alvorada (quatro funções) e *bulk soil* (uma função).

Tabela 11 – Funções relacionadas com nutrição, produção de antibióticos e promoção de crescimento vegetal significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) e porcentagem da frequência relativa média ($n = 5$) no *bulk soil* (% BS) e nas rizosferas do feijão cultivado IAC Alvorada (% IA) e do feijão selvagem Wild Mex (% WM)

Função	Valor *p*	% BS	% IA	% WM
Cadeia alfa da nitrogenase (Mo-Fe) (EC 1.18.6.1)	0,03439	0,0005	0,0015	0,0023
Cadeia beta da nitrogenase (Mo-Fe) (EC 1.18.6.1)	0,04550	0,0006	0,0019	0,0033
Proteína NifQ fornecedora de molibdênio na síntese do cofator FeMo-co	0,03783	0,0000	0,0002	0,0007
Proteína associada NifX	0,03438	0,0000	0,0007	0,0003
Glutamato sintase dependente de ferredoxin (EC 1.4.7.1)	0,02399	0,0088	0,0075	0,0118
Proteína Nac regulatória da assimilação do nitrogênio	0,00586	0,0002	0,0008	0,0015
ATPase PhoH induzida pela a inanição de fosfato	0,00919	0,0060	0,0060	0,0076
Regulador de transcrição PhnF	0,04929	0,0009	0,0018	0,0012
Regulador PhoQ	0,03050	0,0086	0,0094	0,0077
Proteína PhnA do operon da utilização de alquilfosfonato	0,01674	0,0003	0,0009	0,0015
Transportador ABC de hidroxamato férrico (TC 3.A.1.14.3), proteína FhuD de ligação do substrato periplasmático	0,03391	0,0001	0,0005	0,0005
Transportador ABC de hidroxamato férrico (TC 3.A.1.14.3), componente FhuB da permeasse	0,03712	0,0000	0,0010	0,0007
Proteína da biosíntese de sideróforos, mono-oxigenase	0,03579	0,0007	0,0022	0,0023
Proteína PvdN da biosíntese de pioverdina, aminotransferase putativa, classe V	0,01240	0,0021	0,0016	0,0009
Indol-3-piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.74)	0,02244	0,0003	0,0017	0,0019

4.2.5.1 Metabolismo do nitrogênio na rizosfera de feijão

Cinco funções relacionadas com o metabolismo do nitrogênio foram mais abundantes na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex e uma na rizosfera de IAC Alvorada. Na rizosfera do Wild Mex essas funções estão vinculadas com a fixação do nitrogênio atmosférico mediada pela síntese da enzima nitrogenase (EC 1.18.6.1).

O complexo da nitrogenase catalisa a redução de vários substratos que incluem o nitrogênio molecular, acetileno, cianeto e azida. A enzima nitrogenase é a responsável pela fixação do nitrogênio molecular e apresenta um alto grau de conservação da estrutura, função e sequência de aminoácidos através de uma ampla gama filogenética. As nitrogenases possuem dois componentes que fornecem a maquinaria bioquímica para a redução do dinitrogênio à amônia (ISRAEL et al., 1974).

O Componente I (também chamado dinitrogenase, ou proteína Fe-Mo) é uma proteína $\alpha 2\beta 2$ tetrâmera e o Componente II (dinitrogenase redutase, ou proteína Fe) é uma proteína homodímera (HERNANDEZ et al., 2008). A biossíntese de ambos os componentes (proteína Mo-Fe e proteína Fe), é um complexo processo que requer o produto de pelo menos 15 genes diferentes (SCHMID et al., 2002; PARRO; MORENO-PAZ, 2003). Tem sido determinado que os dois componentes protéicos por si sós não exibem atividade catalítica (ISRAEL et al., 1974).

A nitrogenase contém também dois grupos raros de metais, um deles é o aglomerado de fósforo [8Fe-7S] que junta as subunidades α e β e o outro é o cofator (FeMo-co), localizado na subunidade alfa (SCHMID et al., 2002), considerado como o sítio da redução do dinitrogênio e cuja biossíntese requer os produtos do operon *nif*NE e de alguns outros genes *nif*. Tem sido proposto que a proteína NifNE poderia servir como um andaime sobre o qual o cofator FeMo-co é construído e logo inserido no Componente I da nitrogenase (TEZCAN et al., 2005).

As proteínas cadeia alfa e cadeia beta da nitrogenase (Mo-Fe) (EC 1.18.6.1), tiveram maior frequência relativa na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,0023% e 0,0033%, respectivamente) do que na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (0,0015% e 0,0019%, respectivamente) e no *bulk soil* (0,0005 e 0,0006%, respectivamente). A cadeia alfa da nitrogenase (Mo-Fe) é codificada do gene *nif*D e a cadeia beta é produto do gene *nif*K. A proteína de Fe (dinitrogenase redutase, componente II) é codificada pelo gene *nif*H. (BRIGLE et al., 1985; MASTERSON et al., 1982). A subunidade alfa poderia desempenhar o papel mais importante na ligação de vários grupos prostéticos (grupos não protéicos formando parte ou combinados com uma proteína), especialmente FeMo-co dentro da proteína MoFe. A escassez de informação da sequência da subunidade beta, faz com que a interpretação da função dessa subunidade seja difícil de esclarecer (BRIGLE et al., 1985).

A proteína NifQ fornece molibdênio na síntese do cofator FeMo-co, essa função também apresentou maior frequência relativa na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,0007%) do que na rizosfera do feijão cultivado (0,0002%) e no *bulk soil*, onde não foi detectada. Esta proteína é codificada pelo gene *nif*Q envolvido provavelmente numa etapa inicial da biossíntese do cofator. A NifQ, e talvez outras proteínas associadas com a fixação de nitrogênio, estão envolvidas no sequestro de molibdênio especificamente para entregá-lo a um sítio da montagem do cofator FeMo-co e poderia também estar envolvida no processo de transformação do molibdênio para o estado de oxidação certo para a formação do cofator FeMo-co (SANTOS et al., 2004). Os terminais C dos radicais cisteína poderiam estar envolvidos na ligação metálica. Pelo menos 11 genes *nif* codificam proteínas envolvidas na biossíntese do cofator FeMo-co. As proteínas NifB, NifEN e NifH poderiam ser responsáveis por todas as transformações bioquímicas do Fe, S, Mo e do radical homocitrato que levam a amadurecer o cofator FeMo-co. As outras proteínas NifU, NifS, NifX, NafY, NifQ e NifV poderiam fornecer substratos fisiológicos e suporte acessório para o grupo catalítico (CURATTI et al., 2007; HERNANDEZ et al., 2008).

Na rizosfera do IAC Alvorada, a proteína associada NifX foi encontrada com maior frequência relativa (0,0007%) do que na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,0003%) e no *bulk soil*, onde não foi detectada. As proteínas NifX codificadas pelo gene *nif*X pertencem a uma família pequena de proteínas de importância fisiológica porque ligam os precursores do cofator FeMo e/ou o próprio cofator FeMo fornecendo, possivelmente, proteção para esses grupos lábeis antes da inserção na apo-dinitrogenase (carente de FeMo-co) (HUANG et al., 1999; HERNANDEZ et al., 2007). Membros da família NifX incluem as proteínas NafX e VnfX (RUBIO et al., 2002). A sequência de aminoácidos NifX parece representar um domínio conservado para uma ligação eficiente de diferentes precursores dos cofatores FeMo ou FeV (PARRO; MORENO-PAZ, 2003; HERNANDEZ et al., 2007).

Na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex, também foi encontrada com maior frequência relativa a glutamato sintase dependente de ferredoxin (EC 1.4.7.1) (0,0118%) do que a rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada (0,0075%) e *bulk soil* (0,0088%). As enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase (GOGAT) são essenciais na assimilação de amônia derivado de fontes externas de nitrogênio e processos metabólicos do nitrogênio como fotorrespiração e catabolismo de aminoácidos. A glutamina sintetase catalisa a incorporação inicial de amônia livre em glutamina usando glutamato como um aceptor, e a glutamato sintase catalisa a transamidação do nitrogênio amido da glutamina a 2-oxoglutarato para formar duas moléculas de glutamato (SAKAKIBARA et al., 1991).

A glutamina sintase utiliza ferredoxin (Fd) como um redutor (ferredoxin glutamato sintase, EC 1.4.7.1) para entregar os equivalentes reduzidos via o grupo $[3Fe\text{-}4S]^{0,+1}$ ao grupo prostético FMN (mononucleotídeo flavina) (HEUVEL et al., 2004).

A Fd-GOGAT consiste de quatro domínios: domínio glutamina amidotransferase (GAT), domínio central, domínio sintase e domínio beta-helicoidal. A glutamina é hidrolisada no domínio GAT, e a amônia gerada é transferida ao domínio sintase através dum canal amônia intramolecular. Esse canal é composto por resíduos dos domínios central e beta-helicoidal e impede o vazamento de amônia a partir da enzima (KAMEYA et al., 2007).

A Fd-GOGAT é encontrada também em: *Synechocystis*, *Anabaena*, *Thermosynechococcus*, *Prochlorococcus*, *Synechococcus* (KAMEYA et al., 2007). Na arqueia halofílica *Haloferax mediterranei*, capaz de utilizar qualquer fonte disponível de nitrogênio no seu ambiente hipersalino extremo, foi encontrada a síntese de GOGAT (PIRE et al., 2014).

Outra função encontrada com maior frequência relativa (0,0015%) na rizosfera de Wild Mex foi a da proteína Nac, regulatória da assimilação do nitrogênio, do que na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (0,0008%) e no *bulk soil* (0,0002%). Essa proteína é ativada quando o nitrogênio está em condição limitante. A proteína Nac atua ativando os genes *hut*UH, *put*P e *ure*DABCEFG, os quais codificam enzimas requeridas para o catabolismo de histidina, prolina e ureia, respectivamente. Por outro lado, a Nac reprime os operons *gdh*A codificante da glutamato dehidrogenase (GDH) e *glt*BD, que codifica a glutamato sintase (MUSE; BENDER, 1998; SCHWACHA; BENDER, 1993). O gene *nac* que codifica esta proteína é rigorosamente controlado pelo sistema regulatório do nitrogênio (NTR) (GOSS; BENDER, 1995). A NAC ativa a transcrição por ligação a um local do DNA perto do sítio de ligação da RNA polimerase (GOSS et al., 2002). A proteína Nac regula um número excecionalmente grande de genes, sendo considerada uma das mais versáteis reguladoras em bactérias (BENDER, 2010).

4.2.5.2 Metabolismo do fósforo na rizosfera de feijão

A função da ATPase PhoH induzida pela a inanição de fosfato, foi encontrada com maior frequência relativa na rizosfera de Wild Mex (0,0076%) a, do que na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada e no *bulk soil*, onde apresentou a mesma frequência relativa (0,0060%).

A proteína phoH é uma ATPase putativa pertencente ao regulon Pho fosfato presente na maioria de bactérias e que funcionalmente está ligado ao metabolismo de fosfolipídios e a modificação do RNA. Pelo menos 31 genes fazem parte do regulon Pho (KAZAKOV et al., 2003; GOLDSMITH et al., 2011). A inanição de fosfato e depois do esgotamento do fosfato (fase exponencial de crescimento), induzem o regulon Pho. Essas proteínas parecem estar

envolvidas na proteção do DNA, membranas e proteínas contra estresse oxidativo e parecem contribuir à sobrevivência em condições ambientais extremas como o calor ou estresse osmótico bem como o choque ácido ou alcalino das células em inanição (ANTELMANN et al., 2000; BAEK; LEE, 2007). Se o PhoH hidrolisa ATP, o resultado da reação liberaria energia para conduzir outra reação, presumivelmente para auxiliar na absorção de fosfato pela célula (GOLDSMITH et al., 2011).

O regulador de transcrição PhnF foi uma função encontrada com maior frequência relativa na rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada (0,0018%), do que na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,012%) e no *bulk soil* (0,0009%). O grupo de genes *phn* (ou *psi*D) é induzido durante a limitação de P_i e são requeridos para usar os fosfonatos (Pn) como fonte de fósforo (METCALF; WANNER, 1993). As proteínas PhnF e PhnO poderiam ser proteínas regulatórias (KONONOVA; NESMEYANOVA, 2002). A PhnF enlaça a região intergênica *phn*F-*phn*D, importante sítio na regulação do operon *phn*CDFGHIJKLMNOP que permite o crescimento bacteriano sobre fosfonatos (GEBHARD et al., 2014).

O regulador PhoQ também apresentou maior frequência relativa na rizosfera de IAC Alvorada (0,0094%) do que na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,0077%) e no *bulk soil* (0,0086%). Esse regulador é parte do sistema de sensores ambientais PhoQ/PhoP (sensor kinase PhoQ e regulador de resposta PhoP) em bactérias. Este sistema governa a virulência, medeia a adaptação a ambientes limitantes de Mg^{2+} e regula numerosas atividades celulares em várias espécies Gram-negativas (GROISMAN, 2001). Controla os genes que produzem enzimas que modificam o desenvolvimento da célula conferindo resistência a peptídeos antimicrobianos e enzimas que aliviam o estresse associado ao pH baixo e outros fatores que regulam a virulência em vários patógenos Gram-negativos (MILLER et al., 1989; LIPPA; GOULIAN, 2009). O sensor kinase PhoQ é uma proteína integral da membrana e o domínio periplásmico está envolvido na detecção do sinal. Quando o Mg^{2+} externo esgota, um sinal é propagado através da membrana, resultando na ativação da fosforilação em cascata (MONTAGNE et al., 2001).

O sistema PhoP-PhoQ responde a níveis de Mg^{2+} e Ca^{2+} e não deveria ser confundido com os sistemas de dois componentes PhoB-PhoR ou PhoP-PhoR que governam a adaptação a condições limitantes de fosfato (GROISMAN, 2001).

A proteína PhnA do operon da utilização de alquilfosfonato, foi encontrada com maior frequência relativa na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,0015%) do que na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (0,0009%) e no *bulk soil* (0,0003%). A proteína PhnA faz parte dum grande operon associado à utilização de alquilfosfonato e clivagem do enlace carbono-

fósforo. Esta proteína não está relacionada à enzima fosfonoacetato hidrolase caracterizada e designada como PhnA por Kulakova et al. (2001).

Os alquilfosfonatos são compostos que possuem um enlace C-P e ocorrem amplamente de forma livre ou combinada em lipídeos, polissacarídeos ou proteínas. Muitos organofosfanatos são adicionados aos ecossistemas naturais em grandes quantidades na forma de inseticidas, herbicidas ou retardadores de chama (COOK et al., 1978).

Os genes *phn* permitem às células crescer sobre alquilfosfonatos (metil-, etil- e 2-aminoetilfosfonatos) como única fonte de fósforo. Essa habilidade é um complexo processo metabólico com múltiplos genes envolvidos e sob algum tipo de controle pelo regulon fosfato (Pho). Este processo envolve a atividade enzimática da C-P liase e leva à produção de metano, ortofosfato e acetaldeído (COOK et al., 1978; CHEN et al., 1990).

Esta habilidade que tem os micro-organismos no solo para clivar os enlaces muito estáveis de C-P, está também envolvida em processos ambientais de degradação de substâncias orgânicas e xenobióticas como a degradação do herbicida N-fosfonometilglicina (glifosato) (CHEN et al., 1990; SANGAL et al., 2014).

4.2.5.3 Aquisição e metabolismo do ferro na rizosfera de feijão

A respeito das funções da aquisição e metabolismo do ferro, foram encontradas funções relacionadas com o transporte e síntese de sideróforos.

O ferro é um elemento essencial para a maioria das bactérias, é requerido para processos metabólicos que incluem a transferência de elétrons, ativação de oxigênio e biossíntese de aminoácidos e nucleósidos (CARTER et al., 2006; VOULHOUX et al., 2006). Porém, a quantidade de ferro biodisponível é muito limitada, devido a este metal se encontrar geralmente em oxihidróxidos insolúveis. Por isso as bactérias têm desenvolvido sistemas especializados para obter ferro dos substratos e hospedeiros (NEILANDS, 1995; CLARKE et al., 2001; EISENDLE et al., 2003). Uma das principais estratégias para a obtenção de ferro é a síntese e secreção de quelantes de Fe^{3+} de baixo peso molecular, denominados sideróforos, os quais podem solubilizar o ferro ambiental e então ser transportado para dentro da célula via transportadores da membrana exterior (MIETHKE; MARAHIEL, 2007; NAJIMI et al., 2008).

O transportador ABC de hidroxamato férrico (TC 3.A.1.14.3), proteína de ligação do substrato periplasmático FhuD, teve igual frequência relativa nas rizosferas (0,0005%) e foi maior do que no *bulk soil* (0,0001%), enquanto que o transportador ABC de hidroxamato férrico (TC 3.A.1.14.3), componente FhuB da permeasse, foi mais abundante na rizosfera de IAC Alvorada (0,0010) do que na rizosfera do genótipo selvagem Wild Mex (0,0007%) e no *bulk*

soil onde não foi detectada. Os transportadores ABC nos micro-organismos são fundamentais para a resistência a antibióticos e antifúngicos (HIGGINS, 2001).

Diferentes receptores de sideróforos são expressados na membrana exterior, cada um com especificidade para um sideróforo quelado metálico em particular. O sistema de transporte do ferricromo consiste em quatro proteínas (FhuA, FhuB, FhuC e FhuD) expressadas por bactérias Gram-negativas (CARTER et al., 2006). A FhuD é uma proteína de ligação periplasmática (PBP) que sob condições limitantes de ferro, transporta vários sideróforos (hidroxamato ferricromo, coprogen férrico e aerobactina férrica) desde um receptor externo da membrana (FhuA) até um transportador de cinta ATP (permease FhuB/C) ligado à membrana interna (ROHRBACH et al., 1995; KREWULAK et al., 2005).

Os sistemas de transporte periplásmicos (permeases) bacterianos funcionam sobre uma grande variedade de substratos e requerem um receptor, uma proteína que se liga ao substrato localizada no periplasma e que é perdida durante o choque osmótico resultando na perda da atividade transporte. Estas permeases periplásmicas (também chamadas de sensíveis ao choque) comumente consistem de três a cinco proteínas componentes (KERPPOLA; FERRO-LUZZI, 1992). A FhuB é uma proteína hidrofóbica requerida para o transporte de hidroxamatos férricos; medeia a translocação real do substrato através da camada dupla de lipídeos interagindo de certa forma com a proteína FhuD na membrana periplásmica e com a proteína FhuC na membrana interna do citosol (KÖSTER, 1991; GROEGER; KÖSTER, 1998; SEBULSKY et al., 2000).

Quanto à síntese de sideróforos, a proteína mono-oxigenase da biosíntese de sideróforos apareceu com frequência relativa maior nas rizosferas de feijão (~0,002%) do que no *bulk soil* (0,001%). No *bulk soil* e na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada, foi encontrada com maior frequência relativa a função da proteína PvdN da biosíntese do sideróforo pioverdina, aminotransferase putativa, classe V (BS: 0,0021%; IA: 0,0016%).

O gene *sid*A codifica a enzima L-ornitina N^5-mono-oxigenase SidA (OMO) que é a primeira etapa comprometida com a biossíntese de sideróforos (NEILANDS, 1995; EISENDLE et al., 2003; MIETHKE; MARAHIEL, 2007; NAJIMI et al., 2008). A enzima L-ornitina-N^5-mono-oxigenase SidA de fungos apresenta uma significativa similaridade no nível de proteína das enzimas bacterianas biossintéticas de sideróforos como a ornitina-N^5-monooxigenase PvdA de *Pseudomonas aeruginosa* e a lisina-N^6 mono-oxigenase IucD de *Escherichia coli*. PvdA e IucD são essenciais para a biossíntese dos sideróforos pioverdina e aerobactina, respectivamente (HAAS, 2014).

O sideróforo pioverdina (Pvd) ou pseudobactina é composto de um cromóforo fluorescente e uma porção de peptídeo. As proteínas Pvd podem ser classificadas em PvdI até

PvdIII e podem ser distinguidas por suas sequências peptídicas de aminoácidos. Em todas as proteínas Pvd, o peptídeo e o cromóforo são derivados de precursores de aminoácidos que são montados por sintetases peptídicas não ribossomais (NRPS), com outras enzimas que catalisam reações adicionais para completar a maturação das proteínas Pvd (VOULHOUX et al., 2006). PvdH é uma das enzimas conservadas entre as *Pseudomonas* fluorescentes. Esta enzima é requerida para a síntese do cromóforo e é uma aminotransferase que catalisa a formação de L-2,4-diaminobutyrato a partir do Beta-semialdeído aspartato. Seis genes têm sido identificados como os codificadores das proteínas requeridas para a síntese da pioverdina (genes *pvd*) (LAMONT; MARTIN, 2003; VOULHOUX et al., 2006).

As *Pseudomonas* produtoras de Pvd inibem o crescimento de bactérias e fungos por ser altamente competitivas para o sequestro de ferro. Em certas condições, a Pvd funciona como um antibiótico bacteriostático ou fungistático difusível. A produção de sideróforos conduz à promoção do crescimento vegetal devido à limitação de ferro como uma condição bacteriostática que evita a multiplicação do patógeno (HAAS; DÉFAGO, 2005).

4.2.5.4 Fitohormônios na rizosfera do feijão

Finalmente, a função da indol-3-piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.74) que está relacionada com a promoção do crescimento vegetal, foi mais abundante na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (0,0019%) do que na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (0,0017%) e no *bulk soil* (0,0003%).

A enzima indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC) é essencial para a biossíntese do ácido indol-3-acético (AIA) pela via do ácido indol-3-pirúvico (AIP). Nessa via, o triptofano é primeiro transaminado por uma aminotransferase IPyA. Depois o IPyA é decarboxilado por uma indol-3-piruvato ou fenilpiruvato decarboxilase a indol-3-acetaldeído, o qual é oxidado a AIA por uma oxidação não enzimática ou por uma aldeído oxidase/dehidrogenase. Nas plantas não tem sido identificado um gene vegetal que codifique uma enzima com atividade catalítica do ácido AIP. O gene *ipdC* constitui o único gene bacteriano descrito de induzir o AIA (COSTACURTA et al., 1994; TALARICO et al., 2001; BROEK et al., 2005; PHI et al., 2008; ZYL et al., 2014). A expressão do *ipdC* e produção de AIA ocorre na fase estacionária e é induzido por uma fonte exógena de triptofano, fenilalanina e tirosina, condições presentes na rizosfera (RYU; PATTEN, 2008).

4.3 Sumário dos Principais Resultados

A abordagem dependente de cultivo permitiu recuperar 11 bactérias da rizosfera de feijão que mostraram inibição do crescimento micelial *in vitro* de fungos patógenos do feijoeiro, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Esses isolados bacterianos foram identificados como *Streptomyces olivoverticillatus* (TWS5.4 maci), *Streptomyces phaeopurpureus* (GRWS3.1 refu), *Streptomyces ochraceiscleroticus* (TWS3.5 ciat), *Kitasatospora azatica* (TIS1.4 brat), *Achromobacter animicus* (TIS1.4 maat), *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* (TIS1.5 laci), *Pseudomonas geniculata* (GI2.4 brre), *Pseudomonas protegens* (TIS1.4 cuat), *Stenotrophomonas daejeonensis* (TIS1.4 prat), *Brevibacillus brevis* (PW1.4 brru) e *Paenibacillus jamilae* (TW2.4 mapu). Cinco dessas espécies (*Streptomyces olivoverticillatus, Pseudomonas geniculata*, *Paenibacillus jamilae*, *Brevibacillus brevis* e *Achromobacter animicus*) inibiram o crescimento da maioria das cepas patógenas testadas.

A abordagem independente de cultivo revelou que a composição da comunidade microbiana na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex foi caracterizada pela maior abundância relativa dos filos bacterianos Acidobacteria, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes, e do filo fúngico Glomeromycota quando comparada com a composição da rizosfera do genótipo cultivado IAC Alvorada, a qual foi constituída em maior proporção pelos filos bacterianos Firmicutes, Planctomycetes, Deinococcus-Thermus e pelo filo fúngico Ascomycota. No nível taxonômico de gênero, a comunidade microbiana da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex apresentou maior frequência relativa de gêneros que albergam características benéficas importantes para o desenvolvimento da planta. Por exemplo, os fixadores do nitrogênio *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Azospirillum*, os nitrificadores *Nitrospira*, *Opitutus* e membros de Thaumarchaeota; os antagonistas e promotores do crescimento *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sordaria* e *Glomus*.

O padrão de distribuição observado na análise de ordenação das funções no microbioma da rizosfera do feijão selvagem Wild Mex foi diferente do padrão encontrado no *bulk soil* e na rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada. Os resultados indicaram que o genótipo selvagem é mais seletivo no recrutamento de micro-organismos e funções na rizosfera quando comparado com o cultivar moderno. A rizosfera do feijão selvagem Wild Mex apresentou maior abundância relativa de funções relacionadas à fixação do nitrogênio, produção de sideróforos e de ácido indol acético (AIA), quando comparada com o genótipo cultivado IAC Alvorada.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O genótipo de feijão selvagem Wild Mex foi capaz de recrutar uma maior abundância relativa de organismos e funções benéficas na rizosfera quando comparado ao recrutamento realizado pela variedade comercial de feijão IAC Alvorada. Essa observação sugere que o hospedeiro selvagem apresenta uma maior capacidade de comunicação com o microbioma da rizosfera e explora essa interação para se beneficiar de funções do microbioma relacionadas a nutrição, proteção contra patógenos e promoção do crescimento vegetal. Dessa forma, conclui-se que o processo de domesticação e melhoramento genético das plantas cultivadas potencialmente debilitou a capacidade do hospedeiro em selecionar e sustentar micro-organismos e funções benéficas na rizosfera.

O consórcio de micro-organismos benéficos na rizosfera do feijão selvagem Wild Mex mostrou uma grande diversidade de bactérias, arqueias e fungos. Os resultados indicam a necessidade do estudo do sinergismo entre Glomeromycota e bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Azospirillum* e *Brevibacillus*, os quais foram mais abundantes no genótipo selvagem de feijão. A compreensão das interações ecológicas entre estes micro-organismos é essencial para a exploração do microbioma da rizosfera de feijão de maneira que resulte em efeitos benéficos para as plantas. Dessa forma, os ancestrais das plantas cultivadas poderiam ser usados para a captura de micro-organismos benéficos em ambientes naturais, onde ocorreu a coevolução entre o microbioma e o hospedeiro. Finalmente, os genótipos selvagens de plantas são fontes de características genéticas que podem ser utilizadas nos programas de melhoramento vegetal para desenvolver cultivares que suportem comunidades microbianas funcionalmente versáteis em benefício do crescimento e saúde vegetal, bem como na diminuição do uso de insumos agrícolas.

REFERÊNCIAS

ABAWI, G.S. Pudriciones radicales. In: PASTOR-CORRALES, M.; SCHWARTZ, H.F. **Problemas de producción del frijol en los trópicos.** Cali: CIAT, 1994. chap. 6, p. 121-184.

ABAWI, G.S.; PASTOR CORRALES, M.A. **Root rots of beans in Latin America and Africa:** diagnosis, research methodologies, and management strategies. Cali: CIAT, 1990. 114 p.

AISLABIE, J.; DESLIPPE, J.R. Soil microbes and their contribution to soil services. In: DYMOND, J.R. **Ecosystem services in New Zealand:** conditions and trends. New Zealand: Manaaki Whenua Press, 2013. chap. 1, p. 143-161.

AKTUGANOV, G.; MELENTJEV, A.; GALIMZIANOVA, N.; KHALIKOVA, E.; KORPELA, T.; SUSI, P. Wide-range antifungal antagonism of *Paenibacillus ehimensis* IB-X-b and its dependence on chitinase and beta-1,3-glucanase production. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 54, n. 7, p. 577-587, July 2008.

AL-ASKAR, A.A.; RASHAD, Y.M. Arbuscular mycorrhizal fungi: a biocontrol agent against common bean *Fusarium* root rot disease. **Plant Pathology Journal,** Broadway, v. 9, p. 31-38, 2010.

AL-THANI, R.F.; ABD-EL-HALEEM, D.A.M.; AL-SHAMMRI, M. Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils. **African Journal of Microbiology Research,** Lagos, v. 3, n. 11, p. 761-766, Nov. 2009.

ALVES-SANTOS, F.M.; CORDEIRO-RODRIGUES, L.; SAYAGUÉS, J.M.; MARTÍN-DOMÍNGUEZ, R.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; CRESPO, M.C., DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. **Plant Pathology,** Broadway, n. 51, p. 605-611, Apr. 2002.

AMIN, S.A.; MOFFETT, J.W.; MARTENS-HABBENA, W.; JACQUOT, J.E.; HAN, Y.; DEVOL, A.; INGALLS, A.E.; STAHL, D.A.; ARMBRUST, E.V. Copper requirements of the ammonia-oxidizing archaeon *Nitrosopumilus maritimus* SCM1 and implications for nitrification in the marine environment. **Limnology and Oceanography,** Waco, v. 58, n. 6, p. 2037-2045, 2013.

ANERSON, P.A. **Coffee rust.** Minneapolis: The American Phytopathological Society, 2011. Disponível em: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx>. Acesso em: 31 mar. 2015.

ANTELMANN, H.; SCHARF, C.; HECKER, M. Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis:* proteomics and transcriptional analysis. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 182, n. 16, p. 4478-4490, Aug. 2000.

ANTOUN, H.; PRÉVOST, D. Ecology of planta growth promoting rhizobacteria. In: SIDDIQUI, Z.A. **PGPR:** biocontrol and biofertilization. Amsterdam: Springer, 2006. chap. 1, p. 1-38.

ARAGÃO, F.J.L.; BRONDANI, R.P.V.; BURLE, M.L. *Phaseolus*. In: CCHITTARANJAN, K. **Wild crop relatives:** genomic and breeding resources, legume crops and forages. Berlin: Springer-Verlag, 2011. chap. 11, p. 223-236.

ARTHURSON, V.; HJORT, K.; MULETA, D.; JÄDERLUND, L.; GRANHALL, U. Effects on *Glomus mosseae* root colonization by *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus brasilensis* strains as related to soil P-availability in winter wheat. **Applied and Environmental Soil Science,** New York, Article ID 298097, 9 p., 2011. doi:10.1155/2011/298097

ARUNACHALAM, P.S.; HWAN YANG, S.; DAMODHARAN, K.; SUH, J.W. Genetic and functional characterization of culturable plant-beneficial actinobacteria associated with yam rhizosphere. **Journal of Basic Microbiology,** Jena, v. 53, p. 985-995, 2013.

ARYA, R.; SHARMA, A.K. Screening, Isolation and characterization of *Brevibacillus borstelensis* for the bioremediation of carbendazim. **Journal of Environmental Science and Sustainability,** Hisar, v. 2, n. 1, p. 12-14, 2014.

ATTARD, E.; POLY, F.; COMMEAUX, C.; LAURENT, F.; TERADA, A.; SMETS, B.F.; RECOUS, S.; ROUX, X.L. Shifts between *Nitrospira*- and *Nitrobacter*-like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. **Environmental Microbiology,** Hoboken, v. 12, p. 315-326, 2010.

AVELINO, J.; WILLOCQUET, L.; SAVARY, S. Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics. **Plant Pathology,** Broadway, v. 53, n. 5, p. 541-547, Oct. 2004.

AVRAHAMI, S.; BOHANNAN, B.J.M. Response of *Nitrosospira* sp. strain AF-like ammonia oxidizers to changes in temperature, soil moisture content, and fertilizer concentration. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 73, n. 4, p. 1166-1173. Feb. 2007.

BAEK, J.H.; LEE, S.Y. Transcriptome analysis of phosphate starvation response in *Escherichia coli.* **Journal of Microbiology and Biotechnology,** Seoul, v. 17, n. 2, p. 244-252, 2007.

BAEK, S.H.; IM, W.T.; OH, H.W.; LEE, J.S.; OH, H.M.; LEE, S.T. *Brevibacillus ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Washington, v. 56, p. 2665-2669, 2006.

BAIS, H.P.; PARK, S.W.; WEIR, T.L.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science,** Maryland Heights, v. 9, n. 1, p. 26-32, Jan. 2004.

BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology,** Palo Alto, v. 57, p. 233-266, Jan. 2006.

BAKKER, P.A.H.M.; RAAIJMAKERS, J.M.; BLOEMBERG, G.; HÖFTE, M.; LEMANCEAU, P.; COOKE, B.M. **New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research.** Amsterdam: Springer, 2007. 365 p.

BALDIA, S.F.; EVANGELISTA, A.D.; ARALAR, E.V.; SANTIAGO, A.E. Nitrogen and phosphorus utilization in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Laguna de Bay, Philippines. **Journal of Applied Phycology,** New York, v. 19, n. 6, p. 607-613, Dec. 2007.

BANERJEE, S.; PALIT, R.; SENGUPTA, C.; STANDING, D. Stress induce phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. **Australian Journal of Crop Science,** Lismore, v. 4, n. 6, p. 378-383, 2010.

BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, E.M.; PEREYRA, M.A. *Azospirillum* spp., a dynamic soil bacterium favourable to vegetable crop production. **Dynamic Soil, Dynamic Plant,** Takamatsu v. 1, n. 2, p. 68-82, 2007.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.

BENDER, R.A. A NAC for regulating metabolism: the nitrogen assimilation control protein (NAC) from *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 192, n. 19, p. 4801-4811, Oct. 2010.

BERG, G.; GRUBE, M.; SCHLOTER, M.; SMALLA, K. The plant microbiome and its importance for plant and human health. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 1-2, Sept. 2014.

BERGE, O.; GUINEBRETIÈRE, M.H.; ACHOUAK, W.; NORMAND, P.; HEULIN, T. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Washington, v. 52, p. 607–616, 2002.

BERGMANN, G.T.; BATES, S.T.; EILERS, K.G.; LAUBER, C.L.; CAPORASO, J.G.; WALTERS, W.A.; KNIGHT, R.; FIERER, N. The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities. **Soil Biology & Biochemistry,** Oxford, v. 43, n. 7, p. 1450-1455, July 2011.

BITOCCHI, E.; NANNIA, L.; BELLUCCIA, E.; ROSSIA, M.; GIARDINIA, A.; SPAGNOLETTI SEULI, P.; LOGOZZO, G.; STOUGAARDC, J.; McCLEAND, P.; ATTENEE, G.; PAPAA, R. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 109, n. 14, p. 1-9, Mar. 2012.

BOER, W. de; KLEIN GUNNEWIEK, P.A.; LAANBROEK, H.J. Ammonium-oxidation at low pH by a chemolithotrophic bacterium belonging to the genus *Nitrosospira*. **Soil Biology & Biochemistry,** Oxford, v. 27, n. 2, p. 127-132, 1995.

BOMBERG, M.; TIMONEN, S. Effect of tree species and mycorrhizal colonization on the archaeal population of boreal forest rhizospheres. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 75, n. 2, p. 308-315, Oct. 2008.

BORDJIBA, O.; STEIMAN, R.; KADRI, M.; SEMADI, A.; GUIRAUD, P. Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. **Journal of Environmental Quality,** Madison, v. 30, n. 2, p. 418-426, 2001.

BOUFFAUD, M.L.; KYSELKOVA, M.; GOUESNARD, B.; GRUNDMANN, G.; MULLER, D.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots? **Molecular Ecology,** Bloomington, v. 21, n. 1, p. 195-206, Jan. 2012.

BRÄUER, S.L.; CADILLO-QUIROZ, H.; WARD, R.J.; YAVITT, J.B.; ZINDER, S.H. *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Washington, v. 61, p. 45-52, 2011.

BRIGLE, K.E.; NEWTON, W.E. DEAN, D.R. Complete nucleotide sequence of the *Azotobacter vinelandii* nitrogenase structural gene cluster. **Gene,** Amsterdam, v. 37, p. 37-44, 1985.

BROEK, A.V.; GYSEGOM, P.; ONA, O.; HENDRICKX, N.; PRINSEN, E.; IMPE, J. van; VANDERLEYDEN, J. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a *cis*-acting sequence involved in auxin responsive expression. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** Saint Paul, v. 18, n. 4, p. 311-323, 2005.

BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant and Soil,** New York, v. 252, p. 55-128, 2003.

BROWN, M.P.; STEFFENSON, B.J.; WEBSTER, R.K. Host range of *Pyrenphora teres* f. *teres* isolates from California. **Plant Disease,** Saint Paul, v. 77, n. 9, p. 942-947, 1993.

BUCKLEY, D.H.; HUANGYUTITHAM, V.; NELSON, T.A.; RUMBERGER, A.; THIES, J.E. Diversity of *Planctomycetes* in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 72, n. 7, p. 4522-4531, July 2006.

BUECHE, M.; WUNDERLIN, T.; ROUSSEL-DELIF, L.; JUNIER, T.; SAUVAIN, L.; JEANNERET, N.; JUNIER, P. Quantification of endospore-forming Firmicutes by quantitative PCR with the functional gene *spo0A*. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 79, n. 17, p. 5302-5312, Sept. 2013.

BURLE, M.L.; FONSECA, J.R.; KAMI, J.A.; GEPTS, P. 2010. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 121, n. 5, p. 801-813, Sept. 2010.

CABALLERO-MELLADO, J., ONOFRE-LEMUS, J., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., MARTINEZ-AGUILAR, L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 73, n. 16, p. 5308-5319, 2007.

CAMPBELL, M.A.; CHAIN, P.S.G.; DANG, H.; EL SHEIKH, A.F.; NORTON, J.M.; WARD, N.L.; WARD, B.B.; KLOTZ, M.G. *Nitrosococcus watsonii* sp. nov., a new species of marine obligate ammonia-oxidizing bacteria that is not omnipresent in the world's oceans: calls to validate the names '*Nitrosococcus halophilus*' and '*Nitrosomonas mobilis*'. **FEMS Microbiology Ecology,** Oxford, v. 76, p. 39-48, 2011.

CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia Central e Oriental.** 2007. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba 2007.

_____. **A estrutura e composição de comunidades microbianas (Bacteria e Archaea) em fragmentos de carvão pirogênico de Terra Preta de Índio da Amazônia Central.** 2011. 138 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba 2011.

CARBONETTO, B.; RASCOVAN, N.; ÁLVAREZ, R.; MENTABERRY, A.; VÁSQUEZ, M.P. Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine pampas. **PLOS One,** San Francisco, v. 9, n. 6, p. 1-11, June 2014.

CARTER, D.M.; MIOUSSE, I.R.; GAGNON, J.N.; MARTINEZ, E.; CLEMENTS, A.; LEE, J.; HANCOCK, M.A.; GAGNON, H.; PAWELEK, P.D.; COULTON, J.W. Interactions between TonB from *Escherichia coli* and the periplasmic protein FhuD. **Journal of Biological Chemistry,** Maryland, v. 281, n. 46, p. 35413-35424, Aug. 2006.

CASTRO, A.P. de; QUIRINO, B.F.; PAPPAS, G. Jr.; KUROKAWA, A.S.; NETO, E.L.; KRÜGER, R.H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. **Archives of Microbiology,** Braunschweig, v. 190, p. 129-139, 2008.

CAUMETTE, P.; BROCHIER-ARMANET, C.; NORMAND, P. Taxonomy and phylogeny of prokaryotes. In: BERTRAND, J.C.; CAUMETTE, P.; LEBARON, P.; MATHERON, R.; NORMAND, P.; SIME-NGANDO, T. **Environmental microbiology:** fundamentals and applications. New York: Springer, 2011. chap. 6, p. 145-190.

ÇEBI KILIÇOGLU, M.; ÖZKOÇ, I. Molecular characterization of *Rhizoctonia solani* AG4 using PCR-RFLP of the rDNA-ITS region. **Turkish Journal of Biology,** Ankara, n. 34, p. 261-269, 2010.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Standard system for the evaluation of bean germplasm.** Cali, 1987. 54 p.

_____. **Investigación en fríjol.** Cali, 2010. Disponível em: <http://ciat.cgiar.org/es/investigacion-en-frijol?lang=es>. Acesso em: 25 set. 2014.

CHALLACOMBE, J.F.; EICHORST, S.A.; HAUSER, L.; LAND, M.; XIE, G.; KUSKE, C.R. Biological consequences of ancient gene acquisition and duplication in the large genome of *Candidatus* Solibacter usitatus Ellin6076. **PLOS One,** San Francisco, v. 6, n. 9, p. 1-12, 2011.

CHAPARRO, J.M.; BRADI, D.V.; VIVANCO, J.M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. **The ISME Journal,** London, v. 8, n. 4, p. 1-13, Apr. 2014.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of the *Zea mays* L. **Microbial Ecology,** New York, v. 41, p. 252-263, 2001.

CHEN, C.M.; YE, Q.Z.; ZHU, Z.M.; WANNER, B.L.; WALSH, C.T. Molecular biology of carbon-160 phosphorus bond cleavage. Cloning and sequencing of the *phn* (*psi*D) genes involved in alkylphosphonate uptake and C-P lyase activity in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry,** Maryland, v. 265, n. 8, p. 4461-4471, Mar. 1990.

CHEN, X.P.; ZHU, Y.G.; XIA, Y.; SHEN, J.P. HE, J.Z. Ammonia-oxidizing Archaea: important players in paddy rhizosphere soil? **Environmental Microbiology,** Hoboken, v. 10, n. 8, p. 1978-1987, Aug. 2008.

CHEN, Y.P.; REKHA, P.D.; ARUN, A.B.; SHEN, F.T.; LAI, W.A.; YOUNG, C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology,** Amsterdam, v. 34, p. 33-41, 2006.

CHIN, K.J.; LIESACK, W.; JANSENN, P.H. *Opitutus terrae* gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division 'Verrucomicrobia' isolated from rice paddy soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Washington, v. 51, n. 6, p. 1965-1968, Nov. 2001.

CLARKE, T.E.; TARI, L.W.; VOGEL, H.J. Structural biology of bacterial iron uptake systems. **Current Topics in Medicinal Chemistry,** Beijing, v. 1, p. 7-30, 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos, safra 2014/15. Brasília, 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_10_23_10_20_02_boletim_graos_outubro_2014.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2014.

COMPANT, S.; CRHISTOPHE, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plant. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 669-678, 2010.

COOK, A.M.; DAUGHTON, C.G.; ALEXANDER, M. Phosphonate utilization by bacteria. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 133, n. 1, p. 85-90, Jan. 1978.

CORTÉS, A.J.; CHAVARRO, M.C.; MADRIÑÁN, S.; THIS, D.; BLAIR, M.W. Molecular ecology and selection in the drought related Asr gene polymorphisms in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BioMed Central Genetics,** London, v. 13, n. 58, p. 1-14, 2012.

COSTACURTA, A. KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirilium brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. **Molecular and General Genetics,** New York, v. 243, v. 4, p. 463-473, May 1994.

CRUZ, R.; SANTOS, C.; LIMA, J.S. de; MOREIRA, K.A.; SOUZA-MOTTA, C.M. de. Diversity of *Penicillium* in soil of Caatinga and Atlantic Forest areas of Pernambuco, Brazil: an ecological approach. **Nova Hedwigia,** Stuttgart, v. 97, n. 3/4, p. 543-556, 2013.

CURATTI, L.; HERNANDEZ, J.A.; IGARASHI, R.Y.; SOBOH, B.; ZHAO, D.; RUBIO, L.M. *In vitro* synthesis of the iron–molybdenum cofactor of nitrogenase from iron, sulfur, molybdenum, and homocitrate using purified proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 104, n. 45, p. 17626-17631, Nov. 2007.

CURL, E.A.; TRUELOVE, B. **The rhizosphere.** Berlin: Springer-Verlag, 1986. 288 p.

CYRIL, B.; GEOFFREY, N.E.; SIMON, M.F.; REIS JÚNIOR, F.B. dos; GROSS, E.; LAWTON, R.C.; NETO, N.E.; LOUREIRO, M.F.; FARIA, S.M. de; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K.; YOUNG, J.P.W. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology,** Bloomington, v. 19, p. 44-52, 2010.

DAEBELER, A.; BODELIER, P.L.E.; YAN, Z.; HEFTING, M.M.; JIA, Z.; LAABROEK, J. Interactions between *Thaumarchaea, Nitrospira* and methanotrophs modulate autotrophic nitrification in volcanic grassland soil. **The ISME Journal,** London, v. 8, p. 2397-2410, 2014.

DALSGAARD, T.; BAK, F. Nitrate reduction in sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrium desulfuricans,* isolated from rice paddy soil: sulfide inhibition, kinetics and regulation. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 60, n. 1, p. 291-297, Jan. 1994.

DAVIS, C.K.; WEBB, R.I.; SLY, L.I.; DENMAN, S.E.; McSWEENEY, C.S. Isolation and survey of novel fluoroacetate-degrading bacteria belonging to the phylum Synergistetes. **FEMS Microbiology Ecology,** Oxford, v. 80, p. 671-684, 2012.

D'AURIA, J.C.; GERSHENZON, J. The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana:* growing like a weed. **Current Opinion in Plant Biology,** Amsterdam, v. 8, p. 308–316, 2005.

DAYNES, C.N.; ZHANG, N.; SALEEBA, J.A.; McGEE, P.A. Soil aggregates formed in vitro by saprotrophic *Trichocomaceae* have transient water-stability. **Soil Biology & Biochemistry,** Oxford, v. 48, p. 151-161, 2012.

De DEYN, G.B.; PUTTEN, W.H. van der. Linking aboveground and belowground diversity. **Trends in Ecology and Evolution,** Saint Louis, v. 20, n. 11, p. 625-633, Nov. 2005.

DEBOUCK, D.G.; TORO, O.; PAREDES, O.M.; JOHNSON, W.C.; GEPTS, P. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. **Economic Botany,** New York, v. 47, n. 4, p. 408-423, 1993.

DeBRUYN, J.M.; NIXON, L.T.; FAWAZ, M.N.; JOHNSON, A.M.; RADOSEVICH, M. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 77, n. 17, p. 6295-6300, Sept. 2011.

DECOCK, C.; HURET, S.; CHARUE, P. Anamorphic fungi from French Guyana: two undescribed *Gliocephalotrichum* species (*Nectriaceae, Hypocreales*). **Mycologia,** Lexington, v. 98, n. 3, p. 488-498, June 2006.

DELMOTTE, N.; KNIEF, C.; CHAFFRON, S.; INNEREBNER, G.; ROSCHITZKI, B.; SCHLAPBACH, R.; MERING, C. Von; VORHOLT, J.A. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 106, n. 38, p. 16428-16433, Sept. 2009.

DESIDERIO, F.; BITOCCHI, E.; BELLUCCI, E.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; ATTENE, G.; PAPA, R.; NANNI, L. Chloroplast microsatellite diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Frontiers in Plant Science,** Lausanne, v. 3, n. 312, p. 1-15, Jan. 2013.

DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; HANNULA, S.E.; ANDREOTE, F.D.; SILVA, M.C.P. e; SALLES, J.F.; BOER, W. de; van VEEN, J.; ELSAS, J.D. van. Different selective effects on rhizosphere Bacteria exerted by genetically modified versus conventional potato lines. **PLOS One,** San Francisco, v. 8, n. 7, p. 1-12, May 2013.

DOMÍNGUEZ-BELLO, LOVERA, M.; RINCÓN, M.T. Characteristics of dihydroxypyridine-degrading activity in the rumen bacterium *Synergistes jonesii*. **FEMS Microbiology Ecology,** Oxford, v. 23, n. 4, p. 361-365, Aug. 1997.

DONG, K.; KIM, W.S.; TRIPATHI, B.M.; ADAMS, J. Generalized soil *Thaumarchaeota* community in weathering rock and saprolite. **Microbial Ecology,** New York, v. 69, n. 2, p. 356-360, 2015.

EDWARDS S.G.; SEDDON, B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea in vitro*. **Journal of Applied Microbiology,** Hoboken, v. 91, p. 652-659, 2001.

EISENDLE, M.; OBEREGGER, H.; ZADRA, I.; HAAS, H. The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding L-ornithine N^5-monooxygenase (sidA) and a non-ribosomal peptide synthetase (sidC). **Molecular Microbiology,** Hoboken, v. 49, n. 2, p. 359-375, 2003.

ELLIOT, G.N.; CHEN, W.M.; CHOU, J.H.; WANG, H.C.; SHEU, S.Y.; PERIN, L.; REIS, V.M.; MOULIN, L.; SIMON, M.F.; BONTEMPS, C.; SUTHERLAND, J.M.; BESSI, R.; FARIA, S.M.; TRINICK, M.J.; PRESCOTT, A.R.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. **New Phytologist,** Lancaster, v. 173, p. 168-180, 2007.

ELSAS, J.D. van; JANSSON, J.K.; TREVORS, J.T. **Modern soil microbiology.** 2nd ed. London: CRC Press, 2007. 646 p.

EL-TARABILY, K.A. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. **Plant and Soil,** New York, v. 308, p. 161-174, July 2008.

EMBRAPA. **Cultivo do feijão irrigado na Região Noroeste de Minas Gerais.** Brasília, 2005. (Sistemas de Produção, 5). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/>. Acesso em: 15 nov. 2014.

ESCHBACH, M.; MÖBITZ, H.; ROMPF, A.; JAHN, D. Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative process: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. **FEMS Microbiology Letters,** Oxford, v. 223, p. 227-230, 2003.

FALCÃO, N.P.S.; CLEMENT, C.R.; TSAI, S.M.; COMERFORD, N.B. Pedology, fertility and biology of Central Amazonian dark earths. In: WOODS, W.I.; TEIXEIRA, W.G.; LEHMANN, J.; STEINER, C.; WINKLERPRINS, A.M.G.A.; REBELLATO, L. **Amazonian dark earths:** Wim Sombroek's vision. New York: Springer, 2009. chap. 11, p. 213-228.

FERNANDO, W.G.D.; NAKKEERAN, S.; ZHANG, Y. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In: SIDDIQUI, Z.A. **PGPR:** biocontrol and biofertilization. Amsterdam: Springer, 2006. chap. 3, p. 67-109.

FERREIRA, E.S.; SOUZA, W.B. de; SOUZA, K.S. de; PIO, M.C.S.; SANTANA, G.P. Terra Preta de Índio na região amazónica. **Scientia Amazonia,** Manaus, v. 1, n. 1, p. 1-8, fev. 2012.

FIERER, N.; BRADFORD, M.A.; JACKSON, R.B. Toward an ecological classification of soil Bacteria. **Ecology,** New York, v. 88, n. 6, p. 1354-1364, June 2007.

FINLAY, R.D. The fungi in soil. In: ELSAS, J.D. van; JANSSON, J.K.; TREVORS, J.T. **Modern soil microbiology.** 2nd ed. London: CRC Press, 2007. chap. 5, p. 107-146.

FLORES, H.E.; VIVANCO, J.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. **Trends in Plant Science,** Maryland Heights, v. 4, n. 8, p. 220-226, 1999.

FOLEY, R.C.; GLEASON, C.A.; ANDERSON, J.P., HAMANN, T.; SINGH, K.B. Genetic and genomic analysis of *Rhizoctonia solani* interactions with *Arabidopsis*: evidence of resistance mediated through NADPH oxidases. **PLOS One,** San Francisco, v. 8, n. 2, p. 1-11, Feb. 2013.

FRACETTO, G.G.M.; AZEVEDO, L.C.B.; FRACETTO, F.J.C.; ANDREOTE, F.D.; LAMBAIS, M.R. PFENNING, L.H. Impact of Amazon land use on the community of soil fungi. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v. 70, n. 2, p. 59-67, 2013.

FRAGA, M.E.; PEREIRA, M.G. Diversidade de *Trichocomaceae* isolada de solo e serrapilheira de Floresta Atlântica. **Floresta e Ambiente,** Seropédica, v. 19, n. 4, p. 405-413, 2012.

FRANCO-CORREA, M.; QUINTANA, A.; DUQUE, C.; SUAREZ, C.; RODRÍGUEZ, M.X.; BAREA, J.M. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. **Applied Soil Ecology,** Amsterdam, v. 45, p. 209-217, 2010.

FREITAG, T.E.; CHANG, L.; CLEGG, C.D.; PROSSER, J.I. Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 71, n. 12, p. 8323-8334, Dec. 2005.

FUENTES-RAMIREZ, L.E.; CABALLERO-MELLADO, J. Bacterial biofertilizers. In: SIDDIQUI, Z.A. **PGPR:** biocontrol and biofertilization. Amsterdam: Springer, 2006. chap. 5, p. 143-172.

FUERST, E.; SAGULENKO, J.A. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. **Nature Review Microbiology,** London, v. 9, p. 403-413, June 2011.

GARCÍA-SALAMANCA, A.; MOLINA-HENARES, M.A.; DILLEWIJN, P. van; SOLANO, J.; PIZARRO-TOBÍAS, P.; ROCA, A.; DUQUE, E.; RAMOS, J.L. Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. **Microbial Biotechnology,** Hoboken, v. 6, p. 36-44, July 2012,

GEBHARD, S.; BUSBY, J.N.; FRITZ, G.; MORELAND, N.J.; COOK, G.M.; LOTT, J.S.; BAKER, E.N.; MONEY, V.A. Crystal structure of PhnF, a GntR-family transcriptional regulator of phosphate transport in *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 196, n. 19, p. 3472-3481, Oct. 2014.

GEFFROY, V.; SICARD, D.; OLIVEIRA, J.C.F de; SÉVIGNAC, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, n. 9, p. 774-784, May 1999.

GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. **HortScience,** Alexandria, v. 33, n. 7, p. 1124-1130, Dec. 1998.

_____. Crop domestication as a long-term selection experiment. **Plant Breeding Reviews,** Hoboken, v. 24, p. 1-23, 2004.

GERMIDA, J.J. Growth of indigenous *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium meliloti* in soils amended with organic nutrients. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 54, n. 1, p. 257-263, Jan. 1988.

GERMIDA, J.J.; SICILIANO, S.D. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots or modern, recent and ancient wheat cultivars. **Biology and Fertility of Soils,** New York, v. 33, n. 5, p. 410-415, May 2001.

GIBSON, G.R. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. **Journal of Applied Bacteriology,** Hoboken, v. 69, p. 769-797, 1990.

GLÖCKNER, F.O.; KUBE, M.; BAUER, M.; TEELING, H.; LOMBARDOT, T.; LUDWIG, W.; GADE, D.; BECK, A.; BORZYM, K; HEITMANN, K.; RABUS, R.; SCHLESNER, H.; AMANN, R.; REINHARDT, R. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 100, n. 14, p. 8298-8303, July 2003.

GOLDSMITH, D.B.; CROSTI, G.; DWIVEDI, B.; McDANIEL, L.D.; VARSANI, A.; SUTTLE, C.A.; WEINBAUER, M.G.; SANDAA, R.A.; BREIBART, M. Development of *pho*H as a novel signature gene for assessing marine phage diversity. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 77, n. 21, p. 7730-7739, Nov. 2011.

GOMILA, M.; PRINCE-MANZANO, C.; SVENSSON-STADLER, L.; BUSQUETS, A.; ERHARD, M.; MARTÍNEZ, D.; LALUCAT, J.; MOORE, E.R.B. Genotypic and phenotypic applications for the differentiation and species-level identification of *Achromobacter* for clinical diagnoses. **PLOS One,** San Francisco, v. 9, n. 12, p. 1-22, Dec. 2014.

GOMILA, M.; TVRZOVÁ, L.; TESHIM, A.; SEDLÁCEK, I.; GONZÁLEZ-ESCALONA, N.; ZDRÁHAL, Z.; ŠEDO, O.; GONZÁLEZ, J.F.; BENNASAR, A.; MOORE, E.R.B.; LALUCAT, J.; MURIALDO, S.E. *Achromobacter marplatensis* sp. nov., isolated from a pentachlorophenol-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Washington, v. 61, n. 9, p. 2231-2237, Oct. 2010.

GOPAL, M.; GUPTA, A.; THOMAS, G.V. Bespoke microbiome therapy to manage plant diseases. **Frontiers in Microbiology,** Lausanne, v. 4, p. 1-4, Dec. 2013.

GOPALAKRISHNAN, S.; PANDE, S.; SHARMA, M.; HUMAYUN, P.; KIRAN, B.K.; SANDEEP, D.; VIDYA, M.S.; DEEPTHI, K.; RUPELA, O. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. **Crop Protection,** Amsterdam, v. 30, n. 8, p. 1070-1078, Aug. 2011.

GOSLING, P.; MEAD, A.; PROCTOR, M.; HAMMOND, J.P.; BENDING, G.D. Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient. **New Phytologist,** Lancaster, v. 198, p. 546-556, 2013.

GOSS, T.J.; BENDER, R.A. The nitrogen assimilation control protein, NAC, is a DNA binding transcription activator in *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 177, n. 12, p. 3546-3555, June 1995.

GOSS, T.J.; JANES, B.K.; BENDER, R.A. Repression of glutamate dehydrogenase formation in *Klebsiella aerogenes* requires two binding sites for the nitrogen assimilation control protein, NAC. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 184, n. 24, p. 6966-6975, Dec. 2002.

GOTTEL, N.R.; CASTRO, H.F.; KERLEY, M.; YANG, Z.; PELLETIER, D.A.; PODAR, M.; KARPINETS, T.; UBERBACHER, E.; TUSKAN, G.A.; VILGALYS, R.; DOKTYCZ, M.J.; SCHADT, C.W. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 17, p. 5934-5944, July 2011.

GOUDJAL, Y.; TOUMATIA, O.; YEKKOUR, A.; SABAOU, N.; MATHIEU, F.; ZITOUNI, A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological Research,** Amsterdam, v. 169, n. 1, p. 59-65, Jan. 2014.

GRIFFITHS, E.; GUPTA, R.S. Distinctive protein signatures provide molecular markers and evidence for the monophyletic nature of the *Deinococcus-Thermus* phylum. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 186, n. 10, p. 3097-3107, May 2004.

GROEGER, W.; KÖSTER, W. Transmembrane topology of the two FhuB domains representing the hydrophobic components of bacterial ABC transporters involved in the uptake of siderophores, haem and vitamin B12. **Microbiology,** London, v. 144, p. 2759-2769, 1998.

GROISMAN, E.A. The Pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 183, n. 6, p. 1835-1842, Mar. 2001.

GROSSMAN, J.M.; O'NEILL, B.E.; TSAI, S.M; LIANG, B.; NEVES, E; LEHMANN, J.; THIES, J.E. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. **Environmental Microbiology,** Hoboken, v. 60, p. 192-205, May 2010.

GROTH, I.; SCHÜTZE, B.; BOETTCHER, T.; PULLEN, C.B.; RODRIGUEZ, C.; LEISTNER, E.; GOODFELLOW, M. *Kitasatospora putterlickiae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil, transfer of *Streptomyces kifunensis* to the genus *Kitasatospora* as *Kitasatospora kifunensis* comb. nov., and emended description of *Streptomyces aureofaciens* Duggar 1948. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Washington, v. 53, n. 6, p. 2033-2040, Nov. 2003.

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

GUPTA, R.S.; SHAMI, A. Molecular signatures for the *Crenarchaeota* and the *Thaumarchaeota*. **Antonie van Leeuwenhoek,** New York, v. 99, p. 133-157, 2011.

GURJEET, P.; KOTHIYAL, N.C.; KUMAR, V. Bioremediation of some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from soil using *Sphingobium indicum, Sphingobium japonicum* and *Stenotrophomonas maltophilia* bacterial strains under aerobic conditions. **Journal of Environmental Research and Development,** Bhopal, v. 8, n. 3, p. 395-405, 2014.

GUTIERREZ, R.M.; BARRAQUIO, W.L. Acid-tolerant rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. from the intensively cropped soils of La Trinidad, Benguet, Filipinas. **Philippine Journal of Science,** Taguig, v. 139, n. 1, p. 79-90, June 2010.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology,** London, v. 3, n. 4, p. 307-319, Mar. 2005.

HAAS, H. Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. **Natural Product Reports,** Cambridge, v. 31, n. 10, p. 1266-1276, Oct. 2014.

HACISALIHOGLU, G.; DUKE, E.R.; LONGO, L.M. Differential response of common bean genotypes to mycorrhizal colonization. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society,** Lake Alfred, v. 118, p. 150-152, 2005.

HAESLER F.; HAGN, A.; FROMMBERGER, M.; HERTKORN, N.; SCHMITT-KOPPLING, P.; MUNCH, J.C.; SCHLOTER, M. *In vitro* antagonism of an actinobacterial *Kitasatospora* isolate against the plant pathogen *Phytophthora citricola* as elucidated with ultrahigh resolution mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods,** Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 188-195, Oct. 2008.

HAICHAR, F. el Z.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J.I.; PROSSER, J.I.; BALESDENT, J.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal,** London, n. 2, p. 1221-1230, Aug. 2008.

HALLAM, S.J.; MINCER, T.J.; SCHLEPER, C.; PRESTON, C.M.; ROBERTS, K.; RICHARDSON, P.M.; DeLONG, E.F. Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine *Crenarchaeota*. **PLOS One Biology,** San Francisco, v. 4, n. 4, p. 1-17, Apr. 2006.

HAMDALI, H.; HAFIDI, M.; VIROLLE, M.J.; OUHDOUCH, Y. Rock phosphate-solubilizing actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** New York, v. 24, p. 2565-2575, 2008.

HAMMER, Ø. **PAST PAleontological Statistics:** version 3.04; reference manual. Oslo: University of Oslo, 2014. 224 p.

HASSAN, D.G.H.; ZARGAR, M.Y.; BEIGH, G.M. Biocontrol of *Fusarium* root rot in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. **Microbial Ecology,** New York, v. 34, n. 1, p. 74-80, July 1997.

HAWKES, C.V.; DeANGELIS, K.M.; FIRESTONE, M.K. Root interactions with soil microbial communities and process. In: GARDON, Z.G.; WHITBECK, J.L. **The rhizosphere:** an ecological pespective. Burlingtong: Elsevier, 2007. chap. 1, p. 1-29.

HAYWARD, A.C. A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. **Nature,** London, v. 186, p. 405-406, Apr. 1960.

HEDLUND, B.P.; DODSWORTH, J.A.; MURUGAPIRAN, S.K.; RINKE, C.; WOYKE, T. Impact of single-cell genomics and metagenomics on the emerging view of extremophile "microbial dark matter". **Extremophiles,** New York, v. 28, n. 5, p. 865-875, Aug. 2014.

HERNANDEZ, J.A.; CURATTI, L.; AZNAR, C.; PEROVA, Z.; BRITT, R.D.; RUBIO, L.M. Metal trafficking for nitrogen fixation: NifQ donates molybdenum to NifEN/NifH for the biosynthesis of the nitrogenase FeMo-cofactor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 105, n. 33, p. 11679-11684, Aug. 2008.

HERNANDEZ, J.A.; IGARASHI, R.Y.; SOBOH, B.; CURATTI, L.; DEAN, D.R.; LUDDEN, P.W.; RUBIO, L.M. NifX and NifEN exchange NifB cofactor and the VK-cluster, a newly isolated intermediate of the iron-molybdenum cofactor biosynthetic pathway. **Molecular Microbiology,** Hoboken, v. 63, n. 1, p. 177-192, 2007.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplication of genes encoding 16*S* rRNA and electrophoresis separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HEUVEL, R.H.H. van den; CURTI, B.; VANONI, M.A.; MATTEVI, A. Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate. **Cellular and Molecular Life Sciences,** New York, v. 61, p. 669-681, 2004.

HIGGINGS, C.F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. **Research in Microbiology,** Amsterdam, v. 152, p. 205-210, 2001.

HIRSCH, P.R.; MILLER, A.J.; DENNIS, P.G. Do root exudates exert more influence on rhizosphere bacterial community structure than other rhizodeposits? In: BRUIJN, F.J. de. **Molecular microbial ecology of the rhizosphere.** Hoboken: Wiley-Blackwell, 2013. chap. 22, p. 229-242.

HOORMAN, J.J. The role of soil fungus. **Agriculture and Natural Resources, Ohio State University Extension,** Columbus, v. 14, n. 11, p. 1-6, 2011.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomacea* into three families. **Studies in Mycology,** Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 1-51, 2001.

HU, H.W.; ZHANG, L.M.; YUAN, C.L.; HE, J.Z. Contrasting *Euryarchaeota* communities between upland and paddy soils exhibited similar pH-impacted biogeographic patterns. **Soil Biology & Biochemistry,** Oxford, v. 64, p. 18-27, Sept. 2013.

HUANG, H.F.; ZHOU, D.; GUO, J.; D.K. *Bacillus* spp. from rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. **Journal of Applied Microbiology,** Hoboken, v. 118, n. 3, p. 672-684, Mar. 2015.

HUANG, T.C.; LIN, R.F.; CHU, M.K.; CHEN, H.M. Organization and expression of nitrogen-fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1. **Microbiology,** London, v. 145, p. 743-753, 1999.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M.O.; MENNA, P.; BANGEL, E.V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR.** Londrina: EMBRAPA, 2008. 12 p. (Comunicado Técnico, 79).

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Cultivares de feijoeiro IAC.** 2007. Disponível em: <www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/graos/feijao.php>. Acesso em: 10 nov. 2013.

ISRAEL, D.W.; HOWARD, R.L.; EVANS, H.J.; RUSSELL, S.A. Purification and characterization of the molybdenum-iron protein component of nitrogenase from soybean nodule bacteroids. **The Journal of Biological Chemistry,** Maryland, v. 240, n. 2, p. 500-508, Jan. 1974.

JALLI, M. Sexual reproduction and soil tillage effects on virulence of *Pyrenophora teres* in Finland. **Annals of Applied Biology,** v. 158, p. 95-105, 2010.

JAMIESON, W.D.; PEHL, M.J.; GEGORY, G.A.; ORWIN, P.M. Coordinated surface activities in *Variovorax paradoxus* EPS. **BMC Microbiology,** London, v. 9, n. 124, p. 1-18, 2009.

JENANA, R.K.B.; HAOUALA, R.; TRIKI, M.A.; GODON, J.J.; HIBAR, K.; KHEDHER, M.B.; BENCHI, B. Composts, compost extracts and bacterial suppressive action on *Pythium aphanidermatum* in tomato. **Pakistan Journal of Botany,** Karachi, v. 41, n. 1, p. 315-327, 2009.

JHA, P.; KUMAR, A. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. **Microbiology Ecology,** New York, v. 58, p. 179-188, 2009.

JOSHI, M.N.;SHARMA, A.; PANDIT, A.S.; PANDYA, R.V.; SAXENA, A.K.; BAGATHARIA, S.B. Draft genome sequence of *Brevibacillus* sp. strain BAB-2500, a strain that might play an important role in agriculture. **Genome Announcements,** Washington, v. 1, n. 1, p. 1-2, Feb. 2013.

JUMAS-BILAK, E.; ROUDIÈRE, L.; MARCHANDIN, H. Description of 'Synergistetes' phyl. nov. and emended description of the phylum 'Deferribacteres' and of the family Syntrophomonadaceae, phylum 'Firmicutes'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Washington, v. 59, n. 5, p. 1028-1035, May 2009.

JUOTTONEN, H.; TUITTILA, E.S.; JUUTINEN, S.; FRITZE, H.; YRJÄLÄ, K. Seasonality of rDNA- and rRNA-derived archaeal communities and methanogenic potential in a boreal mire. **The ISME Journal,** London, v. 2, p. 1157-1168, 2008.

KAI, M.; EVMERT, U.; BERG, G.; PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology,** Braunschweig, v. 187, p. 351-360, 2007.

KAMEYA, M.; IKEDA, T.; NAKAMURA, M.; ARAI, H.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Novel ferredoxin-dependent glutamate synthase from the hydrogen-oxidizing chemoautotrophic bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 189, n. 7, p. 2805-2812, Apr. 2007.

KAMILOVA, F.; KRAVCHENKO, L.V.; SHAPOSHNIKOV, A.I.; MAKAROVA, N.; LUGTENBERG, B. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate**. Molecular Plant-Microbe Interactions,** Saint Paul, v. 19, n. 10, p. 1121–1126, June 2006.

KAMKE, J.; RINKE, C.; SCHWIENTEK, P.; MAVROMATIS, K.; IVANOVA, N.; SCZYRBA, A.; WOYKE, T.; HENTSCHEL, U. The Candidate phylum Poribacteria by single-cell genomics: new insights into phylogeny, cell-compartmentation, eukaryote-like repeat proteins, and other genomic features. **PLOS One,** San Francisco, v. 9, n. 1, p. 1-10, Jan. 2014.

KARIMI, K.; AMINI, J.; HARIGHI, B.; BAHRAMENEJAD, B. Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. **Australian Journal of Crop Science,** Lismore, v. 6, n. 4, p. 695-703, 2012.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology,** Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 210-220, June 2006.

KAWAKA, F.; DIDA, M.M.; OPALA, P.A.; OMBORI, O.; MAINGI, J.; OSORO, N.; MUTHINI, M.; AMONDING, A.; MUKAMINEGA, D.; MOUOMA, J. Symbiotic efficiency of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in soils of Western Keny**.** **International Scholarly Research Notices,** New York, 2014. 8 p. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/258497 >. Acesso em: 11 maio 2015.

KAZAKOV, A.E.; VASSIEVA, O.; GELFAND, M.S.; OSTERMAN, A.; OVERBEEK, R. Bioinformatics classification and functional analysis of PhoH homologs. **Silico Biol,** Rockville, v. 3, p. 3-15, 2003. Disponível em: <http://www.bioinfo.de/isb/2003030002/main.html>. Acesso em: 27 mar. 2015.

KERN, D.C.; D'AQUINO, G.; RODRIGUES, T.E.; FRAZÃO, F.J.L.; SOMBROEK, W.; MYERS, T.P.; NEVES, E.G. Distribution of Amazonian dark earths in the Brazilian Amazon. In: LEHMANN, J; KERN, D.; GLASER, B.; WOODS, W.I. **Amazonian dark earths:** origin properties management. New York: Springer Science, 2004. chap. 4, p. 51-76.

KERPPOLA, R.E.; FERRO-LUZZI A., G. Topology of the hydrophobic membrane-bound components of the histidine periplasmic permease. **The Journal of Biological Chemistry,** Maryland, v. 267, n. 4, p. 2329-2336, 1992.

KHAN, A.A.; JILANI, G.; AKHTAR, M.S.; SAQLAN NAQVI, S.M.; RASHEED, M. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Journal of Agricultural and Biological Science,** Ipswich, v. 1, n. 1, p. 48-58, 2009.

KIM, B.Y.; JUNG, M.Y.; YU, D.S.; PARK, S.J.; OH, T.K.; RHEE, S.K.; KIM, J.F. Genome sequence of an ammonia-oxidizing soil archaeon, "*Candidatus* Nitrosoarchaeum koreensis" MY1. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 193, n. 19, p. 5539-5540, Oct. 2011.

KIM, J.S.; SPAROVEK, G.; LONGO, R.M.; MELO, W.J. de; CROWLEY, D. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the western Amazon. **Soil Biology & Biochemistry,** Oxford, v. 39, n. 2, p. 684-690, Feb. 2007.

KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE, K.; YOON, S.H.; KIM, M.; Na, H.; PARK, S.C.; JEON, Y.S.; LEE, J.H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16*S* rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Washington, v. 62, p. 716–721, 2012.

KONONOVA, S.V.; NESMEYANOVA, M.A. Phosphonates and their degradation by microorganisms. **Biochemistry,** Washington, v. 67, n. 2, p. 184-195, 2002.

KOOPS, H.P.; POMMERENING-RÖSER, A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. **FEMS Microbiology Ecology,** Oxford, v. 37, p. 1-9, 2001.

KÖSTER, W. Iron (III) hydroxamate transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli.* **BioMetals,** v. 4, p. 23-32, 1991.

KREWULAK, K.D.; SHEPHERD, G.M.; VOGEL, H.J. Molecular dynamics simulations of the periplasmic ferric-hydroxamate dinding protein FhuD. **BioMetals,** New York, v. 18, p. 375-386, 2005.

KUENEN, J.G.; VELDKAMP, H. *Thiomicrospira pelophila*, gen. n. sp. n., a new obligately chemolithotrophic colourless sulfur bacterium. **Antonie van Leeuwenhoek,** New York, v. 38, p. 241-256, 1972.

KULAKOVA, A.N.; KULAKOV, L.A.; AKULENKO, N.V.; KSENZENKO, V.N.; HAMILTON, J.T.G.; QUINN, J.P. Structural and functional analysis of the phosphonoacetate hydrolase (*phn*A) gene region in *Pseudomonas fluorescens* 23F. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 183, n. 11, p. 3268-3275, June 2001.

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

KURAMAE, E.E.; HILLEKENS, R.H.E.; HOLLANDER, M. de; HEIJDEN, M.G.A. van der; BERG, M. van den; STRAALEN, N.M. van; KOWALCHUK, G.A. Structural and functional variation in soil fungal communities associated with litter bags containing maize leaf. **FEMS Microbiology Ecology,** Oxford, v. 84, p. 519-531, 2013.

KYSELKOVÁ, M.; KIPECKÝ, J.; FRAPOLLI, M.; DÈFAGO, G.; SÁGOVÁ-MARECKOVÁ, M.; GRUNDMANN, G.L.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. **The ISME Journal,** London, v. 3, p. 1127-1138, 2009.

LAI, W.A.; KÄMPFER, P.; ARUN, A.B.; SHEN, F.T.; HUBER, B.; REKHA, P.D.; YOUNG, C.Y. *Deinococcus ficus* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Ficus religiosa* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Washington, v. 56, n. 4, p. 787-791, Apr. 2006.

LAMBERS, H.; MOUGEL, C.; JAILLARD, B.; HINSINGER, P. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. **Plant Soil,** New York, v. 321, p. 83–115, June 2009.

LAMONT, I.L.; MARTIN, L.W. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology,** London, v. 149, n. 4, p. 833-842, Apr. 2003.

LAU, J.A.; LENNON, J. Evolutionary ecology of plant–microbe interactions: soil microbial structure alters selection on plant traits. **New Phytologist,** Lancaster, v. 192, p. 215-224, May 2011.

LAVELLE, P.; SPAIN, A.V. **Soil ecology.** Amsterdam: Kluwer Academic, 2003. 684 p.

LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GERMAN, L.A.; McCANN, J.; MARTINS, G.C.; MOREIRA, A. Soil fertility and production potential. In: LEHMANN, J; KERN, D.; GLASER, B.; WOODS, W.I. **Amazonian dark earths:** origin propierties management. New York: Springer Science, 2004. chap. 6, p. 105-124.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual.** Manhattan: Blackwell, 2006. 388 p.

LIPPA, A.M.; GOULIAN, M. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. **PLOS Genetics,** San Francisco, v. 9, n. 12, p. 1-9, Dec. 2009.

LIU, P.; WANG, X.H.; LI, J.G.; QIN, W.; XIAO, C.Z.; ZHAO, X.; JIANG, H.X.; SUI, J.K.; SA, R.B.; WANG, W.Y.; LIU, X.L. Pyrosequencing reveals fungal communities in the rhizosphere of xinjiang jujube. **BioMed Research International,** Nasr, v. 2015, p. 1-8, 2015.

LIU, Y.; ZHANG, N.; QIU, M.; FENG, H.; VIVANCO, J.M.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Enhanced rhizosphere colonization of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by pathogen infection. **FEMS Microbiology Letters,** Oxford, v. 353, n. 1, p. 49-56, Apr. 2014.

LOUGHLIN, P.; LIN, Y.; CHEN, M. Chlorophyll d and *Acaryochloris marina:* current status. **Photosynthesis Research,** New York, v. 116, p. 277-293, Oct. 2013.

LÜCKER, S.; WAGNERA, M.; MAIXNERA, F; PELLETIERB, E.; KOCHA, H.; VACHERIEB, B.; RATTEIE, T.; SINNINGHE DAMSTÉF, J.S.; SPIECKG, E.; PASLIERB, D. le; DAIMSA, H. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 107, n. 30, p. 13479-13484, July 2010.

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

LUNDBERG, D.S.; LEBEIS, S.L.; HERRERA PAREDES, S.; YOURSTONE, S.; GEHRING, J.; MALFATTI, S.; TREMBLAY, J.; ENGELBREKTSON, A.; KUNIN, V.; GLAVINA del RIO, T.; EDGAR, R.C.; EICKHORST, T.; LEY, R.E.; HUGENHOLTZ, P.; GREEN TRINGE, S.; DANGL, J.L. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature,** London, v. 488, p. 86-90, Aug. 2012.

LUO,J.; BAI, Y.; LIANG, J.; QU, J. Metagenomic approach reveals variation of microbes with arsenic and antimony metabolism genes from highly contaminated soil. **PLOS One,** San Francisco, v. 9, n. 10, p. 1-9, Oct. 2014.

LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and Soil,** New York, v. 129, p. 1-10, 1990.

LYNCH, M.D.J.; THORN, R.G. Diversity of basidiomycetes in Michigan agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 72, n. 11, p. 7050-7056, Nov. 2006.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. da S.; POMELLA, A.W.V.; deSOUZA, J.T. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* by phylloplane actinomycetes. **Biological Control,** Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 309-314, Dec. 2008.

MADARI, B.E.; SOMBROEK, W.G.; WOODS, W.I. Research on anthropogenic dark earth soils. Could it be a solution for sustainable development in the Amazon? In: GLASER, B.; WOODS, W.I. **Amazonian dark earths:** explorations in space and time. New York: Springer, 2004. chap. 21, p. 407-432.

MAIMAITI, J.; ZHANG, Y.; YANG, J.; CEN, Y.P.; LAYZELL, D.B.; PEOPLES, M.; DONG, Z. Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth. **Environmental Microbiology,** Hoboken, v. 9, n. 2, p. 435-444, Feb. 2007.

MALAMY, J.E. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. **Plant, Cell and Environment,** Hoboken, v. 28, p. 67-77, 2005.

MANGENOT, F.; DIEM, H.G. Fundamentals of biological control. In: KRUPA, S.V.; DOMMERGUES, Y.R. **Ecology of root pathogens.** Amsterdam: Elsevier, 1979. chap. 5, p. 207-265.

MARILLEY, L.; VOGT, G.; BLANC, M.; ARAGNO, M. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16*S* rDNA. **Plant and Soil,** New York, v. 198, p. 219-224, 1998.

MARQUES, A.P.G.C.; PIRES, C.; MOREIRA, H.; RANGEL, A.O.S.S.; CASTRO, P.M.L. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. **Soil Biology & Biochemistry,** Oxford, v. 42, p. 1229-1235, 2010.

MARTIKAINEN, P.J.; NURMIAHO-ASSILA, E.L. Nitrosospira, an important ammonium-oxidizing bacterium in fertilized coniferous forest soil. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 31, n. 3, p. 190-197, 1985.

MARTIN, N.I.; HU, H.; MOAKE, M.M.; CHUREY, J.J.; WHITTAL, R.; WOROBO, R.W.; VEDERAS, J.C. Isolation, structural characterization, and properties of mattacin (Polymyxin M), a ciclic peptide antibiotic produced by *Paenibacillus kobensis* M. **The Journal of Biological Chemistry,** Maryland, v. 278, n. 15, p. 13124-13132, Apr. 2003.

MASTERSON, R.V.; RUSSELL, P.R.; ATHERLY, A.G. Nitrogen fixation (*nif*) genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 152, n. 2, p 928-931, Nov. 1982.

MATSUBA, D.; TAKAZAKI, H.; SATO, Y.; TAKAHASHI, R.; TOKUYAMA, T.; WAKABAYASHI, K. Susceptibility of ammonia-oxidizing bacteria to nitrification inhibitors. **Zeitzchrift für Naturforschung. C,** Berlin, v. 58, p. 282-287, 2003.

MAVINGUI, P.; LAGUERRE, G.; BERGE, O.; HEULIN, T. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 58, n. 6, p. 1894-1903, June 1992.

MAZZOLA, M.; GU, Y.H. Wheat genotype-specific induction of soil microbial communities suppressive to disease incited by *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG)-5 and AG-8. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 92, n. 12, p. 1300-1307, July 2002.

McCLEAN, P.; KAMI, J.; PAUL, G. Genomics and genetic diversity in common bean. In: WILSON, R.F.; STALKER, H.T.; BRUMMER, E.C. **Legume crop genomics.** Champaign: AOCS Press, 2004. chap. 4, p. 60-82.

McGUIRL, M.A.; NELSON, L.K.; BOLLINGER, J.A.; CHAN, Y.K.; DOOLEY, D.M. The *nos* (nitrous oxide reductase) gene cluster from the soil bacterium *Achromobacter cycloclastes*: cloning, sequence analysis, and expression. **Journal of Inorganic Biochemistry,** Amsterdam, v. 70, p. 155-169, 1998.

McSPADDEN GARDENER, M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agriculture systems. **Phytopathology,** Saint Paul, v. 94, p. 1252-1258, 2004.

MEDINA, A.; PROBANZA, A.; GUTIERRES MAÑERO, F.J.; AZCÓN, R. Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymdine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). **Applied Soil Ecology,** Amsterdam, v. 22, p. 15-28, 2003.

MEERA, M.S.; SHIVANNA, M.B.; KAGEYAMA, K; HYAKUMACHI, MITSURO. Responses of cucumber cultivars to induction of systemic resistance against anthracnose by plant growth promoting fungi. **European Journal of Plant Pathology,** New York, v. 101, p. 421-430, Jan. 1995.

MENDES, R.; GARBEVA, P., RAAIJMAKERS, J.M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 37, p. 634-663, July 2013.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; BRUIJN, I. de; DEKKERS, E.; VOORT, M. Van Der; SCHNEIDER, J.H.M.; PICENO, Y.M.; DeSANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; BAKKER, P.A.H.M; RAAIJMAKERS, J.M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science,** Washington, v. 332, p. 1097-1100, May 2011.

METCALF, W.W.; WANNER, B.L. Mutational analysis of an *Escherichia coli* fourteen-gene operon for phosphonate degradation, using TnphoA' elements. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 175, n. 11, p. 3430-3442, June 1993.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.M., KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics,** London, v. 9, n. 386, p. 1-8, 2008.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M.A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** Washington, v. 71, n. 3, p. 413-451, Sept. 2007.

MILLER, S.I.; KIKRAL, A.M.; MEKALANOS, J.J. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 86, p. 5054-5058, July 1989.

MILLING, J.; SMALLA, K., XAIDL, F.X.; SCHLOTER, M.; MUNCH, J.C. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant and Soil,** New York, v. 266, p. 23–39, 2004.

MINERDI, D.; MORETTI, M.; GILARDL, G.; BARBERIO, C.; LODOVICA G., M.; GARIBALDI, A. Bacterial ectosymbionts and virulence silencing in a *Fusarium oxysporum* strain. **Environmental Microbiology,** Hoboken, v. 10, n. 7, p. 1725-1741, 2008.

MOHAMED, H.S.; M.H.; ALTALHI, A.D.; EL-ZAHRANI, G.S.B.; SADI, A.S. Enzymatic activities of some streptomycetes isolated from soil at Taif region. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences,** Tamilnadu, v. 4, n. 2, p. 19-32, 2015.

MONGODIN, E.F.; SHAPIR, N.; DAUGHERTY, S.C.; DEBOY, R.T.; EMERSON, J.B.; SHVARTZBEYN, A.; RADUNE, D.; VAMATHEVAN, J.; RIGGS, F.; GRINBERG, V.; KHOURI, H.; WACKETT, L.P.; NELSON, K.E.; SADOWSKY, M.J. Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. **PLOS Genetics,** San Francisco, v. 2, n. 12, p. 1-13, Dec. 2006.

MONTAGNE, M.; MARTEL, A.; MOUAL, H.L. Characterization of the catalytic activities of the PhoQ histidine protein kinase of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 183, n. 5, p. 1787-1791, Mar. 2001.

MOORE, W.E.C.; JOHNSON, J.L.; HOLDEMAN, L.V. Emendation of Bacteroidaceae and Butyrivibrio and descriptions of *Desulfomonas* gen. nov. and ten new species in the genera *Desulfomonas, Butyrivibrio, Eubacterium, Clostridium*, and *Ruminococcus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Washington, v. 26, n. 2, p. 238-252, Apr. 1976.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 729 p.

MORENO, M.V.; STENGLEIN, S.A.; PERELLÓ, A.E. *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot: a review of intraspecific genetic diversity. In: CALISKAN, M. **The molecular basis or plant genetic diversity**. Rijeka: Intech, 2012. chap. 14, p. 297-330.

MORETTI, M.; GILARDI, G.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Biological control potential of *Achromobacter xylosoxydans* for suppressing *Fusarium* wild of tomato. **International Journal of Botany,** Faisalabad, v. 4, n. 4, p. 369-375, 2008.

MOUGEL, C.; OFFRE, P.; RANJARD, L.; CORBERAND, T.; GAMALERO, E.; ROBIN, C.; LEMANCEAU, P. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. **New Phytologist,** Lancaster, v. 170, p. 165–175, 2006.

MUSE, W.B.; BENDER, R.A. The *nac* (nitrogen assimilation control) gene from *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 180, n. 5, p. 1166-1173, Mar. 1998.

NAIK, D.; RAO, M.S.; RAHIMAN, B.; NAIK, M.K. Genomics of *Pseudomonas fluorescens* and biological control of soil borne plant diseases. In: NAIK, M.K.; RANI, G.S. **Advances in soil borne plant diseases.** Delhi: Jai Bharat Printing, 2008. chap. 6, p. 143-164.

NAJIMI, M.; LEMOS, M.L.; OSORIO, C.R. Identification of siderophore biosynthesis genes essential for growth of *Aeromonas salmonicida* under iron limitation conditions. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 74, n. 8, p. 2341-2348, Feb. 2008.

NAKAGAWA, T.; STAHL, D.A. Transcriptional response of the archaeal ammonia oxidizer *Nitrosopumilus maritimus* to low and environmentally relevant ammonia concentrations. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 79, n. 22, p. 6911-6916, Aug. 2013.

NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; SATO, S.; MIMURO, M.; MIYASHITA, H.; TSUCHIYA, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; KAWASHIMA, K.; KISHIDA, Y.; KIYOKAWA, C.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; TAKEUCHI, C.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. **DNA Research,** Oxford, v. 10, n. 4, p. 137-145, Aug. 2003.

NANDA, S.; SAHU, S.S. Biodegradability of polyethylene by *Brevibacillus, Pseudomonas,* and *Rhodococcus* spp. **New York Science Journal,** New York, v. 3, n. 7, p. 95-98, 2010.

NÁPOLES V., S.; SERRAT D., M.; ORTEGA D., E.; RAMOS B., H.; ORBERÁ R., T. Efectos de *Brevibacillus bortelensis* B65 sobre la germinación y el desarrollo de posturas de hortalizas en fase de semillero. **Cultivos Tropicales,** San José de las Lajas, v. 35, n. 3, p. 17-23, 2014.

NARIKAWA, R.; NAKAJIMA, T.; AONO, Y.; FUSHIMI, K.; ENOMOTO, G.; WIN, N.N.; ITOH, I.; SATO, M.; IKEUCHI, M. A biliverdin-binding cyanobacteriochrome from the chlorophyll d–bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. **Scientific Reports,** London, v. 5, n. 7950, p. 1-10, 2015.

NAVARRETE, A.A.; CANNAVAN, F.S.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different Amazonian agricultural model systems. **Diversity,** Basel, v. 2, p. 787-809, May 2010.

NEILANDS, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **The Journal of Biological Chemistry,** Maryland, v. 270, n. 45, p. 26723-26726, 1995.

NELSON, D.M.; CANN, I.K.O.; MACKIE, R.I. Response of Archaeal Communities in the rhizosphere of maize and soybean to elevated atmospheric CO_2 concentrations. **PLOS One,** San Francisco, v. 5, n. 12, p. 1-10, 2010.

NELSON, E.B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 42, p. 271-309, 2004.

NEVES, E.G.; PETERSEN, J.B.; BARTONE, R.N.; SILVA, C.A. da. Historical and socio-cultural origins of Amazonian dark earths. In: LEHMANN, J; KERN, D.; GLASER, B.; WOODS, W.I. **Amazonian dark earths:** origin properties management. New York: Springer Science, 2004. chap. 3, p. 29-50.

NGUYEN, X.H.; NAING, K.W.; LEE, Y.S.; JUNG, W.J.; ANEES, M.; KIM, K.Y.Antagonistic potential of *Paenibacillus elgii* HOA73 against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Nematology,** Leiden, v. 15, n. 8, p. 991-1000, 2013.

NICOL, G.W.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Molecular analysis of methanogenic archaeal communities in managed and natural upland pasture soils. **Global Change Biology,** Hoboken, v. 9, p. 1451-1457, 2003.

NIEDERBERGER, T.D.; MCDONALD, I.R.; HACKER, A.L.; SOO, R.M.; BARRETT, J.E.; WALL D.H.; CARY S.C. Microbial community composition in soils of Northern Victoria Land, Antarctica. **Environmental Microbiology,** Hoboken, v. 10, n. 7, p. 1713-1724, July 2008.

NIELSEN, P.; SØRENSEN, J. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology,** Oxford, v. 22, n. 3, p. 183-192, Mar. 1997.

NIHORIMBERE, V.; ONGENA, M.; SMARGIASSI, M.; THONART, P. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment,** Gembloux, v. 15, n. 2, p. 327-337, 2011.

NONOMURA, H.; OHARA, Y. Distribution of actinomycetes in soil. VII. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil (Part 2). Classification of the isolates. **Journal of Fermentation Technology,** Amsterdam, v. 47, p. 701-709, 1969.

NOWROUSIAN, M.; STAJICH, J.E.; CHU, M.; ENGH, I.; ESPAGNE, E.; HALLIDAY, K.; KAMEREWERD, J.; KEMPKEN, F.; KNAB, B.; KUO, H.C.; OSIEWACZ, H.D.; PÖGGELER, E.; READ, N.D.; SEILER, S.; SMITH, K.M.; ZICKLER, D.; KÜCK, U.; FREITAG, M. De novo assembly of a 40 Mb eukaryotic genome from short sequence reads: *Sordaria macrospora*, a model organism for fungal morphogenesis. **PLOS Genetics,** San Francisco, v. 6, n. 4, p. 1-22, 2010.

NUGROHO, R.A.; RÖLING, W.F.M.; LAVERMAN, A.M.; VERHOEF, H.A. Net nitrification rate and presence of *Nitrosospira* cluster 2 in acid coniferous forest soils appear to be tree species specific. **Soil Biology & Biochemistry,** Oxford, v. 38, p. 1166-1171, 2006.

O'NEILL, B.; GROSSMAN, J.M.; TSAI, M.T.; GOMES, J.E. LEHMANN, J.; PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J.E. Bacterial community composition in Brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Microbial Ecology,** New York, v. 58, p. 23-35, 2009.

OBERÁ R., T.M.; YANO, R.; RODRÍGUEZ G., O.; SEGAL F., E.I.; SERRAT D., M.J.; BARBOSA, H.R. Isolation and characterisation of aerobic endospore forming Bacilli from sugarcane rhizosphere for the selection of strains with agriculture potentialities. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** New York, v. 28, n. 4, p. 1593-1603, Apr. 2012.

OBLESSUC, P.R.; BORGES, A.; CHOWDHURY, B.; CALDAS, D.G.G.; TSAI, S.M.; CAMARGO, L.E.A.; MELOTTO, M. Dissecting *Phaseolus vulgaris* innate immune system against *Colletotrichum lindemuthianum* infection. **PLOS One,** San Francisco, v. 7, n. 8, p. 1-14, Aug. 2012.

OFFRE, P.; SPANG, A.; SCHLEPER, C. Archaea in biogeochemical cycles. **Annual Review of Microbiology,** Palo Alto, v. 57, p. 437-457, 2013.

OKUBO, Y.; INOUE, T. YOKOTA, K. Estimating bioavailability of soil particulate phosphorus to *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology,** New York, v. 24, n. 6, p. 1503-1507, Dec. 2012.

OLIVEIRA, E.J. de; RABINOVITCH, L.; MONNERAT, R.G.; PASSOS, L.K.J.; ZAHNER, V. Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 70, n. 11, p. 6657-6664, Nov. 2004.

OROLAZA, N.P.; LAMARI, L.; BALLANCE, G.M. Evidence of host-specific chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot of wheat. **The American Phytopathological Society,** Saint Paul, v. 85, n. 10, p. 1282-1291, 1995.

ORR, C.H.; STEWART, C.J.; LEIFERT, C.; COOPER, J.M.; CUMMINGS, S.P. Effect of crop management and sample year on abundance of soil bacterial communities in organic and conventional cropping systems. **Journal of Applied Microbiology,** Hoboken, Apr. 2015. doi: 10.1111/jam.12822

PALANIYANDI, S.A.; YANG, S.H.; SUH, J.W. Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. **Journal of Applied Microbiology,** Hoboken, v. 115, n. 1, p. 207-217, July 2013.

PANDEY, A.; PALNI, L.M.S. *Bacillus* species: the dominant bacteria of the rhizosphere of established tea bushes. **Microbiological Research,** Amsterdam, v. 152, p. 359-365, 1997.

PARKS, D.H.; BEIKO, R.G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics,** London, v. 26, p. 715-721, 2010.

PARRO, V.; MORENO-PAZ, M. Gene function analysis in environmental isolates: The *nif* regulon of the strict iron oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 100, n. 13, p. 7883-7888, June 2003.

PASSEL, M.W.J. van; KANT, R.; PALVA, A.; COPELAND, A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; RIO, T.G. del; PITLUCK, S.; GOLTSMAN, E.; CLUM, A.; SUN, H.; SCHMUTZ, J.; LARIMER, F.W.; LAND, M.L.; HAUSER, L.; KYRPIDES, N.; MIKHAILOVA, N.; RICHARDSON, P.P.; JANSSEN, P.H.; VOS, W.M. de; SMIDT, H. Genome Sequence of the verrucomicrobium *Opitutus terrae* PB90-1, an abundant inhabitant of rice paddy soil ecosystems. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 193, n. 9, p. 2367-2368, May 2011.

PATHANIA, A.; SHARMA, S.K.; HARMA, P.N. Common bean. In: SINGH, M; SINGH BISHT, I.; DUTTA, M. **Broadening the genetic base of grain legumes.** New York: Springer, 2014. chap. 2, p. 11-50.

PATIL, J.; BAJEKAL, S. Diversity of hydrolytic enzymes in haloalkaliphilic archaea isolated from Lonar Lake. **International Journal of Scientific Research,** Ahmedabad, v. 2, n. 7, p. 414-415, July 2013.

PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; YEOH, Y.K.; PINAKI K., N.R.; LONHIENNE, T.G.A.; ROBINSON, N.; HUGENHOLTZ, P.; RAGAN, M.A.; SCHMIDT, S. Nitrogen fertilizer dose alters fungal communities in sugarcane soil and rhizosphere. **Scientific Reports,** London, v. 5, n. 8678, p. 1-6, 2015.

PAZINATO, J.M.; PAULO, E.N.; MENDES, L.W.; VAZOLLER, R.F.; TSAI, S.M. Molecular characterization of the archaeal community in an Amazonian wetland soil and culture-dependent isolation of methanogenic archaea. **Diversity,** Basel, v. 2, p. 1026-1047, 2010.

PEIX, A., MATEOS, P.F., RODRIGUEZ-BARRUECO, C., MARTINEZ-MOLINA, E., VELAZQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry,** Oxford, v. 33, 1927–1935, 2001.

PENA-CABRIALES, J.J.; ALEXANDER, M. Growth of *Rhizobium* in soil amended with organic matter. **Soil Science Society of America Journal,** Madison, v. 47, n. 2, p. 241-245, 1983.

PEREIRA, L.; VICENTINI, R.; OTTOBONI, L.M.M. Changes in the bacterial community of soil from a neutral mine drainage channel. **PLOS One,** San Francisco, v. 9, n. 5, p. 1-10, May 2014.

PESTER, M.; SCHLEPER, C.; WAGNER, M. The *Thaumarchaeota*: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. **Current Opinion in Microbiology,** Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 300-306, June 2011.

PHI, Q.T.; PARK, Y.M.; RYU, C.M.; PARK, S.H.; GHIM, S.Y. Functional identification and expression of indole-3-pyruvate decarboxylase from *Paenibacillus polymyxa* E681. **Journal of Microbiology and Biotechnology,** Seoul, v. 18, n. 7, p. 1235-1244, 2008.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J.M.; LEMANCEAU, P.; PUTTEM, W.H. van der. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, n. 11, p. 789–799, Sept. 2013.

PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The rhizosphere biochemistry and organic substances at soil-plant interface.** 2nd ed. New York: CRC Press, 2007. 447 p.

PIRE, C.; MARTÍNEZ-ESPINOSA, R.M.; PÉREZ-POMARES, E.; ESCLAPEZ, J.; BONETE, M.J. Ferredoxin-dependent glutamate synthase involvement in ammonium assimilation in *Haloferax mediterranei*. **Extremophiles,** New York, v. 18, p. 147-159, 2014.

POPLAWSKI, A.B.; MÅRTENSSON, L.; WARTIAINEN, I.; RASMUSSEN, U. Archaeal diversity and community structure in a Swedish barley field: specificity of the EK510R/(EURY498) 16*S* rDNA primer. **Journal of Microbiological Methods,** Amsterdam, v. 69, p. 161-173, 2007.

POSADA, D.; CRANDALL, K. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics,** London, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

PRASANNA, R.; KUMAR, V.; KUMAR, S.; KUMAR YADAV, A.; TRIPATHI, U.; SUMAR SINGH, A.; JAIN, M.C.; GUPTA, P.; SINGH, P.K.; SETHUNATHAN, N. Methane production in rice soil is inhibited by *Cyanobacteria*. **Microbiological Research,** Amsterdam, v. 157, p. 1-6, 2002.

PRATSCHER, J.; DUMONT, M.G.; CONRAD, R. Ammonia oxidation coupled to CO_2 fixation by Archaea and bacteria in an agricultural soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 108, n. 10, p. 4170-41-75, Mar. 2011.

PRESTON, C.M.; WU, K.Y.; MOLINSKI, T.F.; DeLONG, E.F. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 93, n. 13, p. 6241-6246, June 1996.

QAISRANI, M.M.; MIRZA, M.S.; ZAHEER, A.; MALIK, K.A. Isolation and identification by 16*S* rRNA sequence analysis of *Achromobacter*, *Azospirillum* and *Rhodococcus* strains from the rhizosphere of maize and screening for the beneficial effect on plant growth. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences,** Faisalabad, v. 51, n. 1, p. 91-99, 2014.

QIN, Q.L.; ZHANG, X.Y; WANG, X.M.; LIU, G.M.; CHEN, X.L.; XIE, B.B.; DANG, H.Y.; ZHOU, B.C.; YU, J.; ZHANG, Y.Z. The complete genome of *Zunongwangia profunda* SM-A87 reveals its adaptation to the deep-sea environment and ecological role in sedimentary organic nitrogen degradation. **BMC Genomics,** London, v. 11, n. 247, p. 1-10, 2010.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.H.; XU, L.H.; LI, W.J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology,** New York, v. 89, p. 457-473, 2011.

QUADROS, P.D. de; ZHALNINA, K.; DAVIS-RICHARDSON, A.; FAGEN, J.R.; DREW, J.; BAYER, C.; CAMARGO, F.A.O.; TRIPLETT, E.W. The effect of tillage system and crop rotation on soil microbial diversity and composition in a subtropical Acrisol. **Diversity,** Basel, v. 4, n. 4, p. 375-395, 2012.

QUECINE, M.C.; ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; GAI, C.S.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. **Letters in Applied Microbiology,** Hoboken, v. 47, n. 6, p. 486-491, Dec. 2008.

RAAIJMAKERS, J.M.; VLAMI, M.; SOUZA, J.T. de. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek,** New York, v. 81, p. 537–547, 2002.

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; BRUIJN, F.J. de. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKKERMANS, A.D.L., ELSAS, J.D. van; BRUIJN, J.D. de. **Molecular microbial ecology manual**, Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. Chap. 3.4.3, p. 1-26.

RAMETTE, A.; FRAPOLLI, M.; FISCHER-LE SAUX, M.; GRUFFAZ, C.; MEYER, J.M.; DÉFAGO, G.; SUTRA, L., MOËNNE-LOCCOZ, Y. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. **Systematic and Applied Microbiology,** Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 180-188, May 2011.

RAMOS, B.; POZUELO, J.M.; ACERO, N.; GUTIÉRREZ MAÑERO, F.J. Seasonal variations of *Bacillus* isolated from the rhizosphere of *Elaeagnus angustifolia* L. **Orsis,** Harrogate, v. 13, p. 7-16, 1998.

RANA, S.; SALAM, M.D. Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from soil samples of Punjab, India. **Journal of Microbiology & Experimentation,** Edmond, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2014.

RAZA, W.; YANG, W.; SHEN, Q.R. *Paenibacillus polymyxa:* antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. **Journal of Plant Pathology,** Bari, v. 90, n. 3, p. 419-430, 2008.

REDECKER, D.; SCHÜSSLER, A.; STOCKINGER, H.; STÜRMER, S.L.; MORTON, J.B.; WALKER, C. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). **Mycorriza,** New York, v. 23, n. 7, p. 515-531, Oct. 2013.

REINOSO P., Y. Aislamiento, selección e identificación de bactérias de los géneros *Bacillus, Brevibacillus* e *Paenibacillus* con potencialidades para el control biológico de bactérias y hongos fitopatógenos del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). **Fitosanidad,** La Habana, v. 11, n. 1, 1 p., Mar. 2007.

RENGEL, Z.; ROSS, G.; HIRSCH, P. Plant genotype and micronutrient status influence colonization of wheat roots by soil bacteria. **Journal of Plant Nutrition,** Georgia, v. 21, n. 1, p. 99-113, 1998.

ROCHA, U.N. da; PLUGGE, C.M.; GEORGE, I.; ELSAS, J.D. van; OVERBEEK, L.S. van. The rhizosphere selects for particular groups of acidobacteria and verrucomicrobia. **PLOS One,** San Francisco, v. 8, n. 12, p. 1-10, Dec. 2013.

ROHRBACH, M.R.; BRAUN, V.; KÖSTER, W. Ferrichrome transport in Escherichia coli K-12: altered substrate specificity of mutated periplasmic FhuD and interaction of FhuD with the integral membrane protein FhuB. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 177, n. 24, p. 7186-7193, Dec. 1995.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.; TESLENKO, M. **MrBayes version 3.2 manual:** tutorials and model summaries. [s.l.: s.n.], 2011, 172 p.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 64, n. 8, p. 2770-2779, June 1998.

ROSENCRANTZ, D.; RAINEY, F.A.; JANSSEN, P.H. Culturable populations of *Sporomusa* spp. and *Desulfovibrio* spp. in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 65, n. 8, p. 3526-3533, Aug. 1999.

ROSSMAN, A.Y.; SEIFERT, K.A.; SAMUELS, G.J.; MINNIS, A.M.; SCHROERS, H.J.; LOMBARD, L.; CROUS, P.W.; PÕLDMAA, K.; CANNON, P.F.; SUMMERBELL, R.C.; GEISER, D.M: ZHUANG, W.Y.; HIROOKA, Y.; HERRERA, C.; SALGADO-SALAZAR, C.; CHAVERRI, P. Genera in *Bionectriaceae, Hypocreaceae,* and *Nectriaceae* (Hypocreales) proposed for acceptance or rejection. **IMA Fungus,** Surrey, v. 4, n. 1, p. 41-51, July 2013.

ROY, N.; HABIB M., R. Isolation and characterization of xylanase producing strain of *Bacillus cereus* from soil. **Iranian Journal of Microbiology,** Tehran, v. 1, n. 2, p. 49-53, 2009.

RUBIO, L.M.; RANGARAJ, P.; HOMER, M.J.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Cloning and mutational analysis of the gamma gene from *Azotobacter vinelandii* defines a new family of proteins capable of metallocluster binding and protein stabilization. **The Journal of Biological Chemistry,** Maryland, v. 277, p. 14299-14305, Apr. 2002.

RUIVO, M.L.P.; AMARANTE, C.B. do; OLIVERIRA, M.L.S.; MUNIZ, I.C.M.; SANTOS, D.A.M. dos. Microbial population and biodiversity in Amazonian dark earth soils. In: WOODS, W.I.; TEIXEIRA, W.G.; LEHMANN, J.; STEINER, C.; WinklerPrins, A.M.G.A.; REBELLATO, L. **Amazonian dark earths:** Wim Sombroek's vision. New York: Springer Sciene, 2009. chap. 19, p. 351-362.

RYAN, R.P.; MONCHY, S.; CARDINALE, M.; TAGHAVI, S.; CROSSMAN, L.; AVISON, M.B.; BERG, G.; LELIE, D. van der; DOW, J.D. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. **Nature Reviews Microbiology,** London, v. 7, p. 514-525, July 2009.

RYU, R.J.; PATTEN, C.L. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 190, n. 21, p. 7200-7208, Nov. 2008.

SACHOW, C.; MÜLLER, H.; TILCHER, R.; BERG, G. Differences between the rhizosphere microbiome of *Beta vulgaris* ssp. *maritima*—ancestor of all beet crops—and modern sugar beets. **Frontiers in Microbiology,** Lausanne, v. 5, n. 415, p. 1-13, Aug. 2014.

SAKAKIBARA, H.; WATANABE, M.; HASE, T.; SUGIYAMA, T. Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf. **The Journal of Biological Chemistry,** Maryland, v. 266, n. 4, p. 2028-2035, 1991.

SALGADO, M.O.; SCHWARTZ, H.F.; BRICK, M.A. Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 19, p. 279-281, 1995.

SÁNCHEZ, A.; ECHÁVEZ-BADEL, R.; HEPPERLY, P.R.; SCHRÖDER, E.C. Inoculated common bean are protected against *Macrophomina phaseolina* by *Burkholderia cepacia* UPR 5C. **Plant and Soil,** New York, v. 162, p. 293-297, 1994.

SANGABRIEL-CONDE, W.; MALDONADO-MENDOZA, I.E.; MANCERA-LÓPEZ, M.E.; CORDERO-RAMÍREZ, J.D.; TREJO AGUILAR, D.; NEGRETE-YANKELEVICH, S. *Glomeromycota* associated with Mexican native maize landraces in Los Tuxtlas, Mexico. **Applied Soil Ecology,** Amsterdam, v. 87, p. 63-71, Oct. 2014.

SANGAL, V.; JONES, A.L.; GOODFELLOW, M.; HOSKISSON, P.A.; KÄMPFER, P.; SUTCLIFFE, I.C. Genomic analyses confirm close relatedness between *Rhodococcus defluvii* and *Rhodococcus equi* (*Rhodococcus hoagii*). **Archives of Microbiology,** Braunschweig, v. 197, n. 1, p. 113-116, Nov. 2014.

SANGWAN, P.; CHEN, X.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P.H. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov. the first pure-culture representative of subdivision two, *Spartobacteria* classis nov., of the phylum *Verrucomicrobia*. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 70, n. 10, p. 5875-5881, Oct. 2004.

SANTALLA, M.; RODIÑO, A.P.; RON, A.M. De. Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for the common bean. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 104, p. 934-944, Feb. 2002.

SANTOS, P.C. dos; DEAN, D.R.; HU, Y.; RIBBE, M.W. Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. **Chemical Reviews,** Champaign, v. 104, n. 2, p. 1159-1174, 2004.

SAW, J.H.W.; SCHATZ, M.; BROWN, M.V.; KUNKEL, D.D.; FOSTER, J.S.; SHICK, H.; CHRISTENSEN, S.; HOU, S.; WAN, H.; DONACHIE, S.P. Cultivation and complete genome sequencing of *Gloeobacter kilaueensis* sp. nov., from a lava cave in Kīlauea Caldera, Hawai'i. **PLOS One,** San Francisco, v. 8, n. 10, p. 1-12, Oct. 2013.

SCHERR, K.E.; LUNDAA, T.; KLOSE, V.; BOCHMANN, G.; LOIBNER, A.P. Changes in bacterial communities from anaerobic digesters during petroleum hydrocarbon degradation. **Journal of Biotechnology,** Amsterdam, v. 157, n. 4, p. 564-572, Feb. 2012.

SCHLEPER, C. Ammonia oxidation: different niches for Bacteria and Archaea? **The ISME Journal,** London, v. 4, p. 1092-1094, July 2010.

SCHLEPER, C.; WOLBEN, W.; KLENK, H.P. Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 63, n. 1, p. 321-323, Jan. 1997.

SCHLESNER, H.; JENKINS, C.; STALEY, J.T. The phylum verrucomicrobia: a phylogenetically heterogeneous bacterial group. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The prokaryotes**. New York: Springer, 2006. v. 7, p. 881-896.

SCHMALENBERGER, A.; TEBBE, C.C. Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. **FEMS Microbiolgy Ecology,** Oxford, v. 40, p. 29-37, 2002.

SCHMID, B.; RIBBE, M.W.; EINSLE, O.; YOSHIDA, M.; THOMAS, L.M.; DEAN, D.R.; REES, D.C.; BURGESS, B.K. Structure of a cofactor-deficient nitrogenase MoFe protein. **Science,** Washington, v. 296, p. 352-356, Apr. 2002.

SCHREITER, S.; DING, G.C.; HEUER, H.; NEUMANN, G.; SANDMANN, M.; GROSCH, R.; KROPF, S.; SMALLA, K. Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. **Frontiers in Microbiology,** Lausanne, v. 5, p. 1-13, Apr. 2014.

SCHWACHA, A.; BENDER, R.A. The *nac* (nitrogen assimilation control) gene from *Klebsiella arogenes*. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 175, n. 7, p. 2107-2115, Apr. 1993.

SEBULSKY, M.T.; HOHNSTEIN, D.; HUNTER, M.D.; HEINRICHS, D.E. Identification and characterization of a membrane permease involved in iron-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 182, n. 16, p. 4394-4400, Aug. 2000.

SELDIN, L.; ROSADO, A.S.; CRUZ, D.W. da; NOBREGA, A.; ELSAS, J.D. van; PAIVA, E. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 64, n. 10, p. 3860-3868, Oct. 1998.

SELIM, S.; NEGREL, J.; GOVAERTS, C.; GIANINAZZI, S.; TUINEN, D. van. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 isolated from the sorghum mycorrhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 71, n. 11, p. 6501-6507, Nov. 2005.

SENEVIRATNE, G.; WEERASEKARA, M.L.M.A.W.; ZAVAHIR, J.S. Microbial biofilms: How effective in *Rhizobium*-legume symbiosis? In: SAGHIR KHAN, M.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. **Microbes for legume improvement.** Pondicherry: Springer, 2010. chap. 6, p. 123-136.

SHARMA, S.B.; SAYYED, R.Z.; TRIVEDI, M.H.; GOBI, T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus,** Cham, v. 2, n. 587, p. 1-12, 2013.

SHEE, P.N.G.; PALOMBO, E.A.; BHAVE, M. The heavy metal tolerant soil bacterium *Achromobacter* sp. AO22 contains a unique copper homeostasis locus and two *mer* operons. **Journal of Microbiology and Biotechnology,** Seoul, v. 22, n. 6, p. 742-753, 2012.

SHIDA, O.; TAKAGI, H.; KADOWAKI, K.; KOMAGATA, K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology,** London, v. 46, n. 4, p. 939-946, 1996.

SHRIVASTAVA, S.; D'SOUZA, S.F.; DESAI, P.D. Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*Kitasatospora* sp.) for soil applications. **Current Science,** Bengaluru, v. 94, n. 12, p. 1595-1604, June 2008.

SICILIANO, S.D.; THEORET, C.M.; FREITAS, J.R. de; GERMIDA, J.J. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. **Canadian Journal of Microbiology,** Ottawa, v. 44, p. 844-851, 1998.

SIDDIQUI, Z.A. **PGPR:** biocontrol and biofertilization. Amsterdam: Springer, 2006. 318 p.

SIEGL, A.; KAMKE, J.; HOCHMUTH, T.; PIEL, J.; RICHTER, M.; LIANG, C.; DANDEKAR, T.; HENTSCHEL, U. Single-cell genomics reveals the lifestyle of Poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. **The ISME Journal,** London, v. 5, n. 1, p. 61-70, Jan. 2011.

SILVA, K. da; CASSETARI, A.S.; LIMA, A.S.; BRANDT, E. de; PINNOCK, E.; VANDAMME, P.; MOREIRA, F.M.S. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and Applied Microbiology,** Amsterdam, v. 35, p. 253-262, 2012.

SIMON, H.M.; DODSWORTH, J.A.; GOODMAN, R.M. *Crenarchaeota* colonize terrestrial plant roots. **Environmental Microbiology,** Hoboken, v. 2, n. 5, p. 495-505, Oct. 2000.

SINGH, M; SINGH BISHT, I.; DUTTA, M. **Broadening the genetic base of grain legumes.** New York: Springer, 2014. 215 p.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo:** fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC; ESAL, FAEPE; ABEAS, 1988. 236 p.

SLIWINSKI, M.K.; GOODMAN, R.M. Comparison of crenarchaeal consortia inhabiting the rhizosphere of diverse terrestrial plants with those in bulk soil in native environments. **Applied and Environmental Microbiology,** Hoboken, v. 70, n. 3, p. 1821-1826, Mar. 2004.

SMITH, K.P.; HANDELSMAN, J.O.; GOODMAN, R.M. Genetic basis in plants for interactions with disease suppressive bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 96, p. 4786-4790, Apr. 1999.

SMITH, S.E.; JAKOBSEN, I.; GRØNLUND, M.; SMITH, F.A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: Interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. **Plant Physiology,** Rockville, v. 156, p. 1050-1057, July 2011.

SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. ***Rhizoctonia* species:** taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Amsterdam: Springer Science, 1996. 578 p.

SOMBROEK, W.; KERN, D.; RODRIGUES, T.; CRAVO, M. da S.; CUNHA, T.J.F.; WOODS, W.; GLASER, B. Terra preta e terra mulata: suas potencialidades agrícolas, suas sustentabilidades e suas reproduções. In: TEIXEIRA, W.G.; KERN, D.C.; MADARI, B.E.; LIMA, H.N.; WOODS, W. (Ed.). **As terras pretas de índio da Amazônia:** sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. p. 251-257.

SOMBROEK, W.; RUIVO, M.L.; FEARNSIDE, P.M.; GLASER, B.; LEHMANN, J. Amazonian dark earths as carbon stores and sinks. In: LEHMANN, J; KERN, D.; GLASER, B.; WOODS, W.I. **Amazonian dark earths:** origin propierties management. New York: Springer Science, 2004. chap. 7, p. 125-140.

SOMEYA, N.; IKEDA, S; MOROHOSHI, T.; TSUJIMOTO, M.N.; YOSHIDA, T; SAWADA, H.; IKEDA, T.; TSUCHIYA, K. Diversity of culturable chitinolytic bacteria from rhizospheres of agronomic plants in Japan. **Microbes and Environments,** Tsukuba, v. 26, n. 1, p. 7-14, 2011.

SOUZA, R.C. de; HANADA, R.E.; CANNAVAN, F.; TSAI, S.M. Estrutura das comunidades bacterianas em rizosfera de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. de terra preta da Amazônia. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 3., 2013, Recife. **Resumos...** Recife: IPA, 2013. n. 243, 5 p.

SOUZA, R.C.; CANTÃO, M.E.; VASCONCELOS, A.T.R.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. **Applied Soil Ecology,** Amsterdam, v. 72, p. 49-61, 2013.

SOUZA, V.; BAIN, J.; SILVA, C.; BOUCHET, V.; VALERA, A.; MARQUEZ, E.; EGUIARTE, L.E. Ethnomicrobiology: Do agricultural practices modify the populations structure of the nitrogen fixing bacteria *Rhizobium etli* biovar *phaseoli*? **Journal of Ethnobiology,** Tacoma, v. 17, n. 2, p. 249-266, 1997.

SOUZA, V.; EGUIARTE, L.; AVILA, G.; CAPPELLO, R.; GALLARDO, C.; MONTOYA, J.; PIÑERO, D. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 60, n. 4, p. 1260-1268, Apr. 1994.

STANBROUGH, R.; CHUABOONMEE, S.; PALOMBO, E.A.; MALHERBE, F.; BHAVE, M. Heavy metal phytoremediation potential of a heavy metal resistant soil bacterial isolate, *Achromobacter* sp. strain AO22. **APCBEE Procedia,** Amsterdam, v. 5, p. 502-507, 2013.

SUMMERELL, B.A.; BURGESS, L.W. Factors influencing survival of *Pyrenophora tritici-repentis:* stubble management. **Mycological Research,** Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 38-40, July 1989.

SUN, M.L.; LIU, S.B.; QIAO, L.P.; CHEN, X.L.; PANG, X.; SHI, M.; ZHANG, X.Y.; QIN, Q.L.; ZHOU, B.C., ZHANG, Y.Z., XIE, B.B. A novel exopolysaccharide from deep-sea bacterium *Zunongwangia profunda* SM-A87: low-cost fermentation, moisture retention, and antioxidant activities. **Applied Microbiology and Biotechnology,** New York, v. 98, n. 17, p. 7437-7445, Sept. 2014.

SWINGLEY, W.D.; CHEN, M.; CHEUNG, P.C.; CONRAD, A.L.; DEJESA, L.C.; HAO, J.; HONCHAK, B.M.; KARBACH, L.E.; KURDOGLU, A.; LAHIRI, S.; MASTRIAN, S.D.; MIYASHITA, H.; PAGE, L.; RAMAKRISHNA, P.; SATOH, S.; SATTLEY, W.M.; SHIMADA, Y.; TAYLOR, H.L.; TOMO, T.; TSUCHIYA, T.; WANG, Z.T.; RAYMOND, J.; MIMURO, M.; BLANKENSHIP, R.E.; TOUCHMAN, J.W. Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll d-producing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 105, n. 6, p. 2005-2010, Feb. 2008.

SYLVIA, D.; FUHRMANN, J.; HARTEL, P.; ZUBERER, D. **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Pearson Education, 2005. 517 p.

TAKEBE, T.; HIROTA, K.; NODASAKA, Y.; YUMOTO, I. *Brevibacillus nitrificans* sp. nov., a nitrifying bacterium isolated from a microbiological agent for enhancing microbial digestion in sewage treatment tanks**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** Washington, v. 62, n. 9, p. 2121-2126, 2011.

TAKEUCHI, K.; NODA, N.; SOMEYA, N. Complete genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas protegens* Cab57 discovered in Japan reveals strain-specific diversity of this species. **PLOS One,** San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1-13, Apr. 2014.

TALARICO, L.A.; INGRAM, L.O.; MAUPIN-FURLOW, J.A. Production of the gram-positive *Sarcina ventriculi* pyruvate decarboxylase in *Escherichia coli*. **Microbiology,** London, v. 147, p. 2425-2435, 2001.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution,** Oxford, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, Oct. 2013.

TAWARAYA, K.; HORIE, R.; SAITO, S.; WAGATSUMA, T.; SAITO, K.; OIKAWA, A. Metabolite profiling of root exudates of common bean under phosphorus deficiency. **Metabolites,** Beijing, v. 9, p. 599-611, 2014.

TAYLOR, A.E.; ZEGLIN, L.H.; DOOLEY, S.; MYROLD, D.D.; BOTTOMLEY, P.J. Evidence for different contributions of Archaea and bacteria to the ammonia-oxidizing potential of diverse Oregon soils. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 76, n. 23, p. 7691-7698, Dec. 2010.

TEIXEIRA, W.G.; MARTINS, G.C. Soil physical characterization. In: LEHMANN, J; KERN, D.; GLASER, B.; WOODS, W.I. **Amazonian dark earths:** origin propierties management. New York: Springer Science, 2004. chap. 15, p. 271-286.

TEZCAN, F.A.; KAISER, J.T.; MUSTAFI, D.; WALTON, M.Y.; HOWARD, J.B.; REES, D.C. Nitrogenase complexes: multiple docking sites for a nucleotide switch protein. **Science,** Washington, v. 309, p. 1377-1380, Aug. 2005.

THEODORAKOPOULOS, N.; BACHAR, D.; CHRISTEN, R.; ALAIN, K.; CHAPON, V. Exploration of *Deinococcus-thermus* molecular diversity by novel group-specific PCR primers. **Microbiology Open,** Hoboken, v. 2, n. 5, p. 862-872, Oct. 2013.

THULER, D.S.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; BARBOSA, H.R. *Beijerinckia derxii* releases plant growth regulators and amino acids in synthetic media independent of nitrogenase activity. **Journal of Applied Microbiology,** Hoboken, v. 95, n. 4, p. 799-806, 2003.

TIMONEN, S.; BOMBERG, M. Archaea in dry soil environments. **Phytochemistry Reviews,** New York, v. 8, n. 3, p. 505-518, 2009.

TORRES, A.R.; CURSINO, L; MURO-ABAD, J.I.; GOMEZ, E.A.; ARAÚJO, E.F. de; HUNGRIA, M; CASSINI, S.T.A. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from the state of Minas Gerais, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo, v. 40, p. 852-856, 2009.

TSAI, S.M.; O'NEILL, B.; CANNAVAN, F.S.; SAITO, D.; FALCÃO, N.P.S.; KERN, D.C.; GROSSMAN, J.; THIES, J. The microbial world of terra preta. In: WOODS, W.I.; TEIXEIRA, W.G.; LEHMANN, J.; STEINER, C.; WINKLERPRINS, A.M.G.A.; REBELLATO, L. **Amazonian dark earths:** Wim Sombroek's vision. New Yor: Springer Sciene, 2009. chap. 15, p. 299-308.

TURNER, T.R.; JAMES, E.K.; POOLE, P.S. The plant microbiome. **Genome Biology**, London, v. 14, n. 209, p. 1-10, 2013.

VELÁSQUEZ-SEPÚLVEDA, I.; OROZCO-MOSQUEDA, M.C.; PRIETO-BARAJAS, C.M.; SANTOYO, G. Bacterial diversity associated with the rhizosphere of wheat plants (*Triticum aestivum*): toward a metagenomic analysis. **Phyton,** Buenos Aires, v. 81, p. 81-87, 2012.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J. Genomic fingerprintig of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology,** New York, v. 5, p. 25-40, 1994.

VIDYALAKSHMI, R.; PARANTHAMAN, R.; BHAKYARAJ, R. Sulphur oxidizing bacteria and pulse nutrition: a review. **World Journal of Agricultural Sciences,** Dubai, v. 5, n. 3, p. 270-278, 2009.

VIEBAHN, M.; VEENMAN, C.; WERNARS, K.; LOON, L.C. van; SMIT, E.; BAKKER, P.A.H.M. Assessment of differences in ascomycete communities in the rhizosphere of field-grown wheat and potato. **FEMS Microbiology Ecology,** Oxford, v. 53, p. 245-253, 2005.

VILAIN, S.; LUO, Y.; HILDRETH, M.B.; BRÖZEL, V.S. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 72, n. 7, p. 4970-4977, July 2006.

VIVAS, A.; BAREA, J.M.; AZCÓN, R. Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae,* both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. **Environmental Pollution,** Amsterdam, v. 134, p. 257-266, 2005.

VORHOLT, J.A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews**, London, v. 10, p. 828-840, Dec. 2012.

VOULHOUX, R.; FILLOUX, A.; SCHALK, I.J. Pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: the Tat system is required for PvdN but not for FpvA transport. **Journal of Bacteriology,** Washington, v. 188, n. 9, p. 3317-3323, May 2006.

VUJANOVIC, V.; HAMELIN, R.C.; BERNIER, L.; VUJANOVIC, G.; ST-ARNAUD, M. Fungal diversity, dominance, and community structure in the rhizosphere of clonal *Picea mariana* plants throughout nursery production chronosequences. **Microbial Ecology,** New York, v. 54, n. 4, p. 672-684, Nov. 2007.

WARD, N.L.; CHALLACOMBE, J.F.; JANSSEN, P.H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D.H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R.D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T.S.; BRINKAC, L.M.; BRUCE, D.; CREASY, T.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.M.1; DEBOY, R.T.; DETTER, C.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C.S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S.P.; MADUPU, R.; NELSON, K.E.; NELSON, W.C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROSOVITZ, M.J.; SELENGUT, J.D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S.A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L.S.; WATKINS, K.L.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C.R. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WARDLE, D.A.; BARDGETT, R.D.; KLIRONOMOS, J.N.; SETÄLÄ, H.; PUTTEN, W.H. Van der; WALL, D.H. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. **Science,** Washington, v. 304, p. 1629-1633, June 2004.

WEID, I. von der; ARTURSSON, V.; SELDIN, L.; JANSSON, J.K. Antifungal and root surface colonization properties of GFP-tagged *Paenibacillus brasiliensis* PB177. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** New York, v. 12, p. 1591-1597, 2005.

WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 26, p. 379-407, 1988.

WELLER, M.; RAAIJMAKERS, J.M.; MCSPADDEN GARDENER, B.B.; THOMASHOW, L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 40, p. 309-348, 2002.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 52, p. 487-511, Mar. 2001.

WHITMAN, B.W.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 95, p. 6578-6583, June 1998.

WOO, S.L.; ZOINA, A.; del SORBO, G.; LORITO, M; NANNI, B.; SCALA, F.; NOVIELLO, C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. **Molecular Plant Pathology,** Hoboken, v. 86, n. 9, p. 966-973, May 1996.

WOODS, W.I. Development of anthrosol research. In: LEHMANN, J; KERN, D.; GLASER, B.; WOODS, W.I. **Amazonian dark earths:** origin propierties management. New York: Springer Science, 2004. chap. 1, p. 3-14.

XIA, W.; ZHANG, C.; ZENG, X.; FENG, Y.; WENG, J.; LIN, X.; XHU, J.; XION, Z.; XU, J.; CAI, Z; JIA, Z. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil. **The ISME Journal,** London, v. 5, p. 1226-1236, 2011.

XU, M.; SCHNORR, J.; KEIBLE, B.; SIMON, H.M. Comparative analysis of 16*S* rRNA and *amo*A genes from Archaea selected with organic and inorganic amendments in enrichment culture. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 78, n. 7, p. 2137-2146, Jan. 2012.

XU, Y.Y.; WANG, X.; ZHANG, K.Q.; LI, G.H. Bioactive constituents from the bacterium *Alcaligenes faecalis* YMF 3.175. **Applied Biochemistry and Microbiology,** New York, v. 51, n. 1, p. 52-57, 2015.

YANG, B.; XUE, Q.; CHEN, Z.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; XU, Y.; GUO, Z. Effects of microwave irradiation on isolation of soil actinomycetes. **The Journal of Applied Ecology**, London, v. 19, n. 5, p. 1091, 2008.

YANG, J.H.; LIU, H.X.; ZHU, G.M.; PAN, Y.L.; XU, L.P.; GUO, J.H. Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. **Journal of Applied Microbiology,** Hoboken, v. 104, p. 91-105, 2007.

YIN, C.; JONES, K.L.; PETERSON, D.E.; GARRETT, K.A.; HULBERT, S.H.; PAULITZ, T.C. Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. **Soil Biology & Biochemistry,** Oxford, v. 42, p. 2111-2118, 2010.

YOON, J. Phylogenetic studies on the bacterial phylum *'Verrucomicrobia'*. **Microbiology and Culture Collections,** Daegu, v. 27, n. 2, p. 61-65, 2011.

ZACHOW, C.; MÜLLER, H.; TILCHER, R.; BERG, G. Differences between the rhizosphere microbiome of *Beta vulgaris* ssp. maritima—ancestor of all beet crops—and modern sugar beets. **Frontiers in Microbiology,** Lausanne, v. 5, n. 415, p. 1-13, 2014.

ZAHIR, I.; HOUARI, A.; BAHAFID, W.; IRAQUI, M.; IBNSOUDA, S. A novel *Alcaligenes* faecalis antibacterial-producing strain isolated from Mococcan tannery waste. **African Journal of Microbiology Research,** Lagos, v. 7, n. 47, p. 5314-5323, Nov. 2013.

ZHANG, W.; LU, Z. Phylogenomic evaluation of members above the species level within the phylum Firmicutes based on conserved proteins. **Environmental Microbiology Reports,** Hoboken, v. 7, n. 2, p. 273-281, 2015.

ZHANG, X.; ZHANG, B.X.; ZHANG, Z.; SHEN, W.F.; YANG, C.H.; YU, J.Q.; ZHAO, Y.H. Survival of the biocontrol agents *Brevibacillus brevis* ZJY-1 and *Bacillus subtilis* ZJY-116 on the spikes of barley in the field. **Journal of Zhejiang University Science B,** New York, v. 6, n. 8, p. 770-777, Aug. 2005.

ZHAO, S.; DU, C.M.; TIAN, C.Y. Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** New York, v. 28, n. 9, p. 2919-2927, Sept. 2012.

ZHU, Y.G.; SMITH, S.E.; BARRITT, A.R.; SMITH, F.A. Phosphorus (P) efficiencies and mycorrhizal responsiveness of old and modern wheat cultivars. **Plant and Soil,** New York, v. 237, p. 249-255, July 2001.

ZYL, L.J. van; SCHUBERT, W.D.; TUFFIN, M.I.; COWAN, D.A. Structure and functional characterization of pyruvate decarboxylase from *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **BMC Structural Biology,** London, v. 14, n. 21, p. 1-13, July 2014.

APÊNDICES

Apêndice A - Dados do sequenciamento metagenômico das amostras de *bulk soil* de TPA anotados pelo MG-RAST

Dado MG-RAST	Réplicas *bulk soil*				
	BS1	BS2	BS3	BS4	BS5
Pré-Controle de qualidade					
Número bp	155.050.559	97.221.178	1.782.591.086	1.819.053.303	891.104.998
Número sequências	693.823	340.867	6.055.127	6.703.976	3.523.333
Comprimento médio (pb)	223 ± 97	285 ± 90	294 ± 80	271 ± 84	252 ± 90
Cont. médio CG (%)	63 ± 9	63 ± 9	64 ± 8	64 ± 8	63 ± 8
Pós-Controle de qualidade					
Número bp	143.223.267	85.524.090	1.329.868.713	1.386.696.311	690.817.961
Número sequências	671.247	325.612	5.566.239	6.235.232	3.290.217
Comprimento médio (pb)	213 ± 93	262 ± 97	238 ± 96	222 ± 89	209 ± 88
Cont. médio CG (%)	63 ± 8	63 ± 8	64 ± 8	64 ± 8	64 ± 8
Predição de proteínas	622.250	309.497	4.943.269	5.437.221	2.933.422
Proteínas identificadas	246.182	137.481	2.081.923	2.177.123	1.151.870
Categorias funcionais	194.672	109.167	1.647.362	1.717.444	907.433

Apêndice B - Dados do sequenciamento metagenômico das amostras de solo rizosférico do feijão genótipo IAC Alvorada anotados pelo MG-RAST

Dado MG-RAST	Réplicas rizosfera IAC Alvorada				
	IA1	IA2	IA3	IA4	IA5
Pré-Controle de qualidade					
Número bp	174.989.921	212.387.891	377.887.854	584.280.239	731.939.852
Número sequências	783.068	856.012	1,285,233	1.917.250	2.684.158
Comprimento médio (pb)	223 ± 98	248 ± 95	294 ± 91	304 ± 79	272 ± 76
Cont. médio CG (%)	63 ± 9	62 ± 10	65 ± 8	64 ± 8	64 ± 8
Pós-Controle de qualidade					
Número bp	158.141.376	192.069.687	268.914.762	444.091.694	578.094.420
Número sequências	753.612	826.238	1.169.711	1.785.611	2.535.779
Comprimento médio (pb)	209 ± 94	232 ± 94	229 ± 102	248 ± 99	227 ± 85
Cont. médio CG (%)	63 ± 9	62 ± 10	65 ± 8	64 ± 8	64 ± 8
Predição de proteínas	696.971	767.453	1.078.675	1.626.252	2.250.557
Proteínas identificadas	274.640	313.869	452.045	713.179	942.789
Categorias funcionais	215.137	244.989	357.019	562.211	741.712

Apêndice C - Dados do sequenciamento metagenômico das amostras de solo rizosférico do feijão genótipo Wild Mex anotados pelo MG-RAST

Dado MG-RAST	Réplicas Wild Mex				
	WM1	WM2	WM3	WM4	WM5
Pré-Controle de qualidade					
Número bp	212.485.969	114.490.052	908.890.218	964.360.779	1.090.593.960
Número sequências	900.471	486.522	2.954.676	3.603.547	5.151.121
Comprimento médio (pb)	235 ± 92	235 ± 100	307 ± 77	267 ± 84	211 ± 92
Cont. médio CG (%)	62 ± 10	62 ± 11	64 ± 9	63 ± 9	62 ± 10
Pós-Controle de qualidade					
Número bp	194.880.556	102.977.151	575.404.147	756.419.507	883.472.296
Número sequências	874.569	465.485	2.638.400	3.422.618	4.903.452
Comprimento médio (pb)	222 ± 90	221 ± 96	218 ± 98	221 ± 88	180 ± 79
Cont. médio CG (%)	62 ± 10	62 ± 10	64 ± 9	63 ± 9	62 ± 10
Predição de proteínas	807.486	427.936	2.398.291	3.056.596	4.187.500
Proteínas identificadas	325.104	169.816	951.823	1.216.158	1.464.254
Categorias funcionais	253.089	132.262	745.380	951.256	1.135.078

Apêndice D - Número de sequências e frequência relativa (%) média (n = 5) dos domínios Bacteria, Archaea e Eukarya no metagenoma de *bulk soil* (BS), rizosfera do feijão cultivado IAC Alvorada (IA) e rizosfera do feijão selvagem Wild Mex (WM)

Domínio	Sequências BS	% BS	Sequências IA	% IA	Sequências WM	% WM
Archaea	45.286	0,85	18.480	0,75	26.676	0,69
Bacteria	5.361.809	98,38	2.469.936	98,07	3.809.273	97,28
Eukaryota	32.742	0,59	24.572	1,01	67.214	1,86
Virus	791	0,01	410	0,02	600	0,02
Sequências não classificadas	8.883	0,16	3.770	0,15	5.711	0,15