

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**Diversidade de rizóbios associados a *Desmodium* spp. e outros legumes  
nativos dos Campos Sulinos do Rio Grande do Sul - Brasil**

**Tese de Doutorado**

**Fernanda da Silva Moreira**

**Porto Alegre**

**2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

**Diversidade de rizóbios associados a *Desmodium* spp. e outros legumes  
nativos dos Campos Sulinos do Rio Grande do Sul - Brasil**

**Fernanda da Silva Moreira**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

**Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia**

**Porto Alegre, maio de 2018.**

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Microbiologia Agrícola do Departamento de Genética da UFRGS em parceria com o Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul-SEAPI e o Departamento Autônomo de Biologia Microbiana da Faculdade de Agricultura e Biologia, Universidade de Ciências da Vida de Varsóvia – Polônia. O projeto foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) da Fixação Biológica de Nitrogênio.

Dedico.

Aos meus filhos, Laira e Lúcio.

À memória de minha avó, Maria Iva, de quem fui a filha mais nova.

"Não explicar a ciência me parece perverso. Quando  
você está apaixonado, quer contar para todo mundo."  
Carl Sagan em O Mundo Assombrado Pelos Demônios

## AGRADECIMENTOS

- À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane Passaglia pelos nove anos de convivência em que tive o privilégio de sua orientação, amizade, compreensão e muita paciência.
- Aos colegas do laboratório de Genética Vegetal, em especial do Núcleo de Microbiologia Agrícola, por todos os anos de convivência e aprendizado.
- Ao Bruno Brito Lisboa e ao Gilson Shlindwein da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul-SEAPI pela generosidade em dividir seus conhecimentos, o que permitiu a coleta e discussão dos dados dessa tese.
- À Adriana Ambrosini, Fernando Hayashi Sant'Anna, Karen Thomeny e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andreia Carina Turchetto Zolet pela colaboração imensurável.
- Ao Tomasz Stepkowski, o maior entusiasta dos rizóbios.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, em especial ao Elmo.
- À Gabi, Eve, Nicole e Karen, amigas que levo para além da academia. À Di e Pedro. Obrigada por todo apoio.
- Aos meus *Euamigos* que, longe ou perto, acompanharam essa caminhada e torceram por mim, em especial à Letícia e Guilherme.
- Ao Lauro.
- À minha família, que sofreu e comemorou junto cada etapa.
- A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Fixação Biológica de Nitrogênio (INCT-FBN) pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Leguminosas e rizóbios.....	12
1.2. Fixação Biológica de Nitrogênio e nodulação .....	13
1.3. Campos Sulinos .....	15
1.4. Família Leguminosae (Fabaceae) .....	16
1.4.1 O gênero <i>Desmodium</i> .....	17
1.5. Análises filogenéticas .....	18
2. OBJETIVO GERAL.....	20
2.1. Objetivos específicos .....	20
3. CAPÍTULO I <i>Manuscrito a ser submetido à revista Systematic and Applied Microbiology</i> .....	22
4. CAPÍTULO II – Manuscrito em preparação.....	60
4.1. Resumo.....	60
4.2. Introdução.....	61
4.3. Material e métodos.....	62
4.3.1. Caracterização dos locais de coleta .....	62
4.3.2. Coleta dos nódulos e obtenção dos isolados .....	65
4.3.3. Caracterização genética dos isolados.....	65
4.4. Resultados e discussão .....	66
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	72
6. REFERÊNCIAS .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ca	cálcio
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
Al	alumínio
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
FBN	fixação biológica de nitrogênio
Kb	quilobase
M	mol
Mg	magnésio
Mg <sup>2+</sup>	íon magnésio
MLSA	<i>multilocus sequence analysis</i> (análise de sequência multilocular)
mM	mili Molar
Mn	manganês
N	nitrogênio
N <sub>2</sub>	nitrogênio atmosférico
Ng	nanograma
P	fósforo ( <i>phosphorus</i> )
pb	pares de base
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação de polimerização em cadeia)
pH	potencial hidrogeniônico
rDNA	<i>ribosomal desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)



	ribossomal)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
SEMIA	Seção de Microbiologia Agrícola
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

## RESUMO

A importância das leguminosas na produção agrícola tanto para humanos como para a criação de gado é bem conhecida e é, sem dúvida, a razão pela qual temos tantas informações sobre a simbiose entre rizóbios e leguminosas de interesse comercial, como a soja. O resultado dessa parceria é a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Este processo aumenta a quantidade de nitrogênio disponível para a planta associada, aumentando naturalmente o rendimento da produção, evitando perdas monetárias para o produtor e perdas de nitrogênio para o meio ambiente, que potencialmente levam à contaminação e eutrofização de cursos de água. Apesar desse interesse econômico, ainda sabemos pouco sobre o potencial das leguminosas nativas e sobre seus simbioses. Neste trabalho propusemo-nos a avaliar a diversidade de rizóbios associados a leguminosas nativas dos Campos Sulinos do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, e compreender a estrutura filogenética da relação leguminosa-rizóbios ao longo das diferenças climáticas e topográficas da região. Para leguminosas do gênero *Desmodium*, representantes da fauna nativa, os simbioses pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* a elas associados mostraram-se altamente diversificados. Nossos resultados também indicaram a falta de especialização bacteriana em relação aos genes constitutivos (*recA*, *dnaK* e *atpD*) entre diferentes populações de *Desmodium*, uma vez que muitos filogrupos foram formados por isolados bacterianos de diferentes hospedeiros vegetais. Entretanto, ao analisarmos o gene relacionado à simbiose, *nifD*, foi possível identificar uma tendência maior à especificidade entre o rizóbio e a planta hospedeira. Além disso, encontramos clados de isolados não agrupados em clados contendo espécies de referência utilizadas nas análises filogenéticas, indicando o potencial para novas espécies de *Bradyrhizobium* nessas regiões. Estes isolados podem representar espécies recentes, provavelmente originadas nos Neotrópicos. Entre os trezentos e trinta isolados bacterianos provenientes de sessenta e oito espécies vegetais nativas, incluindo as do gênero *Desmodium* utilizadas no primeiro estudo, foram encontradas linhagens bacterianas com alta identidade com os gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Burkholderia*.

## ABSTRACT

The importance of legumes in agricultural production for both humans and livestock is well known and is undoubtedly the reason why there are so much information on the symbiosis between rhizobia and legumes of commercial interest, such as soybean. The result of this partnership is Biological Nitrogen Fixation (BNF). This process increases the amount of nitrogen available to the associated plant, naturally increasing yields, avoiding monetary losses to the producer and nitrogen losses to the environment, which potentially leads to contamination and eutrophication of water courses. Despite this economic interest, we still know little about the potential of native legumes and their symbionts. In this work we propose to evaluate the diversity of rhizobia associated with native leguminous plants of the Southern Brazilian fields in Rio Grande do Sul state, Brazil, and to understand the phylogenetic structure of the leguminous-rhizobia relationship along the climatic and topographic differences of the region. For the leguminous of the genus *Desmodium*, representing the native fauna, the associated *Bradyrhizobium* symbionts were highly diversified. Our results also indicated the lack of bacterial specialization in relation to the constitutive genes (*recA*, *dnaK* and *atpD*) among different populations of *Desmodium*, since many phylogroups were formed by isolates of different plant hosts. However, when we analyze one gene related to symbiosis, *nifD*, we were able to identify a greater tendency to specificity between the rhizobia and the host plant. In addition, we found clades of bacterial isolates that did not cluster together with reference species used in phylogenetic analyzes, indicating the potential for new *Bradyrhizobium* species in these regions. These isolates may represent recent species, probably originating in the Neotropics. Among the three hundred and thirty bacterial isolates from sixty-eight native plant species, including those of the genus *Desmodium* used in the previous study, we found bacterial strains with high identity with genera *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium* and *Burkholderia*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Leguminosas e rizóbios

Legumes representam um grupo funcional importante em todos os ecossistemas devido, principalmente, a sua participação no processo de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN). Esse processo é facilitado pela interação simbiótica com bactérias, conhecidas pelo nome genérico de rizóbios, que formam estruturas especializadas na conversão do nitrogênio atmosférico em compostos utilizáveis pelas plantas, os nódulos. Essa simbiose fornece à planta hospedeira todo o nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento, enquanto a bactéria obtém os nutrientes necessários para sua sobrevivência e multiplicação. Essa relação, desenvolvida e aperfeiçoada através da coevolução, tem consequências ambientais importantes e vem sendo estudada de modo a ser aproveitada em benefício das atividades humanas, inclusive na diminuição do impacto socioambiental causado por elas.

A manutenção sustentável da produção agrícola tornou-se uma necessidade evidenciada pelas práticas já amplamente adotadas, como o manejo correto da área a ser plantada (por exemplo, o plantio direto) e a utilização de técnicas de melhoramento tradicional e genético, para que sejam obtidas variedades de plantas com característica desejáveis, como maior produtividade, resistência a organismos predadores e a condições ambientais desfavoráveis. Juntamente com essas práticas, uma alternativa eficiente e economicamente viável é o uso de formulações inoculantes a base de micro-organismos. Tais inoculantes são capazes de substituir parcial ou integralmente a adição de pesticidas e fertilizantes nitrogenados ou fosfatados às culturas, poupando tanto o agricultor quanto o ambiente dos danos resultantes, visando, ainda, a maximização da produção. O uso de espécies de rizóbios na inoculação de soja na agricultura brasileira desde a década de 70 substituiu amplamente a aplicação de fertilizantes nitrogenados, oferecendo grande vantagem econômica e sem prejuízos ao rendimento da produção. Aliado a esse conhecimento, há um esforço no uso de leguminosas como adubo verde, trazendo benefícios além da produtividade, como a diminuição na emissão de dióxido de carbono gerado pela mineração e a utilização de fertilizantes nitrogenados, compromisso assumido internacionalmente pelo Brasil entre os anos de 2009 e 2010 (FILIPE *et al.*, 2016; HUNGRIA e MENDES, 2013).

Devido ao aporte de nitrogênio e, conseqüentemente, à grande biomassa proporcionada pelas leguminosas, essas plantas adquiriram grande importância na manutenção da fertilidade do solo (KERMAH et al., 2017). Apesar de muitos estudos focarem no seu uso para a agricultura, essa característica também é interessante para a recuperação de ambientes naturais degradados e para o pastejo animal. Portanto, espécies de leguminosas nativas são potenciais candidatos a serem utilizados no manejo de culturas através da adubação verde (CREWS e PEOPLES, 2005).

A simbiose entre legumes cultiváveis é relativamente bem conhecida e estudada há muitos anos, gerando resultados positivos em relação à produtividade e custo para a agricultura brasileira e mundial. Outras bactérias fixadoras de nitrogênio e possuidoras de diversas características promotoras de crescimento vegetal, associadas a plantas não leguminosas, também têm fornecido bons resultados como inoculantes, apesar dessa relação não ser tão estreita como no caso dos legumes (BENEDUZI *et al.*, 2013; BHATTACHARJEE *et al.*, 2008). De uma perspectiva microbiológica, pouca informação está disponível em relação aos rizóbios que nodulam legumes nativos brasileiros em seus limites naturais. A alta diversidade dos parceiros vegetais nessa simbiose pode justificar esse fato: o Brasil representa o centro de diversidade de muitos grupos de legumes, incluindo o grupo inicial dos papilionoides e os dalbergoides *sensu lato*. Além disso, o tamanho e a complexidade do território brasileiro dificultam estudos mais amplos, amplificando o impacto que os fatores geográficos e ambientais ocasionam na distribuição de ambos os parceiros simbióticos (ANDAM e PARKER, 2007; STEPKOWSKI *et al.*, 2007). Portanto, a partir da escassa informação disponível, não estão claros quais desses fatores em particular modularam a evolução de rizóbios simbióticos e em que extensão essa evolução foi acompanhada pela evolução das plantas da família das leguminosas.

## **1.2. Fixação Biológica de Nitrogênio e nodulação**

O processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico em amônia é realizado por micro-organismos chamados, de forma geral, de diazotróficos, nome relativo justamente a sua capacidade de reduzir o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) à amônia (NH<sub>3</sub>) (NEWTON, 2000). Esse processo é realizado pelo complexo enzimático da enzima nitrogenase, no qual estão envolvidos os genes *nif* (de *nitrogen fixation*),

responsáveis pela montagem e funcionamento, assim como pela própria regulação da expressão dos genes *nif* (DIXON, 1984; DIXON; KAHN, 2004). Os diversos genes *nif* costumam estar organizados em *operons*, seja em ilhas genômicas (KANEKO et al., 2002, 2011) ou em grandes plasmídeos simbióticos (OKAZAKI et al., 2015; TEAMTISONG et al., 2014).

Apesar do conhecimento sólido de algumas décadas de estudo sobre bactérias diazotróficas de vida livre relacionadas a plantas não leguminosas (BALDANI *et al.*, 1997), é da simbiose entre rizóbios e espécies vegetais da família Leguminosae o processo de fixação biológica de nitrogênio mais bem estudado, assim como a própria simbiose (GRAY e SMITH, 2005). Esses micro-organismos são capazes de invadir o tecido da planta para, uma vez no espaço intracelular, induzir a formação do nódulo onde realizam a FBN em estreita simbiose. São representados, em sua maioria, pelos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Porém, outros gêneros também podem apresentar essa mesma habilidade, como os representantes fixadores de nitrogênio do gênero *Burkholderia*, geralmente noduladores de espécies vegetais da tribo Mimosae (subfamília Mimosoidae) (BOURNAUD et al., 2013).

A formação de nódulos é possibilitada pela troca de sinais moleculares entre a planta hospedeira e o rizóbio que ocorre no solo, em que compostos flavonoides são liberados pela planta, induzindo a expressão dos genes responsáveis pelo processo de infecção bacteriana às raízes das leguminosas, os genes *nod* (AUSMEES et al., 2004; MCLENNAN et al., 2014). Esses genes codificam enzimas de biossíntese e liberação de lipo-quito-oligossacarídeos, conhecidos como fatores Nod, que promovem a fase inicial da nodulação (AUSMEES et al., 2004; GRESSHOFF, 2003). Em um segundo momento, polissacarídeos de superfície ou proteínas secretadas pelas bactérias, também são requeridos para que haja uma eficiente formação do nódulo (AUSMEES et al., 2004). As bactérias invadem as raízes, através de brechas de infecção e, uma vez dentro do nódulo, se diferenciam em bacteroides, estrutura bacteriana sem parede celular, que é a forma capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico (MYLONA *et al.*, 1995).

Assim como ocorre com os genes *nif*, os genes de nodulação de rizóbios também estão organizados em diversos *operons*, que podem estar localizados no cromossomo

(LOH et al., 2003) ou em grandes plasmídeos (FREIBERG et al., 1997), dependendo da espécie (CHEN et al., 2005).

Essas características de localização e organização dos *operons* relacionados à simbiose em rizóbios são fonte de informação importante quanto ao relacionamento filogenético entre diferentes linhagens, contando histórias evolutivas que divergem daquela contada pelos genes que são expressos constitutivamente (*housekeeping*). Inicialmente trazendo falta de resolução nas árvores filogenéticas, esses genes nos levam à história da coevolução entre os parceiros simbióticos (BARCELLOS et al., 2007; SYVANEN, 2012)

### **1.3. Campos Sulinos**

Os Campos Sulinos compreendem as regiões campestres dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Fig. 1), que ainda se estendem pelo Uruguai e Argentina, incluindo áreas do bioma Pampa e do bioma Mata Atlântica (PILLAR e LANGE, 2015).

O bioma Pampa possui uma área de 178.243 quilômetros quadrados, segundo o mapa de biomas brasileiros elaborado pelo IBGE (2004), abrangendo os campos da metade sul e das Missões no Estado do Rio Grande do Sul. Menos de 12% de sua área está livre da atividade humana (HASENACK et al., 2007). O cultivo de lavouras e a pecuária, entre outras atividades, faz com que o Pampa seja um dos mais devastados biomas brasileiros, ficando atrás apenas do bioma Mata Atlântica, segundo componente dos Campos Sulinos. A porção dos Campos Sulinos ocupada pela Mata Atlântica está concentrada nos campos de altitude, também conhecidos como Campos de Cima da Serra. Essa região se caracteriza pela formação de mosaicos de matas de Araucária e outras formações florestais (PILLAR et al., 2009).

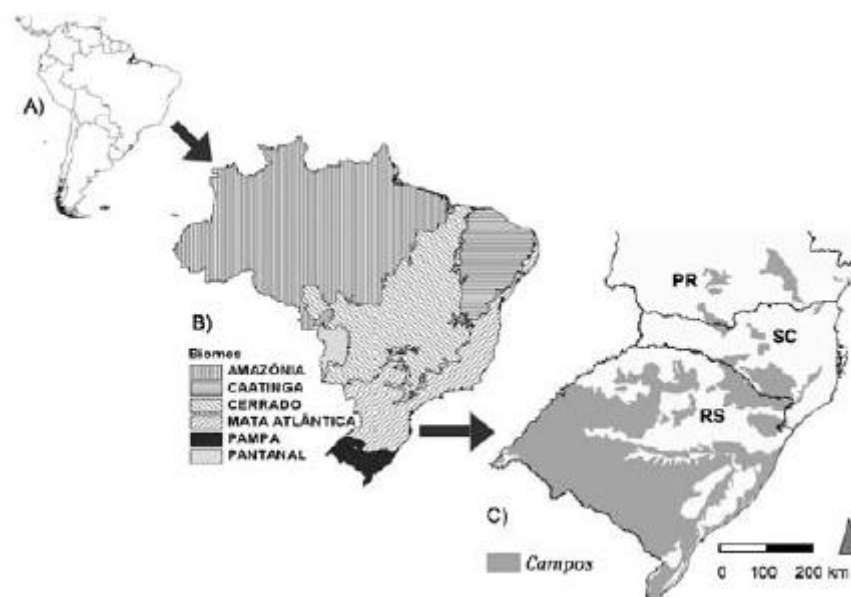


Fig. 1: Localização dos Campos Sulinos: (a) visão geral da América do Sul (b) o Brasil e a classificação oficial dos biomas brasileiros, segundo o IBGE (2004) e (c) distribuição dos Campos na região sul do Brasil. Fonte: PILLAR *et al.*, 2009.

Grande parte da riqueza da biodiversidade do Pampa ainda é desconhecida pela escassez de pesquisas de levantamento e de identificação da fauna e da flora deste bioma. A grande quantidade e diversidade de plantas nativas com potencial forrageiro que existe nos campos do Rio Grande do Sul, faz com que a pecuária seja uma das principais atividades da região. A lotação excessiva de gado nessas áreas pode gerar perda de biodiversidade. Além do potencial forrageiro, as pastagens permanentes e a introdução de espécies nativas são fundamentais para a proteção do solo, demonstrando o importante papel que as plantas leguminosas podem desempenhar.

#### 1.4. Família Leguminosae (Fabaceae)

A família Leguminosae compreende, no Brasil, 2.848 espécies de legumes, distribuídas em 222 gêneros, das quais 1.539 são espécies endêmicas (FLORA DO BRASIL 2020, 2016). Devido a esse grande número de espécies endêmicas, o Brasil representa o centro de diversidade de muitas espécies de legumes. De uma perspectiva microbiológica, pouca informação está disponível em relação aos rizóbios que nodulam os legumes nativos brasileiros em seus limites naturais. Além disso, fatores geográficos e ambientais tiveram seus impactos na distribuição de ambos os parceiros simbióticos.



Porém, a partir da escassa informação disponível, não estão claros quais são esses fatores e de que forma eles modularam a evolução de rizóbios. Também é desconhecida como essa evolução foi acompanhada pela evolução das plantas da referida família.

Existem diversas espécies de leguminosas características dos Campos Sulinos que apresentam um grande potencial forrageiro. Entre elas encontram-se as espécies do gênero *Desmodium*. Assim como outros legumes, as raízes destas plantas podem ser eficientemente colonizadas por bactérias diazotróficas genericamente denominadas rizóbios, formando uma associação simbiótica entre a planta e a bactéria.

#### **1.4.1 O gênero *Desmodium***

Espécies do gênero *Desmodium* (cerca de 300) são leguminosas da subfamília Papilionoideae, tribo Desmodieae, amplamente distribuídas em regiões temperadas e subtropicais, com maior concentração a leste da Ásia, México e Brasil. Elas são usadas na medicina popular tradicional como agentes antipiréticos e anti-inflamatórios e possuem um grande potencial como plantas forrageiras. O gênero também inclui espécies pioneiras resistentes ao ambiente estressado pela seca (OHASHI, 2005; WULFF, 1986). As espécies de *Desmodium* que realizam simbiose para a fixação biológica de nitrogênio com rizóbios também desempenham um papel importante na agricultura sustentável e na nutrição do gado. A maioria dos rizóbios nodulantes de *Desmodium* descritos até o momento pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*. No entanto, esta leguminosa também é nodulada por estirpes que pertencem aos gêneros *Rhizobium*, *Ensifer* e *Mesorhizobium* (PARKER, 1999).

Diversos estudos revelaram a importância do isolamento geográfico em uma escala continental, como um fator definidor do padrão de agrupamento em árvores filogenéticas de genes simbióticos de *Bradyrhizobium* (BEUKES *et al.*, 2016; KOPPELL e PARKER, 2012; STEPKOWSKI *et al.*, 2012). Devido ao fato de que a América do Sul permaneceu em um isolamento geográfico quase completo de qualquer área continental há mais de 130 milhões de anos (DIETZ e HOLDEN, 1970; SARMIENTO, 1975) e de que a região Neotropical é conhecida pela ocorrência de uma grande diversidade de sua flora de leguminosas (OHASHI, 2005), é interessante

investigar se o isolamento geográfico e a radiação da planta hospedeira atuaram como fatores críticos para a evolução do gênero *Bradyrhizobium* nessa região.

### 1.5. Análises filogenéticas

O estudo da variabilidade genética em isolados bacterianos vem se aperfeiçoando junto às variações da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), por exemplo, associadas às técnicas que se utilizam de características específicas das sequências (polimorfismos, sequências repetitivas) (FAROOQ; VESSEY, 2009; TIAN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). Atualmente, o incremento da capacidade e acurácia de sequenciamento dos produtos amplificados pela PCR junto à disponibilidade de informações contidas em bancos de dados de sequências nucleotídicas, entre outras, permite a exploração e comparação entre micro-organismos de forma a elucidar suas relações filogenéticas, servindo de ferramenta indispensável na compreensão da evolução dos mesmos e, no caso específico de rizóbios, de sua coevolução em relação a seus parceiros simbióticos.

A alta conservação nucleotídica do gene 16S rDNA faz com que o mesmo represente um marcador molecular importante na elucidação da história evolutiva de bactérias, sendo um critério indispensável na taxonomia bacteriana. Apesar de muito usado na caracterização de isolados bacterianos com bastante sucesso devido suas características, o gene do 16S rDNA não costuma ser variável o suficiente para oferecer informações que suportem a diferenciação de linhagens de rizóbios (SANT'ANNA *et al.*, 2017), havendo ainda a questão da existência de múltiplas cópias do gene em um mesmo genoma, o que confere certa heterogeneidade entre as sequências (ACINAS *et al.*, 2004).

Outros genes, tipicamente de expressão constitutiva, conhecidos como genes *housekeeping* têm sido utilizados na intenção de resolver as relações filogenéticas entre micro-organismos em geral (*e. g.* NOISANGIAM *et al.*, 2010; OKAMURA; TAKATA; HIRAISHI, 2009; XU *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2015). Atualmente, a técnica de MLSA (de *Multilocus sequence analysis*) tem sido utilizada em estudos filogenéticos de forma a somar a informação presente em cada gene, a fim de encontrar melhor resolução das relações filogenéticas, permitindo esclarecer essas relações

dentro do mesmo gênero, ou mesmo entre linhagens de uma mesma espécie (RIVAS *et al.*, 2009; STEPKOWSKI *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2016).

O uso de *loci* simbióticos na elucidação de filogenias de rizóbios revelou o alto nível de diversidade do gênero *Bradyrhizobium* (*e. g.* GRANADA *et al.*, 2015; KOPPELL e PARKER, 2012; PARKER, 2012; STEPKOWSKI *et al.*, 2012). Um dos fatores que contribuem para essa alta diversidade é transferência horizontal de genes (HGT – *Horizontal Gene Transfer*), muito comum em sequências presentes em ilhas genômicas ou plasmídeos, como é o caso dos genes relacionados à nodulação (genes *nod*) e os genes ligados ao processo de fixação de nitrogênio (genes *nif*) (BARCELLOS *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2013; STEENKAMP *et al.*, 2008). Apesar de altamente diversificado, ou talvez por esse mesmo motivo, as sequências oriundas desses genes são altamente informativas filogeograficamente, permitindo a visualização de grupos relacionados tanto à origem do micro-organismo simbiote quanto da planta hospedeira (BEUKES *et al.*, 2016a).

## 2. OBJETIVO GERAL

Na tentativa de preencher algumas lacunas de conhecimento, o presente estudo teve como objetivo geral descrever a diversidade de rizóbios que nodulam legumes nativos em várias localidades do Rio Grande do Sul situadas na região conhecida como Campos Sulinos. O conhecimento gerado contribuirá para um melhor entendimento da distribuição e origem das espécies de rizóbios nas áreas amostradas.

### 2.1. Objetivos específicos

- a) Realizar coletas de nódulos de diferentes leguminosas nativas em sítios de amostragem localizados nos biomas Pampa e Mata Atlântica do Estado do Rio Grande do Sul;
- b) Avaliar os sítios de amostragem quanto às suas características ambientais, a fim de estimar a distribuição de plantas e bactérias entre os diferentes locais;
- c) Obter diferentes isolados de rizóbios e seus DNAs genômicos, a fim de amplificar e sequenciar genes *housekeeping* e simbióticos que sejam comumente empregados em análises taxonômicas de rizóbios, de acordo com a literatura;
- d) Inferir sobre relações filogenéticas entre os isolados obtidos e diferentes linhagens tipo de rizóbios, as quais serão selecionadas de acordo com a disponibilidade de sequências e a comparação em diferentes bancos de dados;
- e) Avaliar a distribuição de grupos bem suportados entre as filogenias de genes individuais e dos genes *housekeeping* concatenados, a fim de inferir sobre a possibilidade de relação específica entre rizóbio e planta hospedeira;
- f) Comparar as filogenias de genes simbióticos e *housekeeping* e a possibilidade de eventos de transferência gênica entre as diferentes linhagens obtidas;
- g) Analisar as relações de ancestralidade de rizóbios obtidos a partir de diferentes leguminosas nativas, bem como a possível existência de linhagens originadas no sul da América do Sul;
- h) Contribuir para o conhecimento da distribuição de comunidades de rizóbios associadas a leguminosas nativas do sul do Brasil, dado seu potencial como bactérias promotoras de crescimento de plantas em solos degradados do bioma Pampa.

Em um primeiro momento, o trabalho se concentrou especificamente nas plantas pertencentes ao gênero *Desmodium*, presentes em praticamente todos os pontos de coleta (Capítulo I). Posteriormente, ele foi ampliado para todas as espécies de legumes amostradas (Capítulo II).

### 3. CAPÍTULO I - *Manuscrito a ser submetido à revista Systematic and Applied Microbiology*

#### **Diversity of symbionts associated with *Desmodium* spp. in South Brazil**

Fernanda da Silva Moreira<sup>1</sup>, Adriana Ambrosini<sup>1</sup>, Bruno Brito Lisboa<sup>2</sup>, Fernando Hayashi Sant'Anna<sup>1</sup>, Gilson Shlindwein<sup>2</sup>, Karen T. Girão<sup>1</sup>, Tomasz Stępkowski<sup>3</sup>, Andreia Carina Turchetto Zolet<sup>1</sup>, Luciane Maria Pereira Passaglia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil, <sup>2</sup>Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul-SEAPI, Rua Gonçalves Dias, 570, Porto Alegre, RS, 90130-060 (Brazil), <sup>3</sup>Autonomous Department of Microbial Biology, Faculty of Agriculture and Biology, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), 159 Nowoursynowska, 02-776 Warsaw, Poland

#### **Abstract**

Many legumes species are used as forage plant and those that form symbiosis with rhizobia contribute also to the nitrogen input in soil. The genus *Desmodium* is widely distributed in temperate and subtropical regions, including different biomes of Brazilian fields and forests. Given that legumes diversification may affect the specificity of interactions with their rhizobial partners, geographical isolation of South America and *Desmodium* radiation probably were critical factors for the evolution of rhizobial populations from fields of Southern Brazil. Most of the *Desmodium*-nodulating rhizobia described to date belong to the genus *Bradyrhizobium*, but the genealogical story of these symbionts yet continues broadly unknown for native legumes in this region. In this study, a total of 82 nodulating strains of *Desmodium* populations originated from thirty-five sites of Southern Brazil were characterized using multilocus sequence analysis (MLSA) from three housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, and *recA*), and the clustering of one symbiotic gene (*nifD*). *Desmodium incanum* was found in almost all sampling regions and soil types from where specimens were collected, despite the differential characteristics of soil and environment. High diversity of *Bradyrhizobium* symbionts associated with indigenous *Desmodium* was found in the proximities of arenized areas localized in Pampa biome. Our results also indicate

that relationships among *Bradyrhizobium* and *Desmodium* spp. are not species-specific, although there are a preference of bacterial groups formed according its plant-host in *nifD* phylogeny. Moreover, a group of isolates from *D. incanum* presented potential to form a new bacterial species, which was probably originated in this continent. A better understanding of bacterial communities involved in symbiotic nitrogen fixation can contribute to the development of alternatives for recovery of degraded soils and to monitoring of threatened environments.

Keywords: *Desmodium* spp., *Desmodium incanum*, *Bradyrhizobium*, Pampa biome, bacterial diversity, MLSA.

## Introduction

Legumes contribute with nitrogen to improve soil fertility and provide protein-rich grains for nutrition, encompassing a major component of agricultural systems throughout the world (Giller *et al.*, 2016). The genus *Desmodium* (family Fabaceae, subfamily Papilionoideae) is widely distributed in temperate and subtropical regions, including approximately 275 native species of Africa, America, Asia and Australia, and presenting centers of diversity in Mexico and South America (Ohashi 2005). Thirty-four *Desmodium* species were found in Brazil (Lima *et al.*, 2014a; 2014b).

*Desmodium* species are used in traditional folk medicine as antipyretic and anti-inflammatory agents (Allen and Allen, 1981; Ma *et al.*, 2011). The genus also includes pioneer species resistant to drought (Costa *et al.*, 2014a; Martins, 2014) and have a great potential as forage plants (Mwangi and Wambugu, 2003; Martins, 2014; Toniutti *et al.*, 2017). Many species also produce secondary metabolites useful to manage pests of important cereals, such as maize and sorghum (Khan *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2008).

The success of determined legumes species to cover different soils and habitats must be attributed to their rhizobia symbiotic partners that provide them with biologically fixed nitrogen (Xu *et al.*, 2016). According to Parker *et al.*, (2015), it is clear that legume plants play some role in structuring the genetic diversity among their nodule bacteria (rhizobia), because different legume hosts commonly utilize distinct symbiotic community. Besides

diversity and taxonomic relationships, the study of legume's symbionts is also important for screening strains with potential to promote plant growth in degraded soils mainly throughout increasing nitrogen supply (Bashan *et al.*, 2012; Galaviz *et al.*, 2018; Pérez-Fernández *et al.*, 2015; Requena *et al.*, 2001).

The legume-rhizobia symbiosis which involves the processes of nitrogen fixation and nodulation occurs among *Desmodium* and different bacterial groups. *Bradyrhizobium* spp. are the dominant symbionts of native legumes in Australia (Lafay and Burdon, 1998; Stępkowski *et al.*, 2012), Central America (Parker, 2002; Parker and Rousteau, 2014), North America (Parker *et al.*, 2015), and South America (Toniutti *et al.*, 2017). Studies of temperate and subtropical Chinese regions have found that *Desmodium* specimens were also nodulated by strains belonging to the genera *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Pararhizobium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* (Parker, 2002; Parker, 2003; Gu *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2016).

The genus *Bradyrhizobium* has great importance due to broad interaction with many leguminous in Brazilian tropical forests and fields (Moreira, 1991). Although 16S rRNA gene is widely used to identify bacterial genera, it is not suitable to solve phylogenetic relationships among *Bradyrhizobium* at the species level (Delamuta *et al.*, 2012; Azevedo *et al.*, 2015). Housekeeping genes – as example of *atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA*, and *rpoB* – are essential for the survival of the microorganisms and present a proportion of nucleotide substitutions adequate for establishing phylogenetic relationships of species (Azevedo *et al.*, 2015). The rhizobia genealogical history can also be accessed through symbiotic loci responsible for nodulation (*nod*) and nitrogen-fixation (*nif*) (Wernegreen, 1999; Menna and Hungria, 2011; Parker, 2012). However, genes related to symbiosis are commonly associated to mobile genetic elements localized in chromosome (symbiosis island, SI) and are prone to horizontal gene transfer (HGT) (Kaneko *et al.*, 2002; Parker *et al.*, 2015).

Given that South America harbors a great and diverse legume flora, the radiation of Fabaceae species probably was determinant in the evolution of rhizobia in Neotropics (Parker, 2012; Stępkowski *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2018). The southernmost Brazilian State (Rio Grande do Sul) harbors two biomes severally threatened, Atlantic Forest and Pampa. Due to importance of indigenous plants to maintenance of natural ecosystems, it is crucial to better understand how plant diversification can affect the specificity of their interactions and partners. To access the symbiotic diversity from native



*Desmodium* spp. in fields of southern Brazil, we carried out taxonomic analyses using multilocus sequence analysis (MLSA) from three housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, and *recA*) and the clustering of one symbiotic gene (*nifD*). Several *Bradyrhizobium* isolates were evaluated as to their taxonomic positions and distribution among different plants and soil types.

## Materials and methods

### *Sampling sites and environmental variables*

*Desmodium* populations were sampled from four different physiographic regions of Rio Grande do Sul: Serra do Sudeste (A), Campanha (B), Campos de Cima da Serra (C), and Missões (D) (Fig. 1). The samples of each region were taken between May 2014 and March 2015. Five bulk soil sub-samples were collected from each sampling site at a depth of 10–20 cm below ground level and the composite samples were placed in sealed polyethylene bags for transport. The soil types were identified and revised according to the Brazilian Soil Classification System from Santos *et al.*, (2014) and the Food and Agriculture Organization (FAO). Aliquots for chemical analyses were kept at  $-4^{\circ}\text{C}$ .

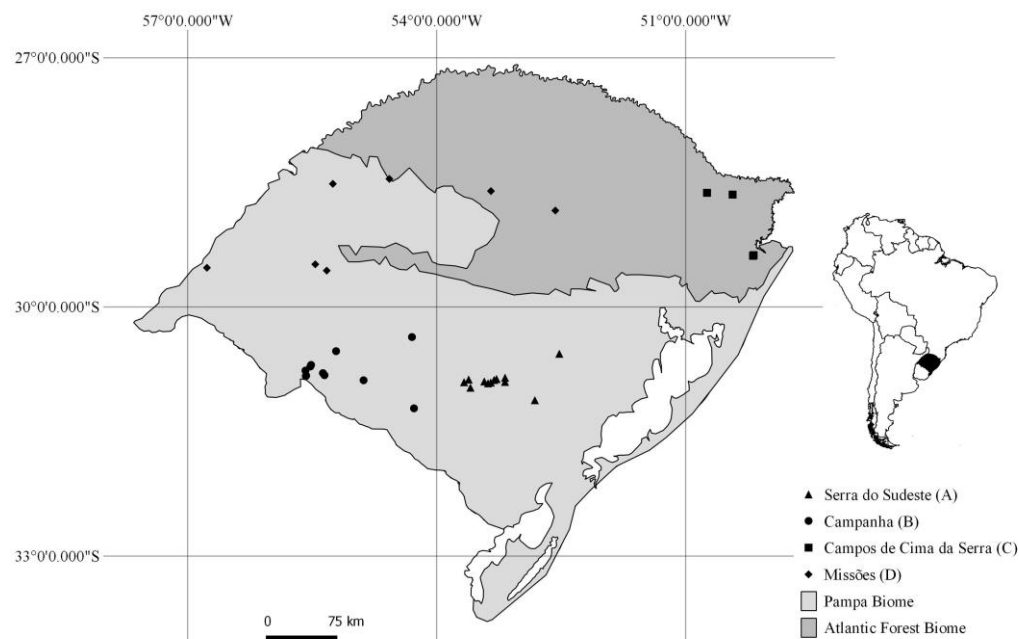


Fig. 1: Thirty five sampling sites in the four different physiographic regions of this study: Serra do Sudeste (A), Campanha (B), Campos de Cima da Serra (C) and Missões (D).

The following soil chemical characteristics were evaluated, according to Tedesco *et al.*, (1995): pH, clay, organic matter (OM), saturation by base in CEC pH 7.0 (V), phosphorus (P), potassium (K<sup>+</sup>), aluminum (Al<sup>3+</sup>), calcium (Ca<sup>2+</sup>), magnesium (Mg<sup>2+</sup>), and cation exchange capacity in pH 7 (CEC). The geolocation data of each sampling site, as well as the chemical and physical (altitude, minimum and maximum temperature, and average precipitation) characteristics are presented in Supplementary Table S1.

### *Bacterial isolation*

Nodules samples were obtained from a total of five indigenous *Desmodium* species (*Desmodium adscendens*, *D. affine*, *D. incanum*, *D. cuneatum*, and *D. uncinatum*) among thirty-five sampling sites. The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-host [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*). Nodules were collected and temporarily stored in small vials containing silica gel held under a cotton plug. Nodules were surface-sterilized by washing them in 70% ethanol for 1 min, followed by a 2% sodium hypochlorite wash for 1 min, and five serial washes with sterilized distilled water. One nodule per plant was evaluated and from each nodule one isolate was obtained by repeated streaking according to Somasegaran (1985). Bacterial isolates were routinely cultivated in yeast extract–mannitol (YEM) medium (Vincent, 1970) until growth (3 to 7 days) at 28°C. The bacterial strains were stored at –20°C in 20% (v/v) glycerol–YEM.

### *DNA preparation and sequencing of housekeeping and symbiotic genes*

Genomic DNA extraction was performed according to Ambrosini *et al.*, (2012). Sequences of one symbiotic (*nifD*, dinitrogenase alpha subunit) and three housekeeping genes (*atpD*, ATP synthase beta subunit; *dnaK*, Hsp70 class chaperone; and *recA*, recombinase A) were partially amplified according conditions presented in Supplementary Table S2. Amplicons were sequenced in a Megabace 1000 automatic sequencer using the DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Health Care) with their respective primers. Sequences were compared to sequences available in the GenBank database by BLASTn search and the accession numbers are presented in Supplementary Table S3.

### *Phylogenetic analyses and OTU attribution*

Genome sequences from type strains were retrieved from GenBank. The marker genes *atpD*, *dnaK*, and *recA* were identified in genome sequences through Blastx searches using *Escherichia coli* protein counterparts (accession numbers NP\_418188.1, NP\_414555.1, and NP\_417179.1, respectively). Also, these gene sequences of our *Bradyrhizobium* isolates were utilized as query in *Bradyrhizobium* MLSA database (Azevedo *et al.*, 2015) using CLUSTAL Omega algorithm. The five best hits of *Bradyrhizobium* type strains for each isolate gene were retrieved from the database.

The sequences of housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, and *recA*) of *Bradyrhizobium* (24), *Mesorhizobium* (10), and *Rhizobium* (1; outgroup) type strains were utilized in individual phylogenetic analyses (Supplementary Table S4). Table 1 presents the type species of *Bradyrhizobium* used in this study and their geographic origin and host plant. Only the *Bradyrhizobium* strains that had all four genes available were kept in the final phylogenetic trees (*nifD* and concatenated housekeeping genes). The accession numbers of the gene sequences utilized in this study are listed in Supplementary Table S4.

The nucleotide sequence alignments were performed using MUSCLE (Edgar 2004), implemented in MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2013) with default parameters. Positions containing gaps were excluded. Gene sequences were concatenated using phyutility.

Phylogenies based on Bayesian analyses were reconstructed using BEAST 1.8.4 software (Drummond and Rambaut, 2012) and the nucleotide substitution models were selected according to the AIC information criterion (Akaike, 1973), as implemented in jModelTest 2.1.7 software (Darriba *et al.*, 2012). The Birth-Death process was selected as a tree prior to Bayesian analysis, and 30,000,000 generations were performed with the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algorithms. TRACER 1.6 (Rambaut *et al.*, 2018) was used to check the convergence of the Markov chains and the adequate effective sample sizes (>200). TreeAnnotator 1.8.4 (Rambaut and Drummond, 2016) was used to summarize the information of each sample of trees at a burning of 10% with posterior probabilities (limit of 0.5) of the nodes in the target tree. Trees were visualized and edited using FigTree version 1.3.1 software (Rambaut, 2009) and Newick Utilities (Junier and Zdobnov, 2010).

Bayesian posterior probabilities higher than 0.95 are indicated and the isolates were colored according its plant nodule origin: orange (*D. adscendens*), red (*D. affine*), brown (*D. cuneatum*), green (*D. incanum*), and blue (*D. uncinatum*).

DNA sequences were analyzed with BioEdit version 7.0.9.0 software (Hall 1999) and the identity percentage between isolates was calculated to attribute OTUs (Operational Taxonomic Unit) at level of 98.70% for each one.

Percentage of conserved nucleotides was obtained from MEGA 7 (Tamura *et al.*, 2013) and DNASP 6 (Rozas *et al.*, 2017) for each dataset and physiographic regions (*atpD*, *dnaK*, and *recA* of sampling regions A, B, C and D).

### *Multivariate analyses*

The principal component analysis (PCA) was employed to evaluate the grouping of the thirty-five sampling sites according with ordination based in their geochemical characteristics (Supplementary Table S1). Multivariate analyses were performed in the Paleontological Statistics (PAST) software version 3.16 (Hammer *et al.*, 2001).

## **Results and discussion**

*Desmodium* spp. are important pioneer plants and *D. incanum* has been described as the most abundant native legume of fields of Southern Brazil (Boldrini, 1993; Martins, 2014) and Argentinean grasslands (Toniutti *et al.*, 2017). *Desmodium incanum* occurs in tropical areas around the world and has no major restrictions on habitats types (Tozzi *et al.*, 2016). In this study, we seek to obtain a broad sampling across the geographic ranges occupied by *Desmodium* spp., in order to evaluate the distribution of symbionts among different sites and plants.

A total of 82 nodulating strains of *Desmodium* populations originated from thirty-five sites of Southern Brazil were characterized. Bacteria were isolated from five species of *Desmodium*: *D. incanum* (61 isolates), *D. adscendens* (9 isolates), *D. affine* (8 isolates), *D. uncinatum* (4 isolates), and *D. cuneatum* (1 isolate). Samples were obtained from heterogeneous environments, including high altitude regions of the Atlantic Forest biome to grassy and arenized areas of the Pampa biome (Fig. 1). Grasslands from Pampa biome

are exclusive of this region and present indigenous legumes with potential for recovery of degraded soils, as *D. incanum* (Roesch, *et al.*, 2009; The World Bank, 2017).

*Desmodium incanum* was found in almost all sampling regions and soil types from where specimens were collected, despite the differential characteristics of soil and environment (Fig. 2 and Supplementary Table S1). The western regions [Campanha (B) and Missões (D); Fig. 1] were widespread in the PCA and did not present any type of clustering (Fig. 2). The sampled sites in Serra do Sudeste region (A) were plotted in the left side of Component 1 (PC1 accounted for 30.32% of the total variation), mainly because of low indices of organic matter, P, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. Besides, this region presents reduced ability to hold cation elements (low CEC), what may contribute for the condition of poor soil in organic matter and nutrients (BRADY, 1984). The high altitude sites of Campos de Cima da Serra (C) (Atlantic Forest) occupied the upper side of Component 2 (PC2 23.33%) and presented the highest Al<sup>3+</sup> content.

The number of bacterial isolates was variable between the sites from different physiographic regions. A greater number of isolates were obtained from regions A and B (30 and 25, respectively), which present sites with average precipitation lower than regions C and D (with 14 and 13 isolates, respectively). *Desmodium incanum* has a high capacity for development in dry areas and it was reported as a drought-tolerant species (Martins, 2014; Midega *et al.*, 2017). This characteristic can be related to the high number of collected specimens from regions A and B, which are part of Pampa, a biome known by the presence of several arenized areas (Roesch *et al.*, 2009).

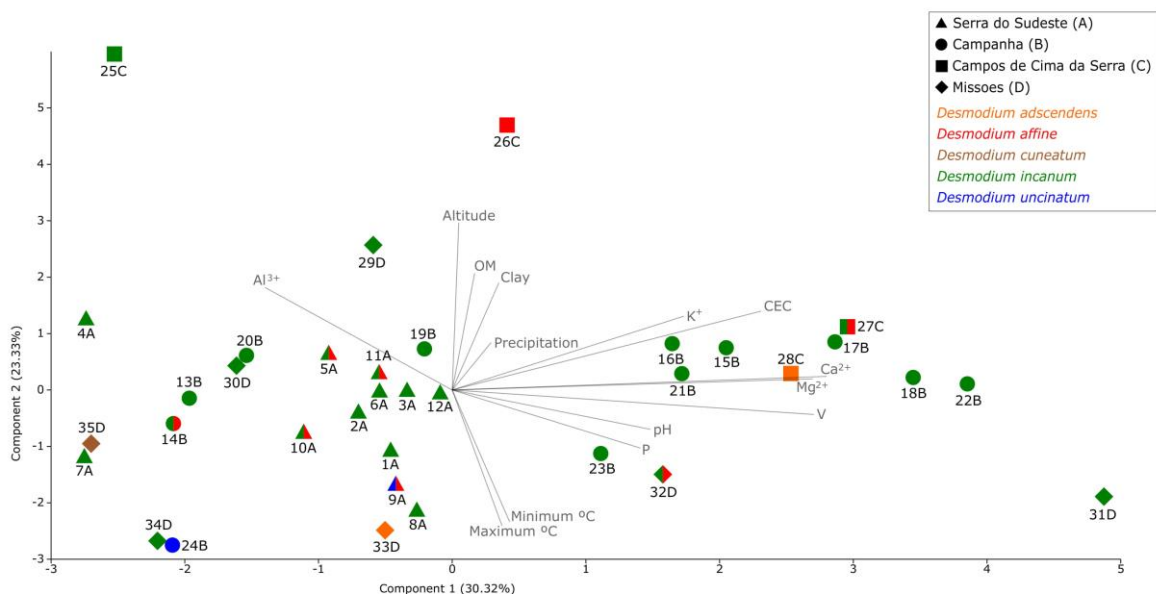


Fig. 2: Principal component analysis (PCA) loaded with physicochemical characteristics of the thirty-five sites sampled in this study. Additional details can be found in Table S1.

According to preliminary analyses in GenBank, the bacterial isolates obtained in this study belonged to the genus *Bradyrhizobium*, which has been considered as the ancestor of all rhizobia (Provorov and Vorob'ev 2000; Wang and Martínez-Romero 2000; Hungria *et al.*, 2015; Sprent *et al.*, 2017) with probable origin in tropics (Lloret and Martínez-Romero 2005; Delamuta *et al.*, 2012; Hungria *et al.*, 2015; Parker *et al.*, 2015). Due to its high conservation, 16S rRNA gene sequences may not be appropriate to discriminate bacteria at the species level (Fox *et al.*, 1992; Chan *et al.*, 2012; Bach *et al.*, 2017; Sant'Anna *et al.*, 2017), including closely related strains of *Bradyrhizobium* (Delamuta *et al.*, 2012; Azevedo *et al.*, 2015). Therefore, different gene markers are utilized in MLSA analyses to access the taxonomy of *Bradyrhizobium* spp. In this study, three housekeeping genes were selected: *atpD*, *dnaK*, and *recA* (Stępkowski *et al.*, 2003; Menna *et al.*, 2009; Delamuta *et al.*, 2012; Parker *et al.*, 2015).

Datasets for each marker gene present different number of isolates from *Desmodium* (Supplementary Table S3), because not all isolates had all genes amplified. Phylogenetic analyses were initially performed with each housekeeping gene, and the reconstruction of individual phylogenies resulted in trees with dissimilar topologies (Supplementary Fig. S1, S2, and S3). In general, groups not always were formed according to their host plant in the phylogenies of *atpD* (60 isolates), *dnaK* (69 isolates), and *recA* genes (55 isolates) (Supplementary Fig. S1, S2, and S3, respectively). Even with low number of isolates, bacterial groups derived from *D. adscendens* and *D. affine* were formed at high support in *recA* phylogeny, despite of its differential geographic origin (Supplementary Fig. S3). According these individual phylogenies, plant-bacteria relationships are not species-specific, since many bacterial groups were composed of isolates from different plant species, and *Desmodium* species were colonized by different bacterial lineages. Moreover, bacterial groups were broadly incongruent among trees.

Therefore, in order to have a better supported phylogenetic tree, we reconstructed the phylogeny based on concatenated housekeeping genes for isolates which had all the three housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, and *recA*). From a total of 31 isolates having these genes, five of them did not have the *nifD* gene amplified and were excluded of the concatenated housekeeping genes phylogeny to facilitate comparisons with *nifD* tree.

The isolates (B38.1 Dinc and B38.2 Dinc) formed a cluster with *B. neotropicale* (Brazil) and *B. iriomotense* (Japan) (Figure 3). The isolates A40.1 Daf and A40.2 Daf were closely related to *B. embrapense* and other *Bradyrhizobium* species. *Bradyrhizobium embrapense* SEMIA 6208<sup>T</sup> was isolated from *Desmodium heterocarpon* in Colombia, and it has been used in commercial inoculants for this legume in Brazil since 1988 (Delamuta *et al.*, 2015).

Menna *et al.*, (2009) found two large groups of *B. japonicum* and *B. elkanii* in both single and concatenated analyses of the 16S rRNA gene and ITS sequences, and also in MLSA phylogeny of *atpD*, *dnaK*, *glnII*, and *recA* genes. The first group included type and/or reference strains of *B. japonicum*, *B. betae*, *B. liaoningense*, *B. canariense*, *B. yuanmingense*, and *B. diazoefficiens*; while the second group included strains related to *B. elkanii*, *B. pachyrhizi*, and *B. jicamae*.

The group related to OTUs 9, 10, 11, and 12 was entirely formed by isolates from *D. incanum*, with high potential of being composed of new *Bradyrhizobium* species because it is not directly related to references strains used in the analysis. Moreover, these isolates presented identity values lower than 98.70% in relation to *Bradyrhizobium* type strains. This cut-off is rather conservative since it is utilized as a criterion of species circumscription for 16S rRNA gene (Azevedo *et al.*, 2015). Members of this group presented identity values between 89.12 and 93.91% with *B. jicamae*, *B. lablabi*, and *B. cytisi* (Table 3). Isolates that not grouped with major clusters presented the lower identity values in this database, A5.6 Dinc (83.36%, *B. cytisi*) and A30.2 Daf (83.41%, *B. elkanii*).

The isolates A1.4 Dinc and A1.5 Dinc were not included in analysis of concatenated genes because their *dnaK* gene partial sequences grouped with sequences of the genus *Mesorhizobium* in our phylogenetic analysis (Supplementary Fig. S2), however this result is not an usual case of HGT. The *dnaK* gene has been used and proposed as an adequate marker for bacterial phylogeny (Stępkowski *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2015; Parker *et al.*, 2015), and taxonomic markers should not be prone to HGT. However, Hsp70 homologues were detected in HGT events for some members of the domain *Archaea* (Petitjean *et al.*, 2012), as well as this gene can be found with more than one copy in certain bacteria, as *Escherichia coli* (Nimura *et al.*, 1994; Seaton and Vickery, 1994; Gribaldo *et al.*, 1999). Although many studies have proposed *dnaK* as an adequate marker for phylogeny of bacterial species (Stępkowski *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2015; Parker *et*

*al.*, 2015), incongruences between *dnaK* and rRNA genes have already been found for *Bradyrhizobium* (Parker, 2004). In this way, considering that even the standard bacterial taxonomic marker 16S rRNA can be horizontally transferred (Sato and Miyazaki 2017), we cannot discard the hypothesis of the gene *dnaK* of these *Bradyrhizobium* strains were acquired from *Mesorhizobium* strain.

The *nifD* gene exhibited higher nucleotide diversity than housekeeping genes in three regions (B, C, and D) and in relation to all datasets (A+B+C+D) (Table 2). The nucleotide diversity of isolates was higher for *recA* than *atpD* and *dnaK* in all sampled regions, as well as *recA* presented higher nucleotide diversity than *nifD* in region A. Although the lack of data with statistical significance and possibility of a sampling artifact, we can suggest that symbionts isolated from *Desmodium* populations of Serra do Sudeste (A) and Campanha (B) have higher taxonomic diversity than *Bradyrhizobium* spp. of other sampled regions (high  $\pi$ ). The sites from regions A and B are localized in the Pampa biome, an area of extensive arenized soils. According to Parker *et al.*, (2015), nucleotide diversity is a potential indicator of hosts specialized or promiscuous in symbiont acquisition. Costa *et al.*, (2014b) reported the selection of PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) by plants grown in poor soils in order to enhance its nutritional status. The greater presence of *D. incanum* in regions A and B (Fig. 2) can then be associated with high *Bradyrhizobium* diversity in these poor soils, which were diverse and widespread in the PCA.

In the comparison between phylogenies of *nifD* (Fig. 4) and concatenated genes (Fig. 3), isolates from *Desmodium* had distinct distribution and the trees were not congruent. Isolates from *D. adscendens* (OTUs 4 to 7) formed a monophyletic group with high support *nifD* phylogeny, but they are separated in phylogeny of concatenated genes. The large group 2 formed by *D. incanum* isolates from regions A and B (OTUs 9, 10, 11, and 12, Fig. 3) had its members separated in *nifD* tree. Since HGT is frequently reported for symbiotic genes, we hypothesize that specificity plant-bacteria can have more relation with SI than the taxonomic positions of strains.



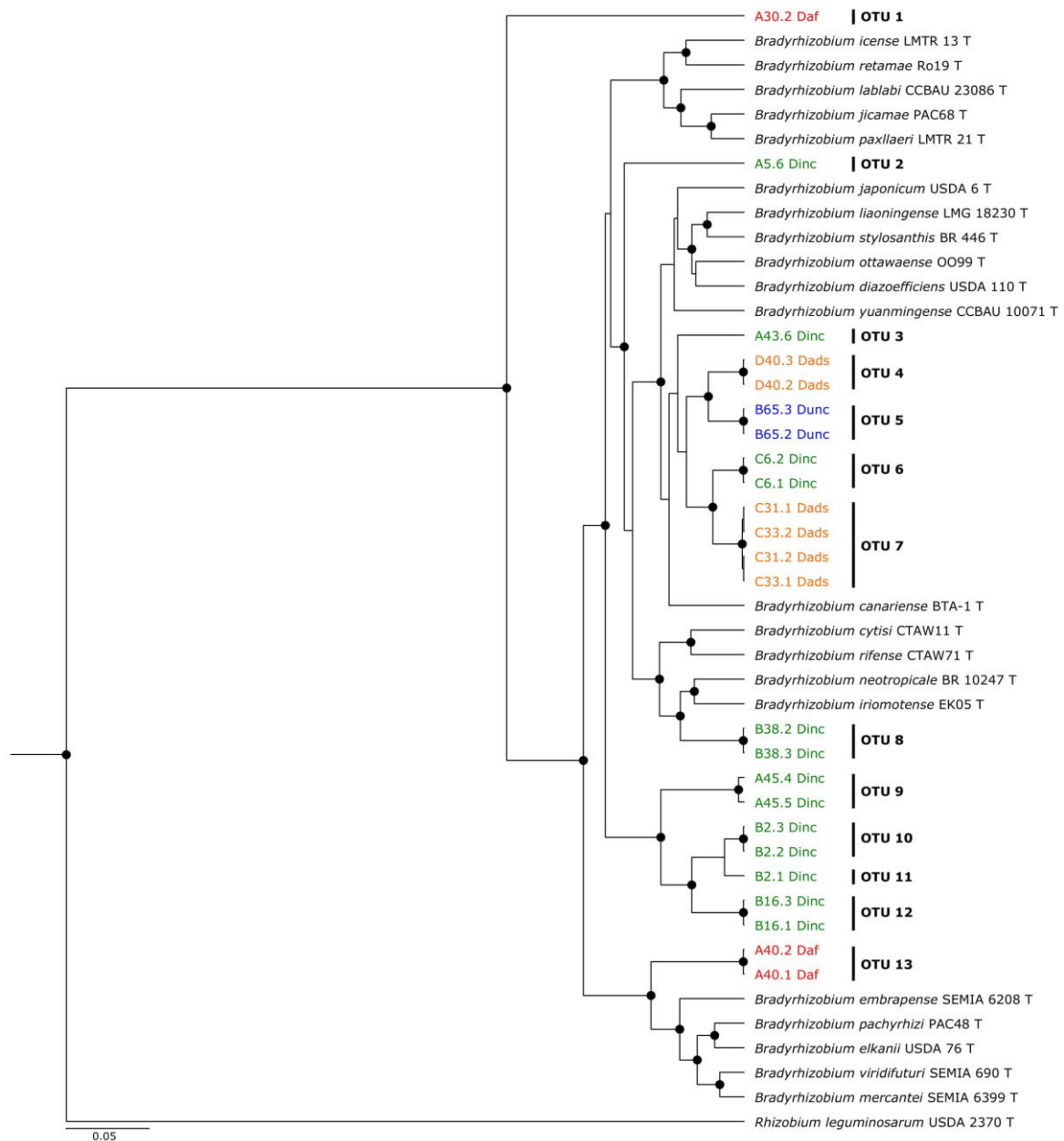


Fig. 3: Bayesian tree for three concatenated housekeeping gene fragments (1,034 sites of *atpD*, *dnaK* and *recA* genes) in 24 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+I+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. Different bacterial OTUs are indicated according to their identity percentage higher than 98.70%. The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-hosts [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*)].

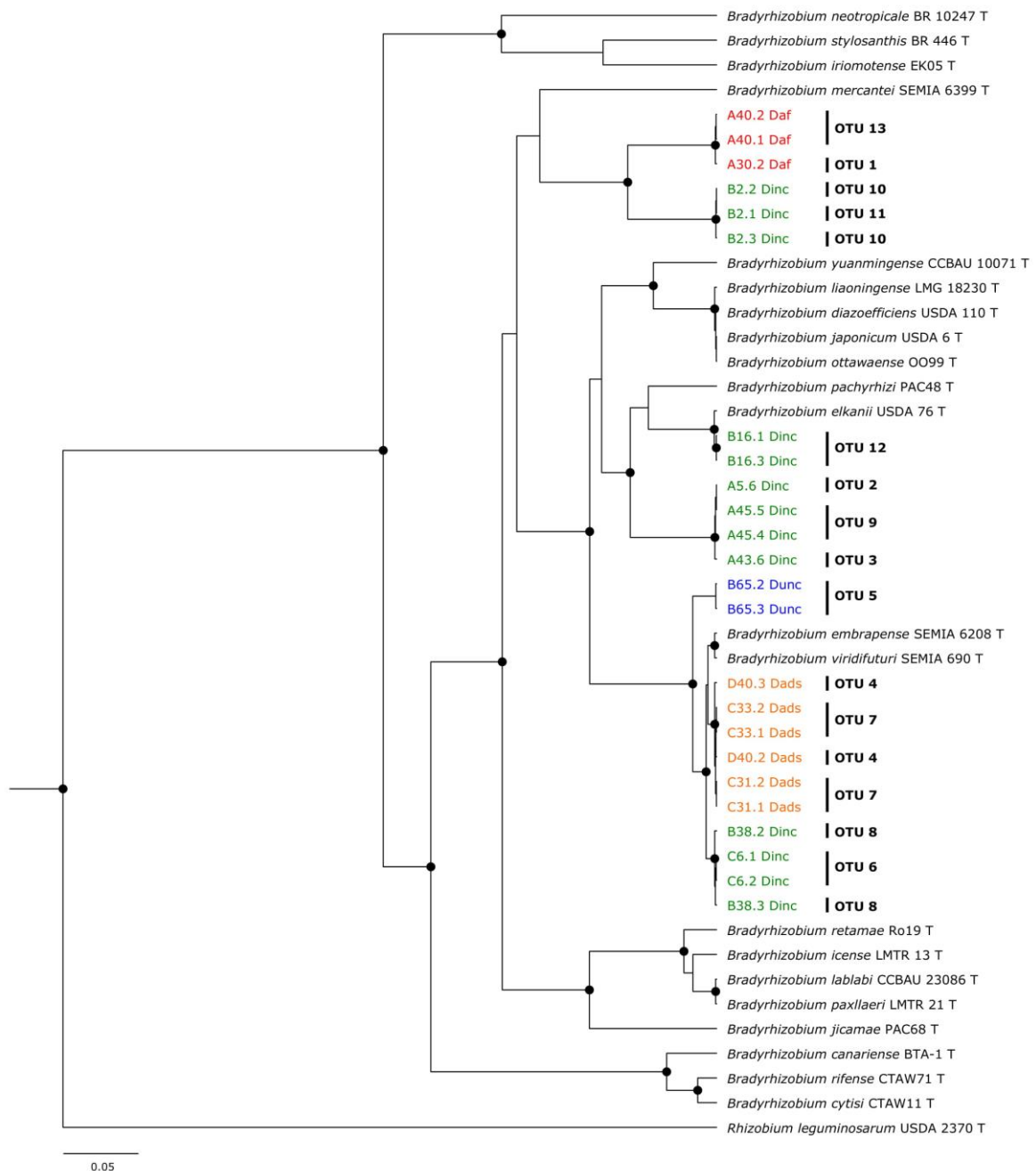


Fig. 4: Phylogeny reconstructed based on *nifD* gene inferred by Bayesian analysis using 747 sites in 24 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+I+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. Different bacterial OTUs are indicated according to their identity percentage higher than 98.70%. The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-hosts [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*)]. Figure derived from Newick Utilities based in the Supplementary Fig. S4

The horizontal transfer for nitrogen fixation genes is frequently associated to the incongruence between housekeeping and symbiotic trees (Parker and Rousteau 2014; Gordon *et al.*, 2016; Parker *et al.*, 2015). The selective pressure and the high nucleotide substitution rate of symbiotic genes is a common event in the evolution of rhizobia (Ho-

Huu *et al.*, 2012; Werner *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018). For bacteria this genomic malleability may often confer a strong selective advantage for recipient cells (Parker 2012), since generalist strategies may benefit its partners with diversity of symbionts, hosts and habitats. However, studies demonstrated that plant species can perform better with partner genotypes isolated from conspecifics, as predicted by the co-adaptation hypothesis (Ehinger *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2018).

A better understanding of bacterial communities involved in symbiotic nitrogen fixation can contribute to the development of alternatives for recovery of degraded soils and the monitoring of threatened environments. This study was focused in symbiotic diversity of *Desmodium* spp. collected in fields of southern Brazil, which are highly vulnerable due to intensive human activities as the monoculture of soybean [*Glycine max* (L.)] and *Eucalyptus* spp. The *Bradyrhizobium* symbionts associated with indigenous *Desmodium* of this area presented high diversity; mainly those from Serra do Sudeste (A) and Campanha (B), regions of Pampa biome. Our results also indicate that the relationships between *Bradyrhizobium* and *Desmodium* spp. are not species-specific, although there are a preference of bacterial groups formed according its plant-host in *nifD* tree. Moreover, distinct clades of isolates were not grouped closer to reference species in phylogenetic analyses and presented low identity percentage in results from MLSA database. These isolates presented potential to form a new bacterial species, which was probably originated in this continent. Future studies will require more extensive evaluations and can elucidate this inference.

## References

- Akaike, H. (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Pretov, B.N., Csaki, F., (Eds.), 2nd International Symposium on Information Theory, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, pp. 267–81.
- Allen, O.N., Allen, E.K. (1981) The Leguminosae: A source book of characteristics, uses, and nodulation. First ed., University of Wisconsin Press, Madison, USA.
- Ambrosini, A., Beneduzi, A., Stefanski, T., Pinheiro, F.G., Vargas, L.K., Passaglia, L.M.P. (2012) Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil* 356(1–2), 245–64, Doi: 10.1007/s11104-011-1079-1.
- Azevedo, H., Lopes, F.M., Silla, P.R., Hungria, M. (2015) A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. *BMC Genomics* 16(5), 1–11, Doi: 10.1186/1471-2164-16-S5-

S10.

- Bach, E., Sant'Anna, F.H., Passos, J.F.M., Balsanelli, E., Baura, V., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., Passaglia, L.M.P. (2017) Detection of misidentifications of species from the *Burkholderia cepacia* complex and description of a new member, the soil bacterium *Burkholderia catarinensis* sp. nov. *Pathog. Dis.* 75(6), Doi: 10.1093/femspd/ftx076.
- Bashan, Y., Salazar, B.G., Moreno, M., Lopez, B.R., Linderman, R.G. (2012) Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *J. Environ. Manage.* 102, 26–36, Doi: 10.1016/j.jenvman.2011.12.032.
- Beukes, C.W., Stepkowski, T., Venter, S.N., Clapa, T., Phalane, F.L., le Roux, M.M., Steenkamp, E.T. (2016) Crotonaceae and Genisteae of the South African great escarpment are nodulated by novel *Bradyrhizobium* species with unique and diverse symbiotic loci. *Mol. Phylogenet. Evol.* 100, 206–18, Doi: 10.1016/j.ympev.2016.04.011.
- Boldrini, I.I. (1993) Dinâmica de vegetação de uma pastagem natural sob diferentes níveis de oferta de forragem e tipos de solos, Depressão Central, RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Brady, N.C. (1984) The nature and properties of soils. Ninth ed., Macmillan Publishing Company, New York, USA.
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., Bedmar, E.J. (2011) *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61(12), 2922–7, Doi: 10.1099/ijs.0.027649-0.
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Barrijal, S., Velázquez, E., Bedmar, E.J. (2012) *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Syst. Appl. Microbiol.* 35(5), 302–5, Doi: 10.1016/j.syapm.2012.06.001.
- Chan, J.Z.M., Halachev, M.R., Loman, N.J., Constantinidou, C., Pallen, M.J. (2012) Defining bacterial species in the genomic era: Insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiol.* 12(302), Doi: 10.1186/1471-2180-12-302.
- Chang, Y.L., Yu Wang, J., Tao Wang, E., Can Liu, H., Sui, X.H., Chen, W.X. (2011) *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61(10), 2496–502, Doi: 10.1099/ijs.0.027110-0.
- Costa, M.F.B., Paulino, J.V., Marinho, C R., Leite, V.G., Pedersoli, G.D., Teixeira, S.P. (2014a) Stigma diversity in tropical legumes with considerations on stigma classification. *Bot. Rev.* 80(1), 1–29, Doi: 10.1007/s12229-014-9131-5.
- Costa, P.B., Granada, C.E., Ambrosini, A., Moreira, F., De Souza, R., Dos Passos, J.F.M., Arruda, L., Passaglia, L.M.P. (2014b) A model to explain plant growth promotion traits: A multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates. *PLoS One* 9(12), 1–25, Doi: 10.1371/journal.pone.0116020.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. (2012) jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9(8), 772, Doi: 10.1038/nmeth.2109.
- Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Araújo, J.L.S., Rouws, L.F.M., Zilli, J.É., Parma, M.M., Melo, I.S., Hungria, M. (2016) *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66(8), 3078–87, Doi: 10.1099/ijsem.0.001148.

- Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Menna, P., Bangel, E.V., Hungria, M. (2012) Multilocus Sequence Analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Brazilian J. Microbiol.* 43(2), 698–710, Doi: 10.1590/S1517-83822012000200035.
- Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I.S., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3342–51, Doi: 10.1099/ijs.0.049130-0.
- Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Parma, M.M., Melo, I.S., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2015) *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov. nitrogenfixing symbionts of tropical forage legumes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65(12), 4424–33, Doi: 10.1099/ijs.0.000592.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29(8), 1969–73, Doi: 10.1093/molbev/mss075.
- Durán, D., Rey, L., Mayo, J., Zúñiga-Dávila, D., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Martínez-Romero, E., Ormeño-Orrillo, E. (2014) *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2072–2078, Doi: 10.1099/ijs.0.060426-0.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5), 1792–7, Doi: 10.1093/nar/gkh340.
- Ehinger, M., Mohr, T.J., Starcevich, J.B., Sachs, J.L., Porter, S.S., Simms, E.L. (2014) Specialization-generalization trade-off in a *Bradyrhizobium* symbiosis with wild legume hosts. *BMC Ecol.* 14(8), 1–18, Doi: 10.1186/1472-6785-14-8.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P. (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42(1), 166–70, Doi: 10.1099/00207713-42-1-166.
- Galaviz, C., Lopez, B.R., De-Bashan, L.E., Hirsch, A.M., Maymon, M., Bashan, Y. (2018) Root growth improvement of mesquite seedlings and bacterial rhizosphere and soil community changes are induced by inoculation with plant growth-promoting bacteria and promote restoration of eroded desert soil. *L. Degrad. Dev.*, 1–14, Doi: 10.1002/ldr.2904.
- Giller, K., Herridge, D., Sprent, J.I. (2016) The legume-rhizobia symbiosis and assessing the need to inoculate. In: Howieson, J. G., Dilworth, M. J., (Eds.), *Working with rhizobia*, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp. 15–24.
- Gordon, B.R., Klinger, C.R., Weese, D.J., Lau, J.A., Burke, P. V., Dentinger, B.T.M., Heath, K.D. (2016) Decoupled genomic elements and the evolution of partner quality in nitrogen-fixing rhizobia. *Ecol. Evol.* 6(5), 1317–27, Doi: 10.1002/ece3.1953.
- Gribaldo, S., Lumia, V., Creti, R., Conway De Macario, E., Sanangelantoni, A., Cammarano, P. (1999) Discontinuous occurrence of the hsp70 (dnaK) gene among *Archaea* and sequence features of HSP70 suggest a novel outlook on phylogenies inferred from this protein. *J. Bacteriol.* 181(2), 434–43.
- Gu, J., Wang, E.T., Chen, W.X. (2007) Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. *Lett. Appl. Microbiol.* 44(3), 286–92, Doi:

- 10.1111/j.1472-765X.2006.02071.x.
- Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M.H., Abdelmoumen, H., Quiñones, M.A., El Idrissi, M.M., Velázquez, E., Fernández-Pascual, M., Bedmar, E.J., Peix, A. (2013) Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. Syst. Appl. Microbiol. 36(4), 218–23, Doi: 10.1016/j.syapm.2013.03.001.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95–8, Doi: citeulike-article-id:691774.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. a. T., Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. Palaeontol. Electron. 4(1), 1–9, Doi: 10.1016/j.bcp.2008.05.025.
- Helene, L.C.F., Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Hungria, M. (2017) *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67(6), 1827–34, Doi: 10.1099/ijsem.0.001870.
- Helene, L.C.F., Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Roge, M.A., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2015) *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 4441–8, Doi: 10.1099/ijsem.0.000591.
- Ho-Huu, J., Ronfort, J., De Mita, S., Bataillon, T., Hochu, I., Weber, A., Chantret, N. (2012) Contrasted patterns of selective pressure in three recent paralogous gene pairs in the *Medicago* genus (L.). BMC Evol. Biol. 12(1), Doi: 10.1186/1471-2148-12-195.
- Hungria, M., Menna, P., Delamuta, J.R.M. (2015) *Bradyrhizobium*, the ancestor of all Rhizobia: phylogeny of housekeeping and nitrogen-fixation genes. In: Bruijn, F.J., (Ed.), Biological Nitrogen Fixation, volume 1. First ed., John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, pp. 191–202.
- Islam, M.S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., Seki, T. (2008) *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., Isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72(6), 1416–29, Doi: 10.1271/bbb.70739.
- Jordan, D.C. (1982) NOTES: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol. 32(1), 136–9, Doi: 10.1099/00207713-32-1-136.
- Junier, T., Zdobnov, E.M. (2010) The Newick utilities: high-throughput phylogenetic tree processing in the UNIX shell. Bioinformatics 26(13), 1669–70, Doi: 10.1093/bioinformatics/btq243.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpō, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., Tabata, S. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Res. 9(6), 189–97, Doi: 10.1093/dnares/9.6.189.
- Khan, Z.R., Pickett, J.A., Berg, J. van den., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M. (2000) Exploiting chemical ecology and species diversity: stem borer and striga control for

- maize and sorghum in Africa. *Pest Manag. Sci.* 56(11), 957–62, Doi: 10.1002/1526-4998(200011)56:11<957::AID-PS236>3.0.CO;2-T.
- Khan, Z.R., Pickett, J.A., Hassanali, A., Hooper, A.M., Midega, C.A.O. (2008) *Desmodium* species and associated biochemical traits for controlling *Striga* species: present and future prospects. *Weed Res.* 48(4), 302–6, Doi: 10.1111/j.1365-3180.2008.00641.x.
- Khan, Z.R., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Hassanali, A., Midega, C.A.O. (2006) Combined control of *Striga hermonthica* and stemborers by maize-*Desmodium* spp. intercrops. *Crop Prot.* 25(9), 989–95, Doi: 10.1016/j.cropro.2006.01.008.
- Kuykendall, L.D., Saxena, B., Devine, T.E., Udell, S.E. (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp.nov. *Can. J. Microbiol.* 38(6), 501–5, Doi: 10.1139/m92-082.
- Lafay, B., Burdon, J.J. (1998) Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in Southeastern Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10), 3989–97.
- Lima, L.C.P., de Queiroz, L.P., Tozzi, A.M.G.A., Lewis, G.P. (2014a) A taxonomic revision of *Desmodium* (Leguminosae, Papilionoideae) in Brazil. *Phytotaxa* 169(1), 1–119, Doi: 10.11646/phytotaxa.169.1.1.
- Lima, L.C., Oliveira, M.L.A.A., & Tozzi, A.M.G.A. (2014b) *Desmodium*. In: Forzza, R.C. et Al. (Eds.). *Lista de Espécies da flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22930>. [accessed April 14, 2018].
- Lloret, L., Martínez-Romero, E. (2005) Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47(1–2), 43–60.
- Ma, X., Zheng, C., Hu, C., Rahman, K., Qin, L. (2011) The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 138(2), 314–32, Doi: 10.1016/j.jep.2011.09.053.
- Martins, A.C. (2014) Mecanismos de tolerância ao déficit hídrico em espécies de forrageiras nativas dos campos sul-brasileiros. Universidade Federal de Pelotas - UFP. Pelotas, RS.
- Menna, P., Barcellos, F.G., Hungria, M. (2009) Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59(12), 2934–50, Doi: 10.1099/ijs.0.009779-0.
- Menna, P., Hungria, M. (2011) Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: Supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61(12), 3052–67, Doi: 10.1099/ijs.0.028803-0.
- Midega, C.A.O., Wasonga, C.J., Hooper, A.M., Pickett, J.A., Khan, Z.R. (2017) Drought-tolerant *Desmodium* species effectively suppress parasitic striga weed and improve cereal grain yields in western Kenya. *Crop Prot.* 98, 94–101, Doi: 10.1016/j.cropro.2017.03.018.
- Moreira, F.M.S. (1991) Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Rio de Janeiro.
- Mwangi, D.M., Wambugu, C. (2003) Adoption of forage legumes : the case of *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* in central Kenya. *Trop. Grasslands* 37, 227–38.
- Nimura, K., Yoshikawa, H., Takahashi, H. (1994) Identification of *dnaK* multigene family

- in *Synechococcus* sp. PCC7942. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201(1), 466–71, Doi: 10.1006/bbrc.1994.1724.
- Ohashi, H. (2005) Tribe Desmodieae. In: Lewis, G. P., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M., (Eds.), *Legumes of the World*, Royal Botanic Gardens, Kew, Missouri, pp. 433–5.
- Parker, M.A. (2002) Bradyrhizobia from wild *Phaseolus*, *Desmodium*, and *Macroptilium* species in northern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4), 2044–8, Doi: 10.1128/AEM.68.4.2044-2048.2002.
- Parker, M.A. (2003) A widespread Neotropical *Bradyrhizobium* lineage associated with *Machaerium* and *Desmodium* (Papilionoideae). *Plant Soil* 254(2), 263–8, Doi: 10.1023/A:1025523818780.
- Parker, M.A. (2012) Legumes select symbiosis island sequence variants in *Bradyrhizobium*. *Mol. Ecol.* 21(7), 1769–78, Doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05497.x.
- Parker, M.A., Jankowiak, J.G., Landrigan, G.K. (2015) Diversifying selection by Desmodiinae legume species on *Bradyrhizobium* symbionts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91(7), 1–8, Doi: 10.1093/femsec/fiv075.
- Parker, M.A., Rousteau, A. (2014) Mosaic origins of *Bradyrhizobium* legume symbionts on the Caribbean island of Guadeloupe. *Mol. Phylogenet. Evol.* 77(1), 110–5, Doi: 10.1016/j.ympev.2014.04.011.
- Pérez-Fernández, M.A., Calvo-Magro, E., Valentine, A. (2016) Benefits of the symbiotic association of shrubby legumes for the rehabilitation of degraded soils under Mediterranean climatic conditions. *L. Degrad. Dev.* 27(2), 395–405, Doi: 10.1002/ldr.2457.
- Petitjean, C., Moreira, D., López-García, P., Brochier-Armanet, C. (2012) Horizontal gene transfer of a chloroplast DnaJ-Fer protein to Thaumarchaeota and the evolutionary history of the DnaK chaperone system in Archaea. *BMC Evol. Biol.* 12(226), 1–14, Doi: 10.1186/1471-2148-12-226.
- Provorov, N.A., Vorob'ev, N.I. (2000) Evolutionary genetics of rhizobia: molecular and population aspects. *Genetika* 36(12), 1573–87, Doi: 10.1023/A:1009029703470.
- Rambaut, A. (2009) FigTree version 1.3.1 [computer program] <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Rambaut, A., Drummond, A.J. (2016) TreeAnnotator version 1.8.4 [computer program] <http://beast.community/treeannotator>.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M.A. (2018) Tracer version 1.7 [computer program] <http://beast.community/tracer>.
- Ramírez-Bahena, M.H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Willems, A., Velázquez, E. (2009) *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59(8), 1929–34, Doi: 10.1099/ijs.0.006320-0.
- Requena, N., Perez-solis, E., Jeffries, P., Barea, J. (2001) Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(2), 495–8, Doi: 10.1128/AEM.67.2.495.
- Rivas, R., Willems, A., Palomo, J.L., García-Benavides, P., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Gillis, M., Velázquez, E. (2004) *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(4), 1271–5, Doi: 10.1099/ijs.0.02971-0.



- Roesch, L.F.W., Vieira, F.C.B., Pereira, V.A., Shünemann, A.L., Teixeira, I.F., Senna, A.J.T., Stefenon, V.M. (2009) The Brazilian Pampa: A fragile biome. *Diversity* 1, 182–98, Doi: 10.3390/d1020182.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A. (2017) DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.*, 1–4, Doi: 10.1093/molbev/msx248.
- Sant’Anna, F.H., Ambrosini, A., de Souza, R., de Carvalho Fernandes, G., Bach, E., Balsanelli, E., Baura, V., Brito, L.F., Wendisch, V.F., Pedrosa, F.O., de Souza, E.M., Passaglia, L.M.P. (2017) Reclassification of *Paenibacillus riograndensis* as a genomovar of *Paenibacillus sonchi*: Genome-based metrics improve bacterial taxonomic classification. *Front. Microbiol.* 8(1849), 1–13, Doi: 10.3389/fmicb.2017.01849.
- Santos, H.G., Jacomine, P.K.T., Anjos, L.H.C., Oliveira, V.A., Lumbreras, J.F., Coelho, M.R., Almeida, J.A., Cunha, T.J.F., Oliveira, J.B. (2014) Sistema brasileiro de classificação de Solos. 4th ed., Embrapa, Brasília, DF.
- Seaton, B.L., Vickery, L.E. (1994) A gene encoding a DnaK/hsp79 homolog in *Escherichia coli* (chaperone/heat shock cognate protein/ferredoxin operon). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 2066–70.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J. (1985) NifTAL Project and MIRCEN: Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources. Hawaii.
- Sprent, J.I., Ardley, J., James, E.K. (2017) Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytol.* 215(1), 40–56, Doi: 10.1111/nph.14474.
- Stępkowski, T., Czaplínska, M., Miedzinska, K., Moulin, L. (2003) The variable part of the dnaK gene as an alternative marker for phylogenetic studies of Rhizobia and related Alpha Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 26(4), 483–94, Doi: 10.1078/072320203770865765.
- Stępkowski, T., Moulin, L., Krzyaska, A., McInnes, A., Law, I.J., Howieson, J. (2005) European Origin of Bradyrhizobium populations infecting Lupins and Serradella in soils of western Australia and South Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11), 7041–52, Doi: 10.1128/AEM.71.11.7041.
- Stępkowski, T., Watkin, E., McInnes, A., Gurda, D., Gracz, J., Steenkamp, E.T. (2012) Distinct *Bradyrhizobium* communities nodulate legumes native to temperate and tropical monsoon Australia. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63(2), 265–77, Doi: 10.1016/j.ympev.2011.12.020.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12), 2725–9, Doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Tedesco, M.J., Gianello, C., Bissani, C.A., Bohnen, H., Volkweiss, S.J. (1995) Análise de solo, plantas e outros materiais. 2nd ed., Departamento de Solos- UFRGS, Porto Alegre.
- The World Bank (2017) Promoting sustainable development in Brazil’s Pampa biome. <http://www.worldbank.org/en/results/2017/04/11/promoting-sustainable-development-in-brazils-pampa-biome>. [accessed December 11, 2017].
- Tian, C.F., Zhou, Y.J., Zhang, Y.M., Li, Q. Q., Zhang, Y.Z., Li, D.F., Wang, S., Wang, J., Gilbert, L. B., Li, Y. R., Chen, W .X. (2012) Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(22), 8629–34, Doi:

- 10.1073/pnas.1120436109.
- Toniutti, M.A., Fornasero, L.V., Albicoro, F.J., Martini, M.C., Draghi, W., Alvarez, F., Lagares, A., Pensiero, J.F., Del Papa, M.F. (2017) Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from *Desmodium incanum* DC in Argentina: Phylogeny, biodiversity and symbiotic ability. *Syst. Appl. Microbiol.* 40(5), 297–307, Doi: 10.1016/j.syapm.2017.04.004.
- Tozzi, A.M.G.A. (2016) Subfamília Papilionoideae. In: Tozzi, A.M.G.A., Melhem, T.S., Forero, E., Fortuna-Perez, A.P., Wanderley, M.G.L., Martins, S.E., Romanini, R.P., Pirani, J.R., Melo, M.M.R.F. de, Kirizawa, M., Yano, O., Cordeiro, I., (Eds.), *Flora Fanerogâmica do estado de São Paulo Online*. 8th ed., Governo do Estado de São Paulo, pp. 167–397.
- Vincent, J.M., Programme, I.B. (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Burgess and Son Ltd, Berkshire, Great Britain.
- Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Werner, D., Martínez-Romero, E. (2005) *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta . *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(2), 569–75, Doi: 10.1099/ijs.0.63292-0.
- Wang, E.T., Martínez-Romero, E. (2000) Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes. In: Triplett, E.W., (Ed.), *Prokaryotic Nitrogen Fixation: a model system for analysis of a biological process*, Horizon Scientific, Wymondham, UK, pp. 177–86.
- Wernegreen, J.J., Riley, M.A. (1999) Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: A case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Mol. Biol. Evol.* 16(1), 98–113, Doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026041.
- Werner, G.D.A., Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H.C., Kiers, E.T. (2015) Evolutionary signals of symbiotic persistence in the legume–rhizobia mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112(33), 10262–9, Doi: 10.1073/pnas.1424030112.
- Xu, K.W., Zou, L., Penttinen, P., Zeng, X., Liu, M., Zhao, K., Chen, C., Chen, Y.X., Zhang, X. (2016) Diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Desmodium* spp. in Panxi, Sichuan, China. *Syst. Appl. Microbiol.* 39(1), 33–40, Doi: 10.1016/j.syapm.2015.10.005.
- Xu, L.M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., Fan, H. (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. , isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(4), 706–11, Doi: 10.1099/00207713-45-4-706.
- Yao, Z.Y., Kan, F.L., Wang, E.T., Wei, G.H., Chen, W.X. (2002) Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(2002), 2219–30, Doi: 10.1099/ijs.0.01408-0.
- Yu, X., Cloutier, S., Tambong, J.T., Bromfield, E.S.P. (2014) *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 3202–7, Doi: 10.1099/ijs.0.065540-0.
- Zhang, Y.M., Li, Y., Chen, W.F., Wang, E.T., Sui, X.H., Li, Q.Q., Zhang, Y.Z., Zhou, Y.G., Chen, W.X. (2012) *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. *Int. J. Syst.*

- Evol. Microbiol. 62(8), 1951–7, Doi: 10.1099/ijms.0.034546-0.
- Zhao, R., Liu, L.X., Zhang, Y.Z., Jiao, J., Cui, W.J., Zhang, B., Wang, X.L., Li, M.L., Chen, Y., Xiong, Z.Q., Chen, W X., Tian, C.F. (2018) Adaptive evolution of rhizobial symbiotic compatibility mediated by co-evolved insertion sequences. ISME J. 12(1), 101–11, Doi: 10.1038/ismej.2017.136.
- Zilli, J.E., Baraúna, A.C., da Silva, K., De Meyer, S.E., Farias, E.N.C., Kaminski, P.E., da Costa, I.B., Ardley, J.K., Willems, A., Camacho, N.N., Dourado, F. dos S., O’Hara, G. (2014) *Bradyrhizobium neotropicale* sp. nov., isolated from effective nodules of *Centrolobium paraense*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 3950–7, Doi: 10.1099/ijms.0.065458-0.

## Figures (captions)

Fig. 1: Thirty five sampling sites in the four different physiographic regions of this study: Serra do Sudeste (A), Campanha (B), Campos de Cima da Serra (C) and Missões (D).

Fig. 2: Principal component analysis (PCA) loaded with physicochemical characteristics of the thirty-five sites sampled in this study. Additional details can be found in Table S1.

Fig. 3: Bayesian tree for three concatenated housekeeping gene fragments (1,034 sites of *atpD*, *dnaK* and *recA* genes) in 24 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+I+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. Different bacterial OTUs are indicated according to their identity percentage higher than 98.70%. The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-hosts [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*)].

Fig. 4: Phylogeny reconstructed based on *nifD* gene inferred by Bayesian analysis using 747 sites in 24 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+I+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. Different bacterial OTUs are indicated according to their identity percentage higher than 98.70%. The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-hosts [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*)]. Figure derived from Newick Utilities based in the Supplementary Fig. S4

Fig. S1: Phylogeny reconstructed based on *atpD* gene inferred by Bayesian analysis using 420 sites in 58 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+I+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. Yellow posterior probability indicates support of two major *Bradyrhizobium* groups. Different bold lines indicate bacterial subgroups (left). The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D,

as above) and plant-hosts [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*)].

Fig. S2: Phylogeny reconstructed based on *dnaK* gene inferred by Bayesian analysis using 347 sites in 58 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. Different bold lines indicate bacterial subgroups (left). The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-hosts [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*)].

Fig. S3: Phylogeny reconstructed based on *recA* gene inferred by Bayesian analysis using 267 sites in 58 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. Different bold lines indicate bacterial subgroups (left). The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-hosts [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*)].

Fig. S4: Phylogeny reconstructed based on *nifD* gene inferred by Bayesian analysis using 747 sites in 58 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+I+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-hosts [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*)].

**Table 1**

Geographic origin and host plant of *Bradyrhizobium* type strains used as reference species in the phylogenetic analyses of this study.

Bacterial species	Type strain	Bacterial origin	Host plant	References
<i>Bradyrhizobium betae</i>	LMG 21987 <sup>T</sup>	Spain	<i>Beta vulgaris</i>	Rivas <i>et al.</i> (2004)
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	BTA-1 <sup>T</sup>	Spain	<i>Chamaecytisus proliferus</i>	Vinuesa <i>et al.</i> (2005)
<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	CTAW11 <sup>T</sup>	Morocco	<i>Cytisus villosus</i>	Chahboune <i>et al.</i> (2011)
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	USDA 110 <sup>T</sup>	Japan	<i>Glycine max</i>	Delamuta <i>et al.</i> (2013)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	USDA 76 <sup>T</sup>	USA	<i>Glycine max</i>	Kuykendall <i>et al.</i> (1992)
<i>Bradyrhizobium embrapense</i>	SEMIA 6208 <sup>T</sup>	Colombia	<i>Desmodium heterocarpon</i>	Delamuta <i>et al.</i> (2015)
<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i>	CCBAU 23303 <sup>T</sup>	China	<i>Glycine max</i>	Zhang <i>et al.</i> (2012)
<i>Bradyrhizobium icense</i>	LMTR 13 <sup>T</sup>	Peru	<i>Phaseolus lunatus</i>	Durán <i>et al.</i> (2014)
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	EK05 <sup>T</sup>	Japan	<i>Entada kosshunensis</i>	Islam <i>et al.</i> (2008)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	USDA 6 <sup>T</sup>	Japan	<i>Glycine max</i>	Jordan (1982)
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	PAC68 <sup>T</sup>	Honduras	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> (2009)
<i>Bradyrhizobium lablabi</i>	CCBAU 23086 <sup>T</sup>	China	<i>Lablab purpureus</i>	Chang <i>et al.</i> (2011)
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	LMG 18230 <sup>T</sup>	China	<i>Glycine max</i>	Xu <i>et al.</i> (1995)
<i>Bradyrhizobium mercantei</i>	SEMIA 6399 <sup>T</sup>	Brazil	<i>Lonchocarpus costatus</i>	Helene <i>et al.</i> (2017)
<i>Bradyrhizobium neotropicale</i>	BR 10247 <sup>T</sup>	Brazil	<i>Centrolobium paraense</i>	Zilli <i>et al.</i> (2014)
<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	OO99 <sup>T</sup>	Canada	<i>Glycine max</i>	Yu <i>et al.</i> (2014)
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	PAC48 <sup>T</sup>	Honduras	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> (2009)
<i>Bradyrhizobium paxllaeri</i>	LMTR 21 <sup>T</sup>	Peru	<i>Phaseolus lunatus</i>	Durán <i>et al.</i> (2014)
<i>Bradyrhizobium retamae</i>	Ro19 <sup>T</sup>	Morocco	<i>Retama monosperma</i>	Guerrouj <i>et al.</i> (2013)
<i>Bradyrhizobium rifense</i>	CTAW71 <sup>T</sup>	Morocco	<i>Cytisus villosus</i>	Chahboune <i>et al.</i> (2012)
<i>Bradyrhizobium stylosanthis</i>	BR 446 <sup>T</sup>	Brazil	<i>Stylosanthes guianensis</i>	Delamuta <i>et al.</i> (2016)
<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	SEMIA 6148 <sup>T</sup>	Brazil	<i>Neonotonia wightii</i>	Delamuta <i>et al.</i> (2015)
<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i>	SEMIA 690 <sup>T</sup>	Brazil	<i>Centrosema pubescens</i>	Helene <i>et al.</i> (2015)
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	CCBAU 10071 <sup>T</sup>	China	<i>Lespedeza cuneata</i>	Yao <i>et al.</i> (2002)

**Table 2**

Nucleotides polymorphism ( $\pi$ ) of gene sequences according with the four different sampling physiographic regions.

Gene <sup>1</sup>	A	B	C	D	All regions
<i>atpD</i> (75%)	0.0399	0.03897	0.0276	0.0356	0.0502
<i>dnaK</i> (68%)	0.0762	0.04764	0.0115	0.0199	0.0661
<i>recA</i> (73%)	0.1263	0.08015	0.0577	0.0755	0.0853
<i>nifD</i> (61%)	0.0842	0.1278	0.0595	0.0755	0.1057

A, B, C, and D correspond to the sampled physiographic regions, as follows: A, Serra do Sudeste; B, Campanha; C, Campos de Cima da Serra; and D, Missões.

<sup>1</sup> Approximated percentage of conserved nucleotides.

**Table 3**

The twenty four isolates analyzed in phylogenies of *nifD* and concatenated genes (*atpD*, *dnaK*, and *recA*) and their identity percentage according to other isolates from *Desmodium* (OTU number) or MLSA database.

OTU number <sup>a</sup>	Isolate <sup>b,c</sup>	MLSA database <sup>d</sup>
1	A30.2 Daf	<i>B. elkanii</i> USDA 76 <sup>T</sup> (83.41)
2	A5.6 Dinc	<i>B. cytisi</i> CTAW11 <sup>T</sup> (83.36)
3	A43.6 Dinc	<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 <sup>T</sup> (94.71)
4	D40.3 Dads	<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 <sup>T</sup> (95.15)
4	D40.2 Dads	<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 <sup>T</sup> (95.15)
5	B65.3 Dunc	<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 <sup>T</sup> (94.97)
5	B65.2 Dunc	<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 <sup>T</sup> (94.97)
6	C6.2 Dinc	<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 <sup>T</sup> (95.16)
6	C6.1 Dinc	<i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 <sup>T</sup> (95.16)
7	C31.1 Dads	<i>B. canariense</i> BTA-1 <sup>T</sup> (95.41)
7	C33.2 Dads	<i>B. canariense</i> BTA-1 <sup>T</sup> (95.41)
7	C31.2 Dads	<i>B. canariense</i> BTA-1 <sup>T</sup> (95.41)
7	C31.2 Dads	<i>B. canariense</i> BTA-1 <sup>T</sup> (95.41)
8	B38.2 Dinc	<i>B. iriomotense</i> EK05 <sup>T</sup> (94.13)
8	B38.3 Dinc	<i>B. iriomotense</i> EK05 <sup>T</sup> (94.13)
9	A45.4 Dinc	<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 <sup>T</sup> (93.91)
9	A45.5 Dinc	<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 <sup>T</sup> (93.82)
10	B2.3 Dinc	<i>B. jicamae</i> PAC68 <sup>T</sup> (90.72)
10	B2.2 Dinc	<i>B. jicamae</i> PAC68 <sup>T</sup> (89.12)
11	B2.1 Dinc	<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 <sup>T</sup> (92.01)
12	B16.3 Dinc	<i>B. jicamae</i> PAC68 <sup>T</sup> (91.73)
12	B16.1 Dinc	<i>B. jicamae</i> PAC68 <sup>T</sup> (91.73)
13	A40.2 Daf	<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 <sup>T</sup> (95.11)
13	A40.1 Daf	<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 <sup>T</sup> (95.11)



**Table S1**

Environmental variables of thirty five sampled sites in this study.

Site <sup>a</sup>	Geolocation data	Soil type	pH	Clay	OM	V	P	K <sup>+</sup>	Al <sup>3+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	CEC	Av. Alt.	Temp. range	Precipitation
1A	30°52'29.46"S 53°36'51.76"O	Leptosol	5.4	8	1.7	70.5	17.8	149	0.1	3.5	0.7	6.6	193	13.33 – 23.69	1570
2A	30°54'23.98"S 53°40'11.54"O	Leptosol	5.1	14	2.2	55.5	1.5	76	0.4	4.2	2.4	12.3	227	13.33 – 23.70	1570
3A	30°58'21.52"S 53°35'34.08"O	Leptosol	5.3	14	3.7	54.4	1.5	99	0.2	6.2	1.7	15.1	206	13.33 – 23.71	1570
4A	30°51'10.62"S 53°10'32.96"O	Leptosol	5.0	19	1.3	10.7	1.5	87	4.5	1	0.6	17.3	340	13.29 – 23.43	1493
5A	30°52'5.25"S 53°16'42.31"O	Leptosol	4.8	14	2.2	37.9	1.5	344	1	2.3	0.5	9.9	283	13.29 – 23.44	1493
6A	30°52'48.43"S 53°18'28.83"O	Leptosol	5.3	20	2.9	49.6	1.5	97	0.4	3.6	2.8	13.7	232	13.29 – 23.45	1493
7A	30°54'38.83"S 53°20'53.76"O	Arenosol	4.8	6	0.7	20.8	1.5	26	0.9	0.5	0.2	3.9	244	13.29 – 23.46	1493
8A	30°55'12.36"S 53°22'51.48"O	Arenosol	6.5	10	0.3	73.4	31.4	48	0	3.6	0.5	5.8	144	13.29 – 23.47	1493
9A	30°53'52.39"S 53°25'33.71"O	Arenosol	5.7	8	1.6	62	88.6	74	0.1	3.3	0.5	6.5	137	13.29 – 23.48	1493
10A	30°54'10.03"S 53°10'35.20"O	Leptosol	5.6	14	1.8	44.7	1.5	82	0.2	3	0.7	8.9	184	13.29 – 23.49	1493
11A	31° 7'24.17"S 52°49'1.40"O	Leptosol	5.2	21	1.8	50.2	1.5	191	0.5	3.3	1.7	11.0	303	13.53 – 23.08	1684
12A	30°33'52.03"S 52°31'19.65"O	Leptosol	5.6	27	0.5	61.9	23.8	96	0.5	3.6	3.2	11.5	439	13.53 – 23.09	1684
13B	52°31'19.65"O 55°21'4.23"O	Acrisol	4.4	10	2.3	36.8	9.7	93	0.5	1.3	1	6.9	181	13.02 – 23.07	1547
14B	30°47'49.12"S 55°22'12.36"O	Acrisol	4.6	10	1.8	39	11.4	65	0.3	0.8	0.6	4	172	13.02 – 23.08	1547
15B	30°49'39.29"S 55°34'19.09"O	Acrisol	4.9	10	2.6	84.2	28.1	252	0.2	14.3	5.8	24.7	301	13.02 – 23.09	1547
16B	30°45'57.62"S 55°34'49.14"O	Leptosol	4.8	26	1.9	78.1	3.9	129	0.3	15.8	5.7	28.1	288	13.02 – 23.10	1547
17B	30°42'58.96"S 30°42'58.96"S	Leptosol	5.4	21	2.3	82.7	3.9	192	0.1	17.3	8.3	31.7	263	13.02 – 23.11	1547
18B	30°41'54.55"S 55°30'46.74"O	Chernozem	5.9	14	1.4	90.4	13.2	134	0	18.1	10.3	32	329	13.02 – 23.12	1547
19B	30°37'15.45"S 55°25'2.50"O	Acrisol	5.5	13	5.1	73.7	4.7	204	0.2	2.2	1.6	5.9	222	13.02 – 23.13	1547
20B	30°31'57.11"S 55°12'42.07"O	Acrisol	4.5	16	2.6	24.7	3.1	129	1	2.9	1.2	18.3	159	13.02 – 23.14	1547
21B	30°49'56.03"S 55°34'35.55"O	Leptosol	5.8	19	2.7	75.8	45.2	139	0	12.2	4.5	22.6	278	13.02 – 23.15	1547
22B	30°52'59.33"S 54°52'49.37"O	Chernozem	5.1	18	2.2	95.6	36.2	324	0.5	27	5.4	34.8	162	13.63 – 24.46	1412
23B	31° 13'15.97"S 54°16'22.95"O	Luvisol	5.4	13	1.9	83	77.3	81	0	10	6.7	3.5	274	13.33 – 23.69	1570
24B	56°39'25.66"O 54°17'50.03"O	Acrisol	4.2	6	1.5	27.8	91.1	16	0.3	0.9	0.1	3.8	105	14.46 – 25.01	1456
25C	28°37'32.08"S 50°44'33.79"O	Leptosol	4.4	42	4.9	13.2	2.3	78	4.1	1.8	0.9	22.4	961	12.14 – 21.58	1699
26C	28°38'49.39"S 50°26'3.80"O	Leptosol	5.0	17	3.0	65.1	38.6	260	0.4	8	2.4	17.6	1059	10.41 – 21.14	1744

27C	29°22'34.35"S	50°10'51.84"O	Leptosol	5.8	22	1.9	88.1	37.4	244	0	15.1	5.5	26	496	14.10 – 22.78	2036
28C	29°23'4.40"S	50°11'17.53"O	Leptosol	5.9	25	1.3	90.3	13.2	236	0	13.2	5.2	22.5	219	14.10 – 22.79	2036
29D	28°50'20.54"S	52°34'11.35"O	Cambisol	5.3	48	4.4	33.5	3.1	97	1.5	3.2	2.7	18.4	611	13.70 - 24.00	1651
30D	28°36'16.60"S	53°20'44.56"O	Ferrasol	4.7	35	2.2	27.7	3.9	42	1	2.1	1.1	12	441	14.14 – 24.67	1928
31D	28°27'29.73"S	54°34'10.11"O	Leptosol	5.3	17	2.6	90	222	137	0	20.3	10.6	34.8	265	15.26 – 25.81	1680
32D	28°31'2.87"S	55°15'1.44"O	Leptosol	5.2	28	2.6	76.2	33.8	170	0	9	4.5	18.3	189	15.36 – 25.89	1635
33D	29°21'44.34"S	56°39'25.66"O	Gleysol	5.9	27	0.8	69.8	1.5	16	0.4	4.6	1.5	4.6	58	14.27 – 25.44	1475
34D	29°29'11.03"S	55°27'43.93"O	Ferrasol	4.9	7	1.3	26.8	1.5	36	0.5	0.5	0.2	3	122	14.79 - 25.43	1612
35D	29°33'45.13"S	55°19'27.13"O	Ferrasol	4.5	8	1	16.2	3.1	27	0.4	0.2	0.1	2.3	119	14.10 – 22.78	2036

<sup>a</sup> A, B, C, and D correspond to the sampled physiographic regions, as follows: A, Serra do Sudeste; B, Campanha; C, Campos de Cima da Serra; and D, Missões.

% [clay, OM (organic matter), and V (saturation by base in CEC pH 7.0)]; ppm (P, K<sup>+</sup>); cmolc/dm<sup>3</sup> [Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and CEC (cation exchange capacity in pH 7)];

Av. Alt. (Average Altitude); Temp. range (minimum and maximum average of temperature); Precipitation (Average precipitation).

**Table S2**

Oligonucleotides and cycling conditions for genes analyzed in this study.

Target gene <sup>a</sup>	Primer <sup>b</sup>	Sequence (5' – 3') <sup>c</sup>	Fragment length	PCR cycling
<i>atpD</i>	TSatpDf	TCTGGTCCGYGGCCAGGAAG	333	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C
	TSatpDr	CGACACTTCCGARCCSGCCTG		
<i>dnaK</i>	BRdnaKf	TTCGACATCGACGCSAACGG	245	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C
	BRdnaKr	GCCTGCTGCKTGTACATGGC		
<i>recA</i>	TsrecAf	CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG	381	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C
	TsrecAr	CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG		
<i>nifD</i>	TSnifDf1	CGVGGAGGTSCTSAAGGTCTATCC	798	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 53°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C
	nifp12	CCGAAGAAGTTGTACTCGCACCA		

<sup>a</sup> References: *atpD* (Stępkowski *et al.*, 2005), *dnaK* (Menna *et al.*, 2009), *recA* (Stępkowski *et al.*, 2005), and *nifD* (Beukes *et al.*, 2016).

<sup>b</sup> Primers also used for sequencing of their respective genes.

<sup>c</sup> Mixtures of bases used at certain positions are given as follows: K, G, or T; M, A or C; R, A or G; S, G or C; Y, C or T; V, A or C or G.

**Table S3**

Genes successfully amplified, accession numbers, and sampling sites for each isolate of this study.

Site <sup>a</sup>	Isolate <sup>b</sup>	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>recA</i>	<i>nifD</i>
1A	A1.4 Dinc	MH286554	MH286614	MH286683	MH286738
1A	A1.5 Dinc	MH286555	MH286615	MH286684	MH286739
2A	A5.5 Dinc	MH286556	MH286616	–	MH286740
2A	A5.6 Dinc	MH286557	MH286617	MH286685	MH286741
3A	A9.1 Dinc	MH286558	MH286618	MH286686	–
3A	A9.4 Dinc	MH286559	MH286619	–	–
3A	A9.6 Dinc	MH286560	–	MH286687	–
4A	A17.2 Dinc	MH286561	MH286620	–	–
4A	A17.3 Dinc	MH286562	MH286621	MH286688	–
4A	A17.6 Dinc	–	MH286622	MH286689	–
5A	A18.1 Daf	MH286563	–	–	MH286742
5A	A19.1 Dinc	–	MH286623	MH286690	–
5A	A19.2 Dinc	–	MH286624	MH286691	–
5A	A19.3 Dinc	–	MH286625	MH286692	–
6A	A21.1 Dinc	–	MH286626	MH286693	–
6A	A21.4 Dinc	–	MH286627	MH286694	–
6A	A21.5 Dinc	–	MH286628	MH286695	–
7A	A23.5 Dinc	–	–	MH286696	MH286743
7A	A23.6 Dinc	–	–	MH286697	MH286744
8A	A26.1 Dinc	–	MH286629	MH286698	–
9A	A30.2 Daf	MH286564	MH286630	MH286699	MH286745
9A	A31.5 Dunc	–	MH286631	MH286700	–
9A	A31.6 Dunc	–	MH286632	MH286701	–
10A	A39.5 Dinc	–	MH286633	MH286702	–
10A	A40.1 Daf	MH286565	MH286634	MH286703	MH286746
11A	A40.2 Daf	MH286566	MH286635	MH286704	MH286747
11A	A43.5 Dinc	MH286567	MH286636	–	MH286748
11A	A43.6 Dinc	MH286568	MH286637	MH286705	MH286749
12A	A45.4 Dinc	MH286569	MH286638	MH286706	MH286750
12A	A45.5 Dinc	MH286570	MH286639	MH286707	MH286751
13B	B2.2 Dinc	MH286572	MH286641	MH286709	MH286753
13B	B2.3 Dinc	MH286573	MH286642	MH286710	MH286754
14B	B9.1 Daf	–	MH286643	MH286711	MH286755
14B	B10.2 Dinc	MH286574	–	MH286712	MH286756
15B	B12.1 Dinc	MH286575	MH286644	MH286713	–
15B	B12.2 Dinc	MH286576	MH286645	–	–
16B	B16.1 Dinc	MH286577	MH286646	MH286714	MH286757
16B	B16.3 Dinc	MH286578	MH286647	MH286715	MH286758
17B	B20.3 Dinc	MH286579	–	–	–
18B	B22.1 Dinc	MH286580	MH286648	–	MH286759

19B	B27.1 Dinc	MH286581	-	-	MH286760
19B	B27.2 Dinc	MH286582	-	-	MH286761
20B	B32.1 Dinc	MH286583	MH286649	-	MH286762
20B	B34.1 Dinc	-	MH286650	MH286716	MH286763
20B	B34.2 Dinc	-	MH286651	MH286717	MH286764
20B	B34.3 Dinc	-	MH286652	MH286718	MH286765
21B	B38.1 Dinc	MH286584	MH286653	-	MH286766
21B	B38.2 Dinc	MH286585	MH286654	MH286719	MH286767
21B	B38.3 Dinc	MH286586	MH286655	MH286720	MH286768
22B	B45.2 Dinc	MH286587	MH286656	-	MH286769
23B	B50.1 Dinc	MH286588	MH286657	-	-
23B	B50.2 Dinc	MH286589	MH286658	-	MH286770
23B	B50.3 Dinc	MH286590	-	-	MH286771
24B	B65.2 Dunc	MH286591	MH286659	MH286721	MH286772
24B	B65.3 Dunc	MH286592	MH286660	MH286722	MH286773
25C	C6.1 Dinc	MH286593	MH286661	MH286723	MH286774
25C	C6.2 Dinc	MH286594	MH286662	MH286724	MH286775
25C	C6.3 Dinc	MH286595	MH286663	-	-
26C	C13.1 Daf	-	MH286664	MH286725	MH286776
26C	C13.2 Daf	-	MH286665	MH286726	MH286777
26C	C13.3 Daf	-	MH286666	MH286727	-
27C	C29.1 Dinc	MH286596	MH286667	-	MH286778
27C	C29.3 Dinc	MH286597	MH286668	-	MH286779
27C	C31.1 Dads	MH286598	MH286669	MH286728	MH286780
27C	C31.2 Dads	MH286599	MH286670	MH286729	MH286781
28C	C33.1 Dads	MH286600	MH286671	MH286730	MH286782
28C	C33.2 Dads	MH286601	MH286672	MH286731	MH286783
28C	C33.3 Dads	MH286602	MH286673	MH286732	-
29D	D12.1 Dinc	MH286603	-	-	MH286784
29D	D12.2 Dinc	MH286604	-	-	MH286785
30D	D16.1 Dinc	MH286605	MH286674	-	MH286786
30D	D16.3 Dinc	MH286606	MH286675	-	MH286787
31D	D20.3 Dinc	-	MH286676	MH286733	MH286788
31D	D21.2 Dinc	-	-	-	MH286789
32D	D23.2 Dinc	MH286607	MH286677	-	-
32D	D23.3 Dinc	MH286608	MH286678	-	MH286790
32D	D26.1 Dads	-	MH286679	MH286734	MH286791
33D	D40.2 Dads	MH286609	MH286680	MH286735	MH286792
33D	D40.3 Dads	MH286610	MH286681	MH286736	MH286793
33D	D40.4 Dads	MH286611	MH286682	MH286737	-
34D	D48.3 Dinc	MH286612	-	-	MH286794
35D	D59.2 Dcun	MH286613	-	-	MH286795

**Table S4**

Genes and accession numbers of type strains used as reference species in the phylogenetic analyses of this study.

Bacterial species	Strain	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>recA</i>	<i>nifD</i>
<i>Bradyrhizobium betae</i>	LMG 21987 <sup>T</sup>	FM253129.1	AY923046.1	AB353734.1	-
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	BTA-1 <sup>T</sup>	AY386739.1	AY923047.1	FM253177.1	DQ644553.1
<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	CTAW11 <sup>T</sup>	GU001613.1	KF532219.1	GU001575.1	KF532384.1
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	USDA 110 <sup>T</sup>	AAV28_RS40695	AAV28_RS00230	AAV28_RS25680	AAV28_RS05520
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	USDA 76 <sup>T</sup>	BRAEL_RS0108810	BRAEL_RS0107435	BRAEL_RS0133605	BRAEL_RS0115020
<i>Bradyrhizobium embrapense</i>	SEMIA 6208 <sup>T</sup>	AKN83_RS34070	AKN83_RS31365	AKN83_RS29940	AKN83_RS26005
<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i>	CCBAU 23303 <sup>T</sup>	HQ231682.1	KF962686.1	HQ231595.1	-
<i>Bradyrhizobium icense</i>	LMTR 13 <sup>T</sup>	MTR13_RS37590	LMTR13_RS00225	LMTR13_RS15285	LMTR13_RS26845
<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	EK05 <sup>T</sup>	AB300994.1	JF308944.1	AB300996.1	LM994483.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	USDA 6 <sup>T</sup>	BJ6T_RS03140	BJ6T_RS19105	BJ6T_RS01935	AF484254.1
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	PAC 68 <sup>T</sup>	CQ12_RS00070	CQ12_RS41365	CQ12_RS29675	LM994488.1
<i>Bradyrhizobium lablabi</i>	CCBAU 23086 <sup>T</sup>	CQ14_RS07875	CQ14_RS34470	CQ14_RS22810	LM994485.1
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	LMG 18230 <sup>T</sup>	AY386752.1	AY923041.1	AY591564.1	AF484263.1
<i>Bradyrhizobium mercantei</i>	SEMIA 6399 <sup>T</sup>	BI327_RS29375	BI327_RS23490	BI327_RS05515	BI327_RS17385
<i>Bradyrhizobium neotropiale</i>	BR 10247 <sup>T</sup>	AXW67_RS14670	AXW67_RS34335	AXW67_RS20280	AXW67_37960
<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	OO99 <sup>T</sup>	CIT37_RS21485	CIT37_RS08340	CIT37_RS18760	CIT37_19160
<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	PAC 48 <sup>T</sup>	FJ428208.1	JF308946.1	HM047130.1	KF532382.1
<i>Bradyrhizobium paxllaeri</i>	LMTR 21 <sup>T</sup>	LMTR21_RS09480	LMTR21_RS26050	LMTR21_RS02385	LMTR21_RS35355
<i>Bradyrhizobium retamae</i>	Ro19 <sup>T</sup>	CQ13_RS08840	CQ13_RS21555	CQ13_RS12275	LM994486.1
<i>Bradyrhizobium rifense</i>	CTAW71 <sup>T</sup>	GU001617.1	KF532220.1	GU001585.1	KF532385.1
<i>Bradyrhizobium stylosanthis</i>	BR 446 <sup>T</sup>	A7X65_RS12130	A7X65_RS13410	A7X65_RS00395	A7X65_RS25670
<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	SEMIA 6148 <sup>T</sup>	FJ390968	FJ391008	FJ391168	-
<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i>	SEMIA 690 <sup>T</sup>	ALC15_RS30305	ALC15_RS15760	ALC15_RS22445	ALC15_RS11175
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	CCBAU 10071 <sup>T</sup>	GA0061099_RS05245	GA0061099_RS06210	GA0061099_RS32755	LM994484.1
<i>Mesorhizobium erdmanii</i>	USDA 3471 <sup>T</sup>	A3AU_RS0112145	A3AU_RS0110840	A3AU_RS0103800	A3AU_RS0132275

<i>Mesorhizobium loti</i>	LMG 6125 <sup>T</sup>	C7U62_RS21880	C7U62_RS00910	C7U62_RS14180	-
<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	STM 2683 <sup>T</sup>	MESS2_RS07945	MESS2_RS05170	MESS2_RS16250	MESS2_RS28725
<i>Mesorhizobium muleiense</i>	CGMCC 1.11022 <sup>T</sup>	C10BLT09_RS30200	BLT09_RS07610	BLT09_RS06255	SAMN05428953_12526
<i>Mesorhizobium oceanicum</i>	B7 <sup>T</sup>	BSQ44_RS01410	BSQ44_RS02155	BSQ44_RS17355	-
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	WSM2075 <sup>T</sup>	MESOP_RS05980	MESOP_RS03665	MESOP_RS23860	MESOP_RS31490
<i>Mesorhizobium qingshengii</i>	CGMCC 1.12097 <sup>T</sup>	BLS48_RS06590	BLS48_RS04290	BLS48_RS13365	BLS48_RS33620
<i>Mesorhizobium soli</i>	JCM 19897 <sup>T</sup>	C7I85_RS06385	C7I85_RS07665	C7I85_RS14955	-
<i>Mesorhizobium sophorae</i>	ICMP 19535 <sup>T</sup>	CGZ66_RS11880	CGZ66_RS09270	CGZ66_RS16795	CGZ66_RS30960
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	SDW018 <sup>T</sup>	CIT26_RS27435	CIT26_RS03635	CIT26_RS00895	CIT26_20425
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	USDA 2370 <sup>T</sup>	BS629_RS06555	BS629_RS32230	BS629_RS29365	DB728_RS29370

---

## Supplementary Figures

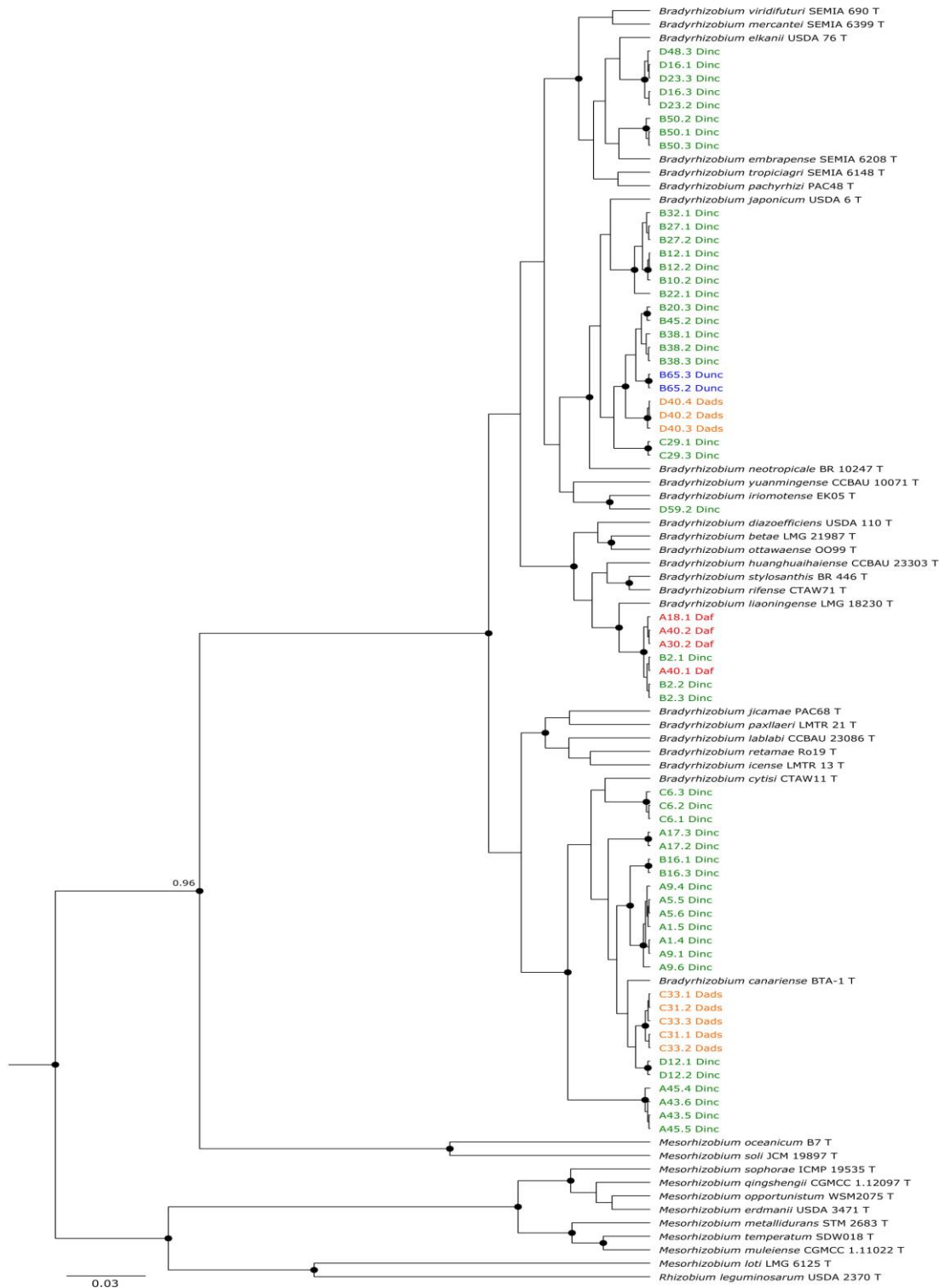


Fig. S1: Phylogeny reconstructed based on *atpD* gene inferred by Bayesian analysis using 420 sites in 58 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+I+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. Yellow posterior probability indicates support of two major *Bradyrhizobium* groups. Different bold lines indicate bacterial subgroups (left). The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-hosts [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*)].





Fig. S2: Phylogeny reconstructed based on *dnaK* gene inferred by Bayesian analysis using 347 sites in 58 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. Different bold lines indicate bacterial subgroups (left). The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-hosts [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*)].

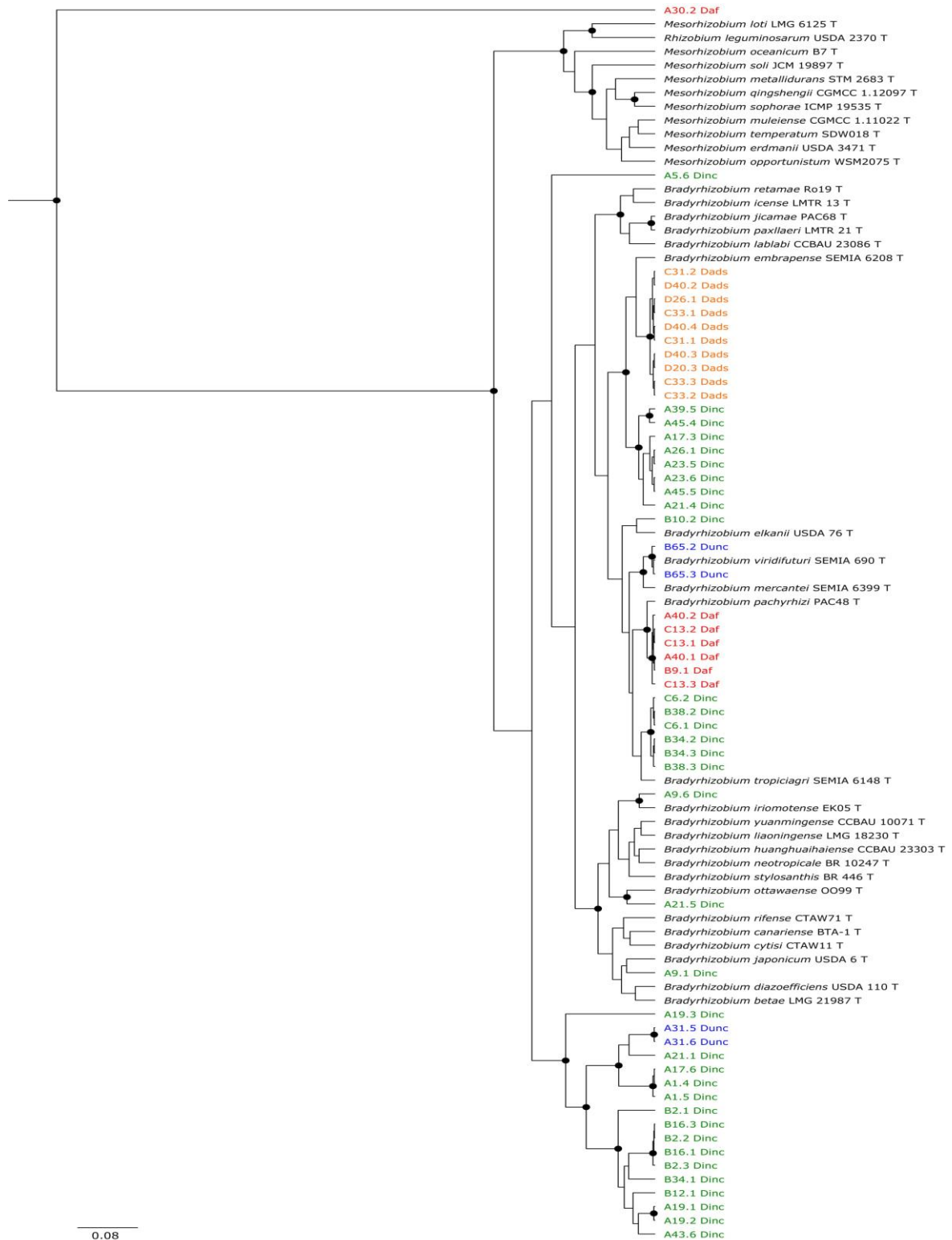


Fig. S3: Phylogeny reconstructed based on *recA* gene inferred by Bayesian analysis using 267 sites in 58 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. Different bold lines indicate bacterial subgroups (left). The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-hosts [Dads (*D. adscendens*), Daf (*D. affine*), Dinc (*D. incanum*), Dcun (*D. cuneatum*), and Dunc (*D. uncinatum*)].

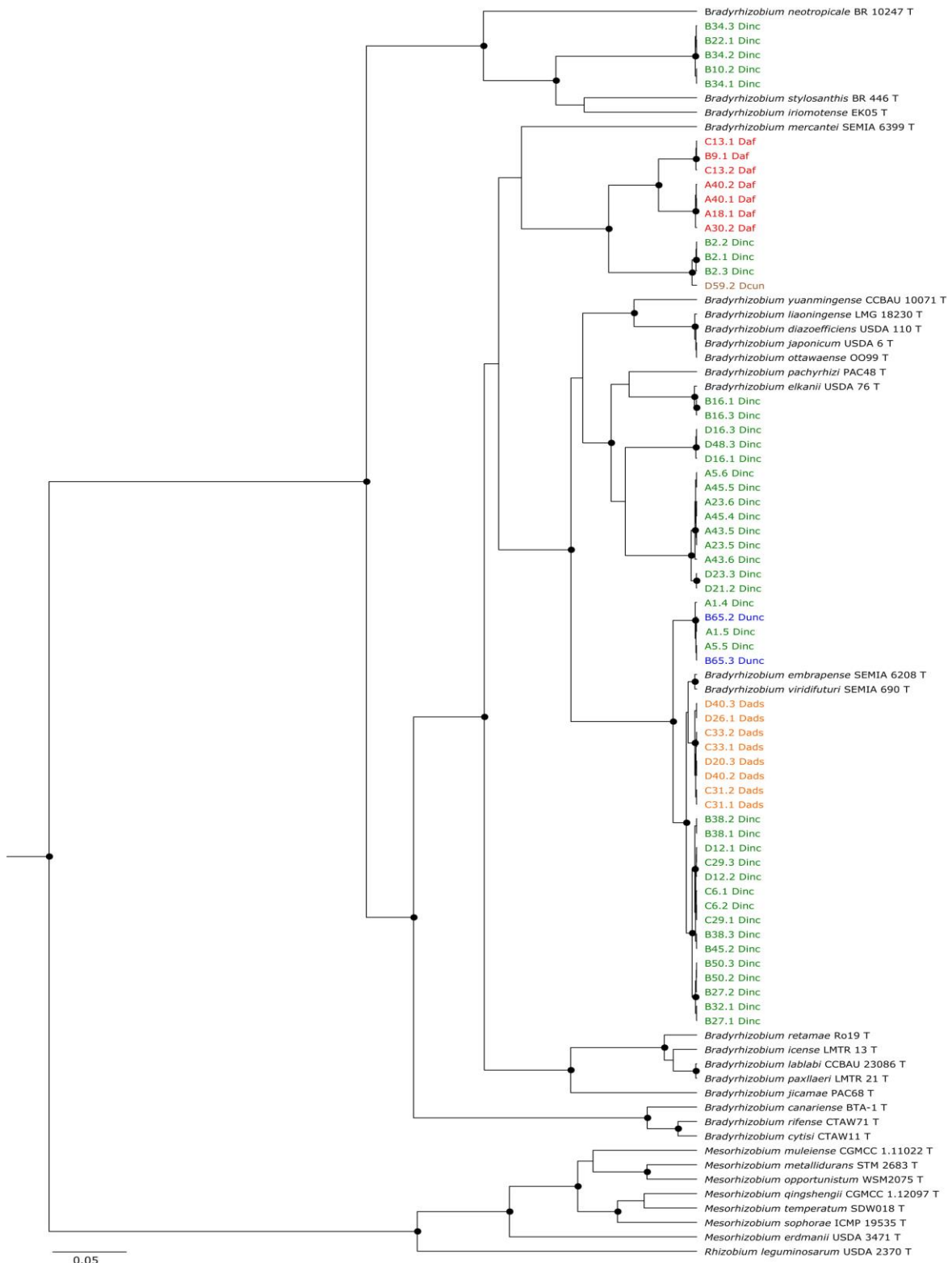


Fig. S4: Phylogeny reconstructed based on *nifD* gene inferred by Bayesian analysis using 747 sites in 58 *Bradyrhizobium* isolates. DNA substitution models: GTR+I+G. The posterior probabilities higher than 0.95 are indicated at the branching points well supported. The acronyms of bacterial isolates were attributed according to their respective physiographic region (A, B, C, or D, as above) and plant-hosts [Dads (D. adscendens), Daf (D. affine), Dinc (D. incanum), Dcun (D. cuneatum), and Dunc (D. uncinatum)].

#### 4. CAPÍTULO II – Manuscrito em preparação

##### *Diversidade de rizóbios associados a plantas leguminosas nativas dos Campos Sulinos -RS/Brasil*

Fernanda da Silva Moreira<sup>1</sup>, Bruno Brito Lisboa<sup>2</sup>, Gilson Shlindwein<sup>2</sup>, Tomasz Stepkowski<sup>3</sup>, Luciane Maria Pereira Passaglia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brazil),

<sup>2</sup>Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul-SEAPI (Brazil),

<sup>3</sup>Biology College of Warsaw University of Life Sciences (Poland).

##### 4.1. Resumo

Os Campos Sulinos, que incluem o Bioma Pampa e o de Mata Atlântica em áreas de maior altitude, são conhecidos pela diversidade florística como um todo. Porém, o potencial de Fixação Biológica de Nitrogênio pelos legumes nativos, especialmente os de menor interesse forrageiro, assim como seus parceiros bacterianos, ainda é pouco conhecido. Nesse estudo nos propusemos a conhecer a diversidade de rizóbios que nodulam as espécies nativas de leguminosas nessa grande área do Estado do Rio Grande do Sul. De sessenta e oito espécies vegetais, com destaque para a subfamília Papilionoidea, foram isolados trezentos e trinta micro-organismos simbióticos, entre eles bactérias relacionadas aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Burkholderia*. Foram realizadas amplificação e sequenciamento de genes *housekeeping* (*recA*, *atpD* e *dnaK*) e um gene relacionado à simbiose (*nifD*) para futuras análises filogenéticas, além de avaliação das condições ambientais de cada ponto de coleta a fim de relacionar a diversidade bacteriana e fatores edafoclimáticos. A exemplo de estudos prévios nesse mesmo sentido, o potencial para a geração de resultados que colaborem com a compreensão das relações filogenéticas entre os parceiros dessa simbiose é imenso e deverão ser explorados extensivamente.

## 4.2. Introdução

Os campos do Bioma Pampa estendem-se ao sul e a oeste do Uruguai, nas províncias argentinas de Corrientes, Entre Rios, Santa Fé, Córdoba, Buenos Aires e La Pampa, na parte do Noroeste e na metade sul do Estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil, incluindo a capital, Porto Alegre. Esses campos apresentam uma grande riqueza de espécies com diversos usos, como árvores frutíferas, plantas medicinais e plantas ornamentais nativas. Além disso, também existe uma diversidade de plantas domesticadas de outras partes do mundo e que se adaptaram às condições locais, como milho, feijão, batata-doce, mandioca, pimentas, cucurbitáceas, cenoura e cebola, as quais têm características únicas, devido ao processo de colonização do território por diferentes culturas (indígena, portuguesa, espanhola, africana, alemã, italiana e francesa). Porém, o uso tradicional do Bioma Pampa como um todo está associado, principalmente, à pecuária extensiva e à cultura de arroz irrigado, soja e integração lavoura-pecuária. A geração de renda e o uso sustentável desse bioma geralmente estão ligados a espécies forrageiras que compõe o campo nativo, em especial, gramíneas e leguminosas, relacionadas à criação de gado, aproveitando os recursos naturais disponíveis (BARBIERI et al., 2009).

Na porção de terras mais alta do estado do RS estão localizados os Campos de Cima da Serra. Assim como no Bioma Pampa, nessa região a vegetação predominante é a de campos, com participação significativa de vegetação arbórea característica da Mata Atlântica, chamando atenção a Mata de Araucária, caracterizada pela presença do pinheiro brasileiro (*Araucaria angustifolia*). A vegetação característica dos campos são as gramíneas, como as pertencentes aos gêneros *Andropogon* e *Paspalum* e as carquejas do gênero *Bacharis*, classificadas como estivais (de clima quente). Devido às características climáticas da área também se destacam as leguminosas hibernais (de clima temperado) dos gêneros *Trifolium* e *Adesmia* (BOLDRINI, 1997).

Essas duas regiões são demarcadas pelas diferenças climáticas e pela origem e composição da flora. Muitas espécies de plantas que habitam climas mais tropicais têm nos Campos Sulinos o seu limite sul, assim como espécies de climas mais temperados o seu limite norte de distribuição. Existe uma clara distinção na vegetação entre os campos do bioma Pampa, no sul do RS, e os campos do bioma Mata Atlântica. Porém, a distribuição de um grande número de plantas, incluindo algumas

das mais abundantes, se sobrepõe nessa região, o que justifica o emprego do termo Campos Sulinos unindo os dois biomas como um todo. Os Campos Sulinos se estendem por regiões campestres nos três estados da região Sul do Brasil, Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR) (PILLAR et al., 2009; PILLAR; LANGE, 2015).

As condições do solo nos Campos Sulinos variam, porém, os solos profundos dominam a parte sudeste da Campanha e são, em sua maioria, dominados pela agricultura. Solos rasos devido a afloramentos rochosos e solos arenosos, como nos campos Litorâneos (não contemplados nesse estudo) e no centro-oeste do RS, proporcionam ambientes desafiadores para a cobertura vegetal, onde leguminosas resistentes a estresse hídrico obtêm vantagem (PILLAR e LANGE, 2015). Ainda, a formação de uma relação simbiótica com micro-organismos para exercer sua capacidade de converter o nitrogênio atmosférico em amônia, confere às plantas leguminosas uma vantagem em se desenvolver em solos pobres em nitrogênio (ANDREWS et al., 2013; ANDREWS et al., 2011)(ANDREWS et al., 2011)(ANDREWS et al., 2011)(ANDREWS et al., 2011).

A vasta extensão dos Campos Sulinos e suas características heterogêneas, ao mesmo tempo que permite a classificação conjunta do Bioma Pampa e dos Campos de Cima da Serra, representam um desafio no estudo de diversidade como um todo, seja florística, zoológica e, principalmente, microbiológica. A especificidade entre rizóbios e legumes nativos, bem como seu padrão de distribuição ao longo da região é ainda um campo a ser explorado. Portanto, identificar as espécies de rizóbios que nodulam legumes nativos avaliando sua diversidade e distribuição nesse ambiente contribuirá para ampliar o conhecimento a respeito das origens evolutivas desses parceiros simbióticos.

### **4.3. Material e métodos**

#### **4.3.1. Caracterização dos locais de coleta**

Foram realizadas, entre maio de 2014 e março de 2015, quatro incursões a diferentes ambientes do Rio Grande do Sul contemplando os chamados Campos Sulinos. A elas nos referimos como Campos A, B, C e D na ordem em que tais incursões ocorreram. Campos A, B e D abrangeram localidades situadas no Bioma

Pampa, enquanto o Campo C abrangeu localidades situadas nos Campos de Cima da Serra, onde predomina o Bioma Mata Atlântica, como mostra a Figura 1 com o panorama geral dos pontos amostrados.

O Campo A compreendeu localidades na Serra do Sudeste e Depressão Central do RS. De maneira geral, a vegetação das áreas amostradas representa as zonas de campos savanoides do bioma Pampa constituídos por mosaicos de campo, arbustos e pequenos agrupamentos florestais (CRAWSHAW et al., 2007; HASENACK et al., 2007). Os pontos de coleta se concentraram em áreas próximas a estradas secundárias da região, em zonas de encostas e afloramentos rochosos, a maioria sob a influência de pastejo e alguns com a interferência da faixa de domínio.

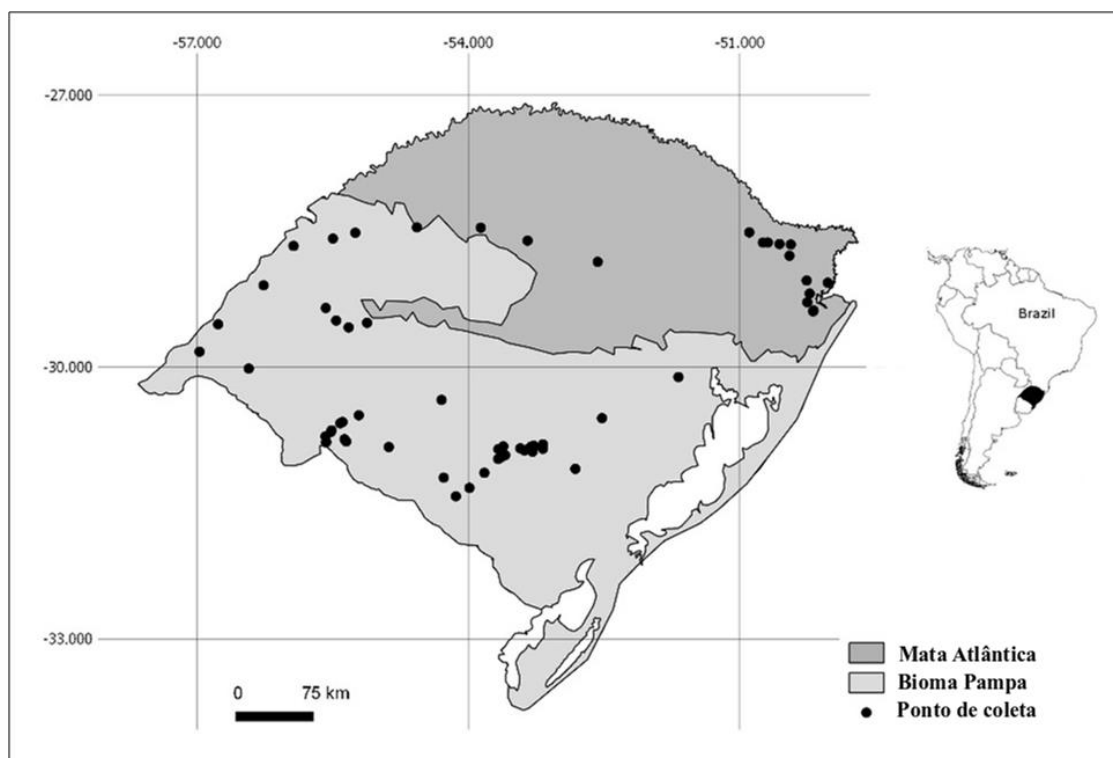
Com relação à composição florística, destaca-se a subfamília Papilionoidea com maior número de gêneros encontrados (12). Os gêneros *Mimosa* e *Desmodium* foram os que apresentaram o maior número de espécies nativas, quatro e três, respectivamente. Entre as espécies destaca-se *Desmodium incanum* com presença em todos os pontos amostrados, concordando com a descrição feita por Oliveira (1983) como a espécie mais comum, abundante e de ampla distribuição em todo o Estado do Rio Grande do Sul.

O Campo B abrangeu duas regiões do RS bastante distintas entre si: Fronteira e Campanha. A Fronteira caracteriza-se por campos naturais sobre solos originados por materiais de origem contrastantes: arenitos (solos profundos, pobres quimicamente e com pouca capacidade de retenção de umidade) e basalto (solos rasos com textura argilosa, quimicamente ricos e com capacidade de retenção de água variando conforme a espessura do perfil). Na Campanha é característica a formação de campo natural fino, conhecido como “Ponche verde” em solos originados de rochas sedimentares (argilitos e siltitos). Também quimicamente ricos esses solos podem apresentar má drenagem devida a sua textura muito argilosa. Ainda na região de Bagé, foram coletadas amostras em locais com características da região da Serra do Sudeste, isto é, apresentando relevo forte ondulado e com solos originados de granitos (CRAWSHAW et al., 2007).

Durante o Campo C, realizado nos Campos de Cima da Serra e da Encosta Nordeste do Estado, foram coletadas amostras na região do planalto Rio-grandense, na qual os solos são originados a partir de rochas vulcânicas de caráter básico (formam

solos classificados como Latossolos e Neossolos litólicos) e ácido (formam solos classificados como Cambissolos e Neossolos litólicos) (IGANCI et al., 2011). Estes solos variam em profundidade, textura e composição química.

Na última incursão, ao Noroeste do estado do RS, no Campo D, encontramos áreas de transição entre o campo nativo degradado e parcelas de desertificação (Formação Guará) (VERDUM, 1997). Campos de solo raso formados sobre o basalto alegreite (DO NASCIMENTO et al., 2014) e áreas baixas, inundáveis (geralmente utilizadas para o plantio de arroz) também são características desse local.



**Figura 1:** panorama geral dos pontos amostrados nos Campos Sulinos, separados por Bioma de amostragem.

De cada ponto amostrado foram coletados 0.5 kg de solo para determinação do pH, conteúdo de matéria orgânica (OM), argila, fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e alumínio (Al), de acordo como o método padrão de análise (SPARKS, 1996).



#### **4.3.2. Coleta dos nódulos e obtenção dos isolados**

As raízes das plantas contendo os nódulos foram armazenadas em frascos contendo sílica e mantidas em ambiente protegido da luz até o momento de sua utilização. Para o isolamento das bactérias os nódulos foram destacados das raízes e desinfetados por lavagens sucessivas com etanol (70%) por 45 segundos, seguidas de hipoclorito (1%) por 30 segundos e cinco lavagens com água destilada e esterilizada. Em seguida, cada nódulo foi macerado com uma pinça estéril em tubos de microcentrífuga contendo 100  $\mu\text{L}$  de água destilada esterilizada. A suspensão obtida foi inoculada pela técnica de esgotamento por estrias em placas de Petri contendo o meio ágar Levedura Manitol (LM) (VINCENT, 1970) com Vermelho Congo (25 mg  $\text{L}^{-1}$ ) e incubadas em estufa a 28°C pelo tempo necessário ao aparecimento de colônias bacterianas (de 3 a 10 dias). As colônias obtidas foram novamente cultivadas em meio LM líquido e seguiu-se à inoculação por agulha em meio LM sólido (tubos de 2 mL). Os tubos foram incubados em estufa a 28°C pelo tempo necessário ao aparecimento de crescimento bacteriano visível. A cultura foi coberta por uma fina camada óleo mineral estéril para conservação em temperatura ambiente dos isolados. Parte da cultura líquida foi reservada para extração de ácidos nucleicos.

#### **4.3.3. Caracterização genética dos isolados**

Os isolados foram submetidos à extração do DNA genômico pelo método de extração de DNA com clorofórmio (SOMASEGARAM e HOBEN, 1985). Uma alíquota de 1,5 mL das culturas bacterianas (cultivadas em meio LM por 72 horas a 28°C sob agitação de 120 rpm) foi transferida para tubos de microcentrífuga esterilizados e centrifugada por três minutos a 12.000 rpm. A suspensão de células obtida foi submetida à lavagem com solução estéril de cloreto de sódio (NaCl) 1%. As células foram homogeneizadas em 700  $\mu\text{L}$  de TES (Tris 10mM, EDTA 25 mM e NaCl 150 mM) e a suspensão foi novamente centrifugada por dois minutos a 12.000 rpm. Os sobrenadantes foram desprezados, as suspensões de células foram homogeneizadas em 500  $\mu\text{L}$  de TE1 (Tris 10mM e EDTA 25 mM) e 25  $\mu\text{L}$  de lisozima (20 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) e posteriormente foram incubadas a 37°C por uma hora. Após este período, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de SDS 20% a 60°C e 5  $\mu\text{L}$  de proteinase K (20 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) e as misturas foram incubadas a 60°C por 15 min. Logo após, foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As suspensões foram agitadas em vórtex e

centrifugadas por três min. a 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e foram adicionados 8 µL de NaCl 5M juntamente com 500 µL de isopropanol gelado. Após 10 min. no gelo, as misturas foram centrifugadas por 15 min. a 12000 rpm. Os concentrados obtidos foram lavados com etanol 70%, secos à temperatura ambiente e finalmente suspensos em 50 µL de TE2 (Tris 2 mM e EDTA 25 mM).

Sequências parciais de três genes *housekeeping* (*recA*, *atpD* e *ednAK*) e um gene relacionado à simbiose (*nifD*) foram amplificadas com seus respectivos iniciadores e sob as condições demonstradas na Tabela 1. Os produtos das ampliações foram sequenciados em sequenciador automático Megabace 1000 utilizando DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Health Care). As sequências obtidas foram analisadas no programa BioEdit 7.0.9.0 (HALL, 1999). O tamanho dos fragmentos resultantes, em pares de bases (pb), foram os seguintes: *dnaK* (proteína chaperona 70 kDa – 245 pb), *recA* (proteína de recombinação A – 381 pb), *atpD* (ATP sintase cadeia beta – 333 pb) e *nifD* (subunidade alfa da dinitrogenase – 798 pb). As sequências obtidas foram comparadas às disponíveis na base de dados GeneBank.

**Tabela 1:** Sequências iniciadoras e condições de amplificação em PCR.

Primer	Sequência (5' - 3')	Gene Alvo (tamanho do fragmento)	Condições da PCR	Referência
BRdnaKf	TTCGACATCGACGCSAACGG	<i>dnaK</i> (245)	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	MENNA <i>et al.</i> , 2009
BRdnaKr	GCCTGCTGCKTGTACATGGC			
TsrecAf	CAACTGCMYTGCGTATCGTC GAAGG	<i>recA</i> (381)	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	STEPKOWSKI <i>et al.</i> , 2005
TsrecAr	CGGATCTGGTTGATGAAGAT CACCATG			
TSatpDf	TCTGGTCCGYGGCCAGGAAG	<i>atpD</i> (333)	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	STEPKOWSKI <i>et al.</i> , 2005
TSatpDr	CGACACTTCCGARCCSGCCTG			
TSnifDf1	CGV GGA GGT SCT SAA GGT CTA TCC	<i>nifD</i> (798)	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 53°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	(BEUKES <i>et al.</i> , 2016a)
nifp12	CCGAAGAAGTTGTACTCGCA CCA			

#### 4.4. Resultados e discussão

Trezentos e trinta isolados de rizóbios foram obtidos a partir de 68 espécies de leguminosas nativas do Rio Grande do Sul distintas. As ocorrências das espécies nos

pontos amostrados estão descritas na Tabela 2, referente às quatro incursões a campo realizadas; Campanha e Fronteira do RS, chamadas de A, B, C e D, respectivamente.

**Tabela 2:** Ocorrências das espécies nos pontos amostrados e identificação de seus respectivos isolados bacterianos.

Espécie vegetal <sup>1</sup>	Ponto de coleta de nódulos <sup>2</sup>	Identificação do isolado bacteriano <sup>3</sup>
<i>Adesmia incana</i>	B 3-6, 8, 10, 14	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Adesmia latifolia</i>	C 3	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Adesmia punctata</i>	C 8	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Adesmia securigerifolia</i>	B 10, 11, 14	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Adesmia tristis</i>	C 2, 3, 5	<i>Mezorhizobium</i> sp., <i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Adesmia</i> sp. 1	B 14, 15	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
	D 1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Adesmia</i> sp. 2	D 5	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Aeschynomene falcata</i>	D 1, 5, 13, 14, 16	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Aeschynomene erudis</i>	D 9	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Aeschynomene sensitiva</i>	D 11	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Aeschynomene</i> sp. 1	D 5, 14	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Aeschynomene</i> sp. 2	D 12	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Arachis burkartii</i>	A 1, 9, 10, 13	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> , <i>B. japonicum</i> , <i>Bradyrhizobium elkanii</i>
	B 1, 4, 7, 10	<i>Bradyrhizobium daqingense</i> , <i>B. japonicum</i>
<i>Arachis</i> sp.1	D 6	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Arachis</i> sp.2	D 6	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Ateleia glazioviana</i>	D 3	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Chamaecrista nictitans</i>	A 16	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
	D 4, 5, 7, 15	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Rhizobium lupini</i>
<i>Chamaecrista rotundifolia</i>	D 10	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Chamaecrista</i> sp.1	D 14	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Collaea stenophylla</i>	C 9	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Crotalaria hilariana</i>	D 16	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Crotalaria lanceolata</i>	A 15	<i>Rhizobium</i> sp.
	C 11	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Desmanthus virgatus</i>	A 14	<i>Rhizobium</i> sp.
	D 1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Desmodium adscendens</i>	C 11, 12	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
	D 5, 9	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Desmodium affine</i>	A 1, 5, 8, 12-14	<i>Bradyrhizobium jicamae</i> , <i>Bradyrhizobium elkanii</i>
	B 2	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Desmodium cuneatum</i>	D 14	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>
<i>Desmodium incanum</i>	A 1-17	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>Bradyrhizobium iriomotense</i> , <i>Bradyrhizobium canariense</i> , <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> , <i>Bradyrhizobium viridifuturi</i> <i>Bradyrhizobium embrapense</i>
	B 1-3, 6, 10-12, 14	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i> , <i>Bradyrhizobium viridifuturi</i> , <i>Bradyrhizobium liaoningense</i> , <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
	C 11	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>Bradyrhizobium liaoningense</i>
	D 1, 2, 12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Bradyrhizobium viridifuturi</i>
<i>Desmodium uncinatum</i>	D 16	<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i>
<i>Eriosema tacuareboense</i>	D 1	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Eriosema</i> sp.1	B 1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Galactia marginalis</i>	C 9	<i>Rhizobium</i> sp.

<i>Indigofera asperifolia</i>	C 12	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Indigofera suffruticosa</i>	D 5	<i>Rhizobium indigofera</i>
<i>Lathyrus</i> sp.1	B 10	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Lupinus bracteolaris</i>	B 7	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
	C 10	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>
<i>Lupinus reitzii</i>	C 4, 9	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i> ,
<i>Lupinus</i> sp.1	C 2, 3	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> , <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
	D 2, 16	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Macroptilium gibbosifolium</i>	D 16	<i>Rhizobium melilot</i>
<i>Macroptilium heterophyllum</i>	D 5, 10	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Mimosa ramosissima</i>	C 8	<i>Burkholderia phymatum</i>
<i>Mimosa</i> sp.1	A 4	<i>Burkholderia phymatum</i>
	C 6	<i>Burkholderia phymatum</i>
<i>Mimosa</i> sp.2	A 10, 12	<i>Burkholderia mimosarum</i> , <i>Burkholderia phymatum</i>
<i>Mimosa</i> sp.3	A 15	<i>Burkholderia mimosarum</i>
	C 7	<i>Burkholderia mimosarum</i>
	D 10	<i>Burkholderia mimosarum</i>
<i>Mimosa</i> sp.4	C 8	<i>Burkholderia phymatum</i>
<i>Poiretia tetraphylla</i>	D 1	<i>Burkholderia phymatum</i>
<i>Rhynchosia corylifolia</i>	B 4	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
	D 1, 4	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Rhynchosia diversifolia</i>	B 1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
<i>Rhynchosia</i> sp.1	A 12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Rhynchosia</i> sp. 2	C 12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Rhynchosia</i> sp.3	C 12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Senna</i> sp.1	D 6	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Senna</i> sp.2	D 6	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Sesbania punicea</i>	B 1	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
<i>Sesbania virgata</i>	A 2, 11	<i>Azorhizobium doebereineriae</i> , <i>Rhizobium tropici</i>
	B 3, 10	<i>Rhizobium</i> sp.
<i>Stylosanthes leiocarpa</i>	A 7	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	D 1, 15, 16	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
		<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Bradyrhizobium</i>
<i>Stylosanthes montevidensis</i>	D 1, 12, 13	<i>stylosanthis</i>
<i>Stylosanthes</i> sp.1	D 12	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Trifolium polymorphum</i>	A 5, 6, 12, 13	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Bradyrhizobium elkanii</i>
	B 1, 4, 5, 6, 7,9, 14, 15	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Bradyrhizobium trifolii</i>
<i>Trifolium riograndense</i>	C 9	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Trifolium repens</i>	B 10	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	A 2, 4	<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i> , <i>Bradyrhizobium</i>
<i>Trifolium</i> sp.1		<i>yuanmingense</i>
<i>Vicia graminea</i>	B 10	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Vicia</i> sp.1	C 6	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Vicia</i> sp.2	C 6	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<i>Vigna peduncularis</i>	A 1	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>
	B 11	<i>Bradyrhizobium brasilense</i>
	D 1	<i>Bradyrhizobium brasilense</i>
		<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> , <i>Bradyrhizobium</i>
<i>Zornia</i> sp.1	D 12, 15	<i>japonicum</i>
<i>Zornia</i> sp.2	B 1	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>
	D 12, 15	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Zornia</i> sp.3	D 2	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>

<sup>1</sup>Identificação através de chave dicotômica. As plantas identificadas como sp.1, sp.2, sp.3 e sp.4 não puderem ser identificadas em nível taxonômico específico;

<sup>2</sup>Nomenclatura de referência às incursões realizadas a campo. Campos A, B e D = Bioma Pampa, Campo C = Campos de Cima da Serra, onde predomina o Bioma Mata Atlântica. Características de cada ponto são mostrados na Tabela Suplementar 1.

<sup>3</sup>Identidade acima de 85% de acordo com a base de dados GenBank.

Em estudos de diversidade genética microbiana, especialmente de amostras ambientais, não é raro que se encontre uma alta taxa de diversidade, não somente de espécies como de linhagens, bem como o potencial para descoberta de novas espécies entre as bactérias noduladoras de plantas leguminosas. Parker e seus colaboradores (Koppel e Parker, 2012; Parker, 2015) têm estudos sólidos na tentativa de elucidar as relações filogenéticas entre rizóbios e avaliar a evolução dos mesmos ao longo dessa tão bem-sucedida parceria bactéria-legume. Koppel e Parker (2012) realizaram uma análise avaliando linhagens de *Bradyrhizobium* ao longo da América do Norte. Mais recentemente, Parker (2015) realizou um amplo estudo utilizando 420 linhagens disponíveis do gênero *Bradyrhizobium* coletadas de 75 gêneros de plantas leguminosas provenientes de 25 países (que incluíram amostras da América do Norte, América Central, Europa e Ásia). Os isolados foram caracterizados através de MLSA de genes *housekeeping* e separadamente um gene relacionado à simbiose (*nifD*). Ambos os estudos demonstraram que muitos grupos de *Bradyrhizobium* utilizam diferentes grupos de leguminosas para estabelecer relações simbióticas, sugerindo que o gênero é muito plástico, pelo menos na sua evolução recente, em escolher o vegetal a ser colonizado e que maior especificidade é demonstrada ao analisarmos genes relacionados à simbiose. Portanto, apesar de alguns grupos manterem um certo padrão de especificidade com a planta hospedeira, há possibilidade de ampliação do alcance das linhagens atuais de *Bradyrhizobium* em relação a outros parceiros simbióticos.

Da mesma forma, outro pesquisador, Tomasz Stepkowski, possui estudos com isolados bacterianos de leguminosas coletadas na Europa (STEPKOWSKI et al., 2011; STEPKOWSKI et al., 2007), África (BEUKES et al., 2016b; STEENKAMP et al., 2008), Austrália (STEPKOWSKI et al., 2012) e América Central. No Brasil e América do Sul também houve uma série de estudos focados na simbiose existente entre rizóbios e soja (GALLI-TERASAWA et al., 2003; HUNGRIA et al., 2006; LU SHI CHEN et al., 2000).

Dessa forma, o presente estudo se propõe a incluir uma diversidade maior de gêneros de plantas abordados, com ênfase nas plantas nativas. Abrangendo uma grande

área ainda a ser explorada como fonte de conhecimento, visando também a aplicação do mesmo na conservação e recuperação de área degradadas, dado o potencial inerente das plantas leguminosas em sobreviver em ambientes relativamente pobres nutricionalmente e áduos nos fatores climáticos e de proporcionar nutrientes para os referidos solos.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O projeto de pesquisa aqui proposto teve como objetivo descrever a diversidade de rizóbios nas regiões subtropicais e temperadas do estado do Rio Grande do Sul. O conhecimento adquirido não apenas irá contribuir para um melhor entendimento da distribuição de espécies de rizóbios nas áreas amostradas, como também irá contribuir para futuros empreendimentos que visem o estudo e a utilização desses importantes organismos. Entre nossos objetivos específicos estavam identificar as espécies de rizóbios que nodulam legumes nativos nas regiões amostradas e investigar o nível de diversidade geral dos rizóbios nessas regiões, uma vez que a especificidade entre rizóbios e legumes nativos não é amplamente conhecida e existe a possibilidade de existirem diferentes rizóbios nesses ambientes.

Nossos resultados indicaram a falta de especificidade entre o parceiro bacteriano do gênero *Bradyrhizobium* e a planta hospedeira, demonstrados pelas análises filogenéticas dos genes *housekeeping* em legumes nativos do gênero *Desmodium* de diferentes populações. Porém, ao analisarmos o gene *nifD*, envolvido na fixação de nitrogênio e, portanto, envolvido diretamente em um dos fatores da simbiose, encontramos um padrão mais visível de seleção espécie-específica entre os parceiros simbióticos. Os resultados encontrados no primeiro capítulo ainda trazem reflexões sobre o uso de marcadores moleculares tradicionais nesse tipo de estudo, como o gene *dnaK*, que, em princípio, não se demonstrou muito apropriado, necessitando maior investigação. Além disso, há ainda grande possibilidade de haver novas espécies entre os isolados, visto que os mesmos não se agruparam de forma concordante com nenhuma espécie de referência utilizada no estudo.

Dados ambientais aqui obtidos poderão nos ajudar a compreender melhor o padrão de distribuição das espécies bacterianas e de suas plantas hospedeiras ao longo dos diferentes ambientes amostrados. Essas análises ainda deverão ser realizadas.

Outra possibilidade de estudo é a inclusão de genes de linhagens amplamente utilizadas como inoculantes no Brasil (SEMIA 587, 5019, 5079 e 5080) nas análises filogenéticas, a fim de verificarmos se as bactérias isoladas poderiam ter sido originadas dessas linhagens.



## 6. REFERÊNCIAS

- ACINAS, Silvia G. et al. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 186, n. 9, p. 2629–2635, 2004.
- ANDAM, Cheryl P.; PARKER, Matthew A. Novel alphaproteobacterial root nodule symbiont associated with *Lupinus texensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 17, p. 5687–5691, 2007.
- ANDREWS, M.; RAVEN, J. A.; LEA, P. J. Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. [s. l.], n. 3, p. 1–26, 2013.
- ANDREWS, Mitchell et al. Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural ecosystems: values obtained using <sup>15</sup>N natural abundance. **Plant Ecology & Diversity**, [s. l.], v. 4, n. 2–3, p. 131–140, 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17550874.2011.644343>>
- AUSMEES, N. et al. Characterization of NopP, a Type III Secreted Effector of *Rhizobium* sp. Strain NGR234. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 186, n. 14, p. 4774–4780, 2004. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.186.14.4774-4780.2004>>. Acesso em: 27 abr. 2018.
- BALDANI, JoséI. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 29, n. 5–6, p. 911–922, 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071796002180>>. Acesso em: 12 abr. 2018.
- BARBIERI, Rosa Lía et al. Recursos genéticos do Bioma Pampa. **Mesa Redonda 10 - USO, VALORAÇÃO E EXPERIÊNCIAS EXITOSAS COM RECURSO GENÉTICOS VEGETAIS NO CERRADO, CAATINGA E PAMPA**, [s. l.], 2009.
- BARCELLOS, Fernando Gomes et al. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 8, p. 2635–2643, 2007.
- BENEDUZI, Anelise et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, [s. l.], v. 63, p. 94–104, 2013.
- BEUKES, Chrizelle W. et al. *Crotalariaeae* and *Genisteae* of the South African Great Escarpment are nodulated by novel *Bradyrhizobium* species with unique and diverse symbiotic loci. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 100, p. 206–218, 2016. a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055790316300458>>
- BEUKES, Chrizelle W. et al. *Crotalariaeae* and *Genisteae* of the South African Great Escarpment are nodulated by novel *Bradyrhizobium* species with unique and diverse symbiotic loci. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 100, p. 206–218, 2016. b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055790316300458>>. Acesso em: 12 abr. 2018.
- BHATTACHARJEE, Rumpa Biswas; SINGH, Aqbal; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: Prospects and challenges.

- Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 199–209, 2008.
- BOLDRINI, Ilsi. **Campos do Rio Grande do Sul: caracterização fisionômica e problemática ocupacional**. 56. ed. Porto Alegre: B. Inst. Bioc./UFRGS, 1997. Disponível em: <[al/oclc/77551059?referer=di&ht=edition](http://oclc/77551059?referer=di&ht=edition)>
- BOURNAUD, Caroline et al. Burkholderia Species Are the Most Common and Preferred Nodulating Symbionts of the Piptadenia Group (Tribe Mimoseae). **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 5, 2013.
- BRADY, Nyle C. **The nature and properties of soils**. Ninth ed. New York, USA: Macmillan Publishing Company, 1984.
- CHEN, W. M. et al. Beta-Rhizobia from Mimosoza pigra, a newly discovered invasive plant in Taiwan; **New Phytol**, [s. l.], p. 1–15, 2005.
- CRAWSHAW, Danielle et al. CARACTERIZAÇÃO DOS CAMPOS SUL-RIO-GRANDENSES: UMA PERSPECTIVA DA ECOLOGIA DA PAISAGEM. [s. l.], p. 233–252, 2007. Disponível em: <[http://files.agb-portoalegre.webnode.com.br/200000057-a7a38a89db/33\\_art\\_04.pdf](http://files.agb-portoalegre.webnode.com.br/200000057-a7a38a89db/33_art_04.pdf)>. Acesso em: 27 abr. 2018.
- CREWS, Timothy E.; PEOPLES, Mark B. Can the synchrony of nitrogen supply and crop demand be improved in legume and fertilizer-based agroecosystems? A review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 101–120, 2005.
- DIETZ, Robert S.; HOLDEN, John C. Reconstruction of Pangaea: Breakup and dispersion of continents, Permian to Present. **Journal of Geophysical Research**, [s. l.], v. 75, n. 26, p. 4939, 1970.
- DIXON, Ray A. The genetic Complexity of Nitrogen Fixation. **Journal of bone & joint surgery**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 709–718, 1984.
- DIXON, Ray; KAHN, Daniel. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.
- DO NASCIMENTO, Paulo C. et al. Uso da terra e atributos de solos do estado do Rio Grande do Sul. [s. l.], p. 920–926, 2014.
- FAROOQ, Faisal T.; VESSEY, J. Kevin. Genetic diversity of Bradyrhizobium japonicum within soybean growing regions of the north-eastern Great Plains of North America as determined by REP-PCR and ERIC-PCR profiling. **Symbiosis**, [s. l.], v. 48, n. 1–3, p. 131–142, 2009.
- FILIPE, Fernandes de Sousa et al. Legumes as green manure for common bean cultivated in two growing seasons at southeast Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, [s. l.], v. 11, n. 49, p. 4953–4958, 2016. Disponível em: <<http://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/72907A362021>>. Acesso em: 12 mar. 2018.
- FLORA DO BRASIL 2020. **Flora do Brasil 2020**. 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 11 mar. 2018.
- FREIBERG, Christoph et al. Molecular Basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. **Nature**, [s. l.], v. 387, n. 394–401, 1997.
- GALLI-TERASAWA, L. V.; GLIENKE-BLANCO, C.; HUNGRIA, M. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 933–939, 2003.

GRANADA, Camille E. et al. Multilocus sequence analysis reveals taxonomic differences among *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *Lupinus albus* plants growing in arenized and non-arenized areas. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 323–329, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.009>>

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 395–412, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071704003608>>. Acesso em: 12 abr. 2018.

GRESSHOFF, Peter M. Post-genomic insights into plant nodulation symbioses. **Genome Biology**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2003.

GU, Chun Tao et al. Diversity and geographical distribution of rhizobia associated with *Lespedeza* spp. in temperate and subtropical regions of China. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 188, n. 4, p. 355–365, 2007.

HALL, Thomas A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, [s. l.], v. 41, p. 95–98, 1999. Disponível em: <<http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>. Acesso em: 27 abr. 2018.

HASENACK, Heinrich et al. **Mapa de sistemas ecológicos da ecorregião das savanas uruguaias. Centro de Ecologia UFRGS e TNC**. Porto Alegre. Disponível em: <[http://www.ecologia.ufrgs.br/labgeo/arquivos/downloads/dados/Mapeamento\\_bioma\\_pampa/Relatorio\\_bioma\\_Pampa.pdf](http://www.ecologia.ufrgs.br/labgeo/arquivos/downloads/dados/Mapeamento_bioma_pampa/Relatorio_bioma_Pampa.pdf)>. Acesso em: 12 mar. 2018.

HUNGRIA M., MENDES I. C., Mercante F. M. **A fixação biológica do nitrogênio como tecnologia de baixa emissão de carbono para as culturas do feijoeiro e da soja**. Londrina Embrapa Soja, , 2013. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/964424/a-fixacao-biologica-do-nitrogenio-como-tecnologia-de-baixa-emissao-de-carbono-para-as-culturas-do-feijoeiro-e-da-soja>>

HUNGRIA, Mariangela et al. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 288, n. 1–2, p. 343–356, 2006.

IGANCI, João R. V et al. Campos de Cima da Serra: The Brazilian Subtropical Highland Grasslands show an unexpected level of plant endemism. **Botanical Journal of the Linnean Society**, [s. l.], v. 167, n. 4, p. 378–393, 2011.

IRSHAD, Saba et al. Molecular characterization of *Desmodium* species - An important ingredient of “Dashmoola” by RAPD analysis. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 115–118, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2008.11.004>>

K, Allen O. N; .. Allen Ethel. **The Leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation**, 1981.

KANEKO, Takakazu et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Research**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 189–97, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12597275>>

KANEKO, Takakazu et al. Complete genome sequence of the soybean symbiont *bradyrhizobium japonicum* strain USDA6 T. **Genes**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 763–787, 2011.

- KERMAH, M. et al. N<sub>2</sub> -fixation and N contribution by grain legumes under different soil fertility status and cropping systems in the Guinea savanna of northern Ghana. [s. l.], 2017. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S0167880917303857/1-s2.0-S0167880917303857-main.pdf?\\_tid=f9d7ca95-92d4-4dde-a6de-ae607e5cc9d6&acdnat=1520818843\\_6bf0cb4acd348f45f36aacc5b8279473](https://ac.els-cdn.com/S0167880917303857/1-s2.0-S0167880917303857-main.pdf?_tid=f9d7ca95-92d4-4dde-a6de-ae607e5cc9d6&acdnat=1520818843_6bf0cb4acd348f45f36aacc5b8279473)>. Acesso em: 11 mar. 2018.
- KOPPELL, Jonathan H.; PARKER, Matthew A. Phylogenetic clustering of Bradyrhizobium symbionts on legumes indigenous to North America. **Microbiology (United Kingdom)**, [s. l.], v. 158, n. 8, p. 2050–2059, 2012.
- LOH, John et al. Nodulation Gene Regulation in. **Society**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 10–17, 2003.
- LU SHI CHEN et al. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 11, p. 5099–5103, 2000.
- MCLENNAN, S. M. et al. Elemental Geochemistry of Sedimentary Rocks at Yellowknife Bay, Gale Crater, Mars. **Science**, [s. l.], v. 343, n. 6169, p. 1244734–1244734, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1244734>>
- MENNA, Pâmela; BARCELLOS, Fernando Gomes; HUNGRIA, Mariangela. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and glnII, recA, atpD and dnaK genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 12, p. 2934–2950, 2009.
- MYLONA, Panagiota; PAWLOWSKI, Katarina; BISSELING, Ton. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 7, n. July, p. 869–885, 1995. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119991311.ch3/summary>>
- NEWTON, WE. Nitrogen fixation in perspective. In: FO PEDROSA, M HUNGRIA, MG YATES, WE; NEWTON (Eds.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 3–8.
- NIELSEN, Kaare M.; B??HN, Thomas; TOWNSEND, Jeffrey P. Detecting rare gene transfer events in bacterial populations. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. JAN, p. 1–12, 2013.
- NOISANGIAM, Rujirek et al. Heavy metal tolerant Metalliresistens boonkerdii gen. nov., sp. nov., a new genus in the family Bradyrhizobiaceae isolated from soil in Thailand. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 374–382, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.06.002>>
- OHASHI, H. Desmodieae Tribe. In: LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B., LOCK, M. (Ed.). **World, Legumes of the Royal**, . Kew: Botanic Gardens, 2005. p. 433–453.
- OKAMURA, Keiko; TAKATA, Koji; HIRAISHI, Akira. Intrageneric relationships of members of the genus Rhodopseudomonas. **The Journal of general and applied microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 469–478, 2009.
- OKAZAKI, Shin et al. Genome analysis of a novel bradyrhizobium sp. doa9 carrying a symbiotic plasmid. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 1–18, 2015.
- OLIVEIRA, M. Estudo taxonômico do gênero Desmodium (Leguminosae, Papilionoideae,

- Desmodieae). **Iheringia Série Botânica**, [s. l.], v. 31, p. 37–104, 1983.
- PARKER, M. A. Bradyrhizobia from Wild Phaseolus, Desmodium, and Macroptilium Species in Northern Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 4, p. 2044–2048, 2002. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/content/long/68/4/2044>>. Acesso em: 12 jul. 2016.
- PARKER, Matthew A. Relationships of bradyrhizobia from the legumes *Apios americana* and *Desmodium glutinosum*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 11, p. 4914–4920, 1999.
- PARKER, Matthew A. Legumes select symbiosis island sequence variants in *Bradyrhizobium*. **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 1769–1778, 2012.
- PARKER, Matthew A. The Spread of *Bradyrhizobium* Lineages Across Host Legume Clades: from *Abarema* to *Zygia*. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 630–640, 2015.
- PILLAR, Valério de Patta et al. **Campos Sulinos**. Brasília: MMA, 2009.
- PILLAR, Valério de Patta; LANGE, Omara. **Os Campos do Sul**. Porto Alegre: Rede Campos Sulinos- UFRGS, 2015.
- RIVAS, Raul et al. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 101–110, 2009.
- SANT'ANNA, Fernando H. et al. Reclassification of *Paenibacillus riograndensis* as a Genomovar of *Paenibacillus sonchi*: Genome-Based Metrics Improve Bacterial Taxonomic Classification. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 1849, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01849/full>>. Acesso em: 27 abr. 2018.
- SARMIENTO, Guillermo. The Dry Plant Formations of South America and Their Floristic Connections. **Journal of Biogeography**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 233, 1975. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/3037998?origin=crossref>>. Acesso em: 24 mar. 2018.
- SOMASEGARAM, P., HOBEN, M. J. Methods in legume-rhizobium technology. 1985. **NIFTAL, Hawaii.**, [s. l.], p. 367, [s.d.].
- SPARKS, Donald. Methods of soil analysis: chemical methods. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. SSSA Book, 1996.
- STEENKAMP, Emma T. et al. Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated by diverse *Bradyrhizobium* strains harboring nodulation genes that belong to the large pantropical clade common in Africa. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 1131–1144, 2008.
- STEPKOWSKI, T. et al. European Origin of *Bradyrhizobium* Populations Infecting Lupins and *Serradella* in Soils of Western Australia and South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 71, n. 11, p. 7041–7052, 2005. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.71.11.7041-7052.2005>>. Acesso em: 27 abr. 2018.
- STEPKOWSKI, Tomasz et al. *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and *serradella* plants growing in Europe. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 368–375, 2011.
- STEPKOWSKI, Tomasz et al. Distinct *Bradyrhizobium* communities nodulate legumes

native to temperate and tropical monsoon Australia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 265–277, 2012.

STĘPKOWSKI, Tomasz et al. Diversification of lupine Bradyrhizobium strains: Evidence from nodulation gene trees. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 10, p. 3254–3264, 2007.

SYVANEN, Michael. Evolutionary implications of horizontal gene transfer. **Annual review of genetics**, [s. l.], v. 46, p. 341–58, 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org.proxy.library.cornell.edu/doi/full/10.1146/annurev-genet-110711-155529>>

TEAMTISONG, Kamonluck et al. Divergent Nod-Containing Bradyrhizobium sp. DOA9 with a Megaplasmid and its Host Range. **Microbes and Environments**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 370–376, 2014. Disponível em: <<http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/jsme2/ME14065?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>>

TIAN, Chang Fu et al. Genetic diversity of rhizobia associated with Vicia faba in three ecological regions of China. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 188, n. 3, p. 273–282, 2007.

VERDUM, R. Approche géographique des “déserts” dans les communes de São Francisco de Assis et Manuel Viana, Etat du Rio Grande do Sul, Brésil. [s. l.], p. 221, 1997. Disponível em: <<http://www.ehess.fr/crbc/cbc-thes/geo.html#1985>>

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.**, [s. l.], 1970. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19710700726>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

WULFF, Renata D. Seed Size Variation in Desmodium Paniculatum: II . Effects on Seedling Growth and Physiological Performance Author ( s ): Renata D . Wulff Published by: British Ecological Society Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2260351> REFERENCES Linked refere. [s. l.], v. 74, n. 1, p. 99–114, 2018.

XU, Kai Wei et al. Polyphasic characterization of rhizobia isolated from Leucaena leucocephala from Panxi, China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 29, n. 12, p. 2303–2315, 2013.

XU, Kai Wei et al. Diversity and phylogeny of rhizobia associated with Desmodium spp. in Panxi, Sichuan, China. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 33–40, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2015.10.005>>

XU, Lin et al. Phylogenetic diversity on housekeeping and symbiotic genes of rhizobial from Sphaerophysa in China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 1451–1459, 2015.

ZHANG, Wei Tao et al. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [Vigna unguiculata (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 201–210, 2007.

**Tabela suplementar 1:** Locais de coleta e suas características, plantas hospedeiras e identificação aproximada do isolado bacteriano correspondente.

Cidade	Código	Local de coleta	Tipo de Solo	Planta Hospedeira	Isolado	Identificação (housekeeping genes)*	Argila (%)	OM (%)	P (ppm)	K (ppm)	Al (cmolc/dm <sup>3</sup> )	pH	CEC pH 7	Ca (cmol/dm <sup>3</sup> )	Mg (cmolc/dm <sup>3</sup> )	V (%)
Bagé	A	1	Neossolo litólico	<i>Arachis burkartii</i>	A3.2	<i>B.<sup>1</sup> embrapense</i>	8	1,7	17,8	149	0,1	5,4	6,6	3,5	0,7	70,5
Bagé	A	1	Neossolo litólico	<i>Arachis burkartii</i>	A3.3	<i>B. embrapense</i>	8	1,7	17,8	149	0,1	5,4	6,6	3,5	0,7	70,5
Bagé	A	1	Neossolo litólico	<i>Arachis burkartii</i>	A3.4	<i>B. embrapense</i>	8	1,7	17,8	149	0,1	5,4	6,6	3,5	0,7	70,5
Bagé	A	1	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A1.4	<i>B. elkanii</i>	8	1,7	17,8	149	0,1	5,4	6,6	3,5	0,7	70,5
Bagé	A	1	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A1.5	<i>B. elkanii</i>	8	1,7	17,8	149	0,1	5,4	6,6	3,5	0,7	70,5
Bagé	A	1	Neossolo litólico	<i>Vigna peduncularis</i>	A2.2	<i>B. diazoefficiens</i>	8	1,7	17,8	149	0,1	5,4	6,6	3,5	0,7	70,5
Bagé	A	2	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A5.5	<i>B. iriomotense</i>	14	2,2	1,5	76	0,4	5,1	12,3	4,2	2,4	55,5
Bagé	A	2	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A5.6	<i>B. iriomotense</i>	14	2,2	1,5	76	0,4	5,1	12,3	4,2	2,4	55,5
Bagé	A	2	Neossolo litólico	<i>Sesbania virgata</i>	A6.3	<i>A.<sup>2</sup> doebereineriae</i>	14	2,2	1,5	76	0,4	5,1	12,3	4,2	2,4	55,5
Bagé	A	2	Neossolo litólico	<i>Sesbania virgata</i>	A6.4	<i>A. doebereineriae</i>	14	2,2	1,5	76	0,4	5,1	12,3	4,2	2,4	55,5
Bagé	A	2	Neossolo litólico	<i>Sesbania virgata</i>	A6.5	<i>A. doebereineriae</i>	14	2,2	1,5	76	0,4	5,1	12,3	4,2	2,4	55,5
Bagé	A	2	Neossolo litólico	<i>Trifolium sp.1</i>	A4.1	<i>B. yuanmingense</i>	14	2,2	1,5	76	0,4	5,1	12,3	4,2	2,4	55,5
Bagé	A	2	Neossolo litólico	<i>Trifolium sp.1</i>	A4.2	<i>B. yuanmingense</i>	14	2,2	1,5	76	0,4	5,1	12,3	4,2	2,4	55,5
Bagé	A	2	Neossolo litólico	<i>Trifolium sp.1</i>	A4.3	<i>B. viridifuturi</i>	14	2,2	1,5	76	0,4	5,1	12,3	4,2	2,4	55,5
Bagé	A	4	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A9.1	<i>B. canariense</i>	14	3,7	1,5	99	0,2	5,3	15,1	6,2	1,7	54,4
Bagé	A	4	Neossolo litólico	<i>Mimosa sp.1</i>	A10.1	<i>B. phymatum<sup>3</sup></i>	14	3,7	1,5	99	0,2	5,3	15,1	6,2	1,7	54,4
Bagé	A	4	Neossolo litólico	<i>Mimosa sp.1</i>	A10.2	<i>B. phymatum</i>	14	3,7	1,5	99	0,2	5,3	15,1	6,2	1,7	54,4
Bagé	A	4	Neossolo litólico	<i>Trifolium sp.1</i>	A11.1	<i>B. viridifuturi</i>	14	3,7	1,5	99	0,2	5,3	15,1	6,2	1,7	54,4
Bagé	A	4	Neossolo litólico	<i>Trifolium sp.1</i>	A11.2	<i>B. viridifuturi</i>	14	3,7	1,5	99	0,2	5,3	15,1	6,2	1,7	54,4
Bagé	A	5	Neossolo litólico	<i>Rhynchosia sp.1</i>	A12.1	<i>B. japonicum</i>	15	2	57,1	74	0,1	5,9	14,7	8,2	2,3	73,5
Bagé	A	5	Neossolo litólico	<i>Rhynchosia sp.1</i>	A12.2	<i>B. japonicum</i>	15	2	57,1	74	0,1	5,9	14,7	8,2	2,3	73,5
Bagé	A	5	Neossolo litólico	<i>Rhynchosia sp.1</i>	A12.3	<i>B. japonicum</i>	15	2	57,1	74	0,1	5,9	14,7	8,2	2,3	73,5
Bagé	A	5	Neossolo litólico	<i>Trifolium polymorphum</i>	A13.1	<i>R.<sup>4</sup> leguminosarum</i>	15	2	57,1	74	0,1	5,9	14,7	8,2	2,3	73,5
Bagé	A	5	Neossolo litólico	<i>Trifolium polymorphum</i>	A13.2	<i>R. leguminosarum</i>	15	2	57,1	74	0,1	5,9	14,7	8,2	2,3	73,5
Bagé	A	6	Neossolo litólico	<i>Trifolium polymorphum</i>	A15.1	<i>R. leguminosarum</i>	15	2,7	203	155	0,2	5,3	19,6	9,2	4,4	72
Bagé	A	6	Neossolo litólico	<i>Trifolium polymorphum</i>	A15.2	<i>R. leguminosarum</i>	15	2,7	203	155	0,2	5,3	19,6	9,2	4,4	72

Bagé	A	6	Neossolo litólico	<i>Trifolium polymorphum</i>	A15.6	<i>R. leguminosarum</i>	15	2,7	203	155	0,2	5,3	19,6	9,2	4,4	72
Santana da Boa Vista	A	7	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A17.3	<i>B. elkanii</i>	19	1,3	1,5	87	4,5	5	17,3	1	0,6	10,7
Santana da Boa Vista	A	7	Neossolo litólico	<i>Stylosanthes leiocarpa</i>	A16.2	<i>B. japonicum</i>	19	1,3	1,5	87	4,5	5	17,3	1	0,6	10,7
Santana da Boa Vista	A	8	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A19.1	<i>B. yuanmingense</i>	14	2,2	1,5	344	1	4,8	9,9	2,3	0,5	37,9
Santana da Boa Vista	A	8	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A19.2	<i>B. yuanmingense</i>	14	2,2	1,5	344	1	4,8	9,9	2,3	0,5	37,9
Santana da Boa Vista	A	8	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A19.3	<i>B. viridifuturi</i>	14	2,2	1,5	344	1	4,8	9,9	2,3	0,5	37,9
Santana da Boa Vista	A	9	Nitossolo/Chernossolo	<i>Arachis burkartii</i>	A20.1	<i>B. japonicum</i>	20	2,9	1,5	97	0,4	5,3	13,7	3,6	2,8	49,6
Santana da Boa Vista	A	9	Nitossolo/Chernossolo	<i>Arachis burkartii</i>	A20.2	<i>B. japonicum</i>	20	2,9	1,5	97	0,4	5,3	13,7	3,6	2,8	49,6
Santana da Boa Vista	A	9	Nitossolo/Chernossolo	<i>Arachis burkartii</i>	A20.3	<i>B. japonicum</i>	20	2,9	1,5	97	0,4	5,3	13,7	3,6	2,8	49,6
Santana da Boa Vista	A	9	Nitossolo/Chernossolo	<i>Desmodium incanum</i>	A21.1	<i>B. elkanii</i>	20	2,9	1,5	97	0,4	5,3	13,7	3,6	2,8	49,6
Santana da Boa Vista	A	9	Nitossolo/Chernossolo	<i>Desmodium incanum</i>	A21.4	<i>B. yuanmingense</i>	20	2,9	1,5	97	0,4	5,3	13,7	3,6	2,8	49,6
Santana da Boa Vista	A	10	Neossolo quartzarênico	<i>Arachis burkartii</i>	A24.1	<i>B. elkanii</i>	6	0,7	1,5	26	0,9	4,8	3,9	0,5	0,2	20,8
Santana da Boa Vista	A	10	Neossolo quartzarênico	<i>Desmodium incanum</i>	A23.5	<i>B. elkanii</i>	6	0,7	1,5	26	0,9	4,8	3,9	0,5	0,2	20,8
Santana da Boa Vista	A	10	Neossolo quartzarênico	<i>Desmodium incanum</i>	A23.6	<i>B. elkanii</i>	6	0,7	1,5	26	0,9	4,8	3,9	0,5	0,2	20,8
Santana da Boa Vista	A	10	Neossolo quartzarênico	<i>Mimosa</i> sp.2	A22.1	<i>B. phymatum</i>	6	0,7	1,5	26	0,9	4,8	3,9	0,5	0,2	20,8
Santana da Boa Vista	A	10	Neossolo quartzarênico	<i>Mimosa</i> sp.2	A22.2	<i>B. phymatum</i>	6	0,7	1,5	26	0,9	4,8	3,9	0,5	0,2	20,8
Santana da Boa Vista	A	11	Neossolo quartzarênico	<i>Desmodium incanum</i>	A26.1	<i>B. elkanii</i>	10	0,3	31,4	48	0	6,5	5,8	3,6	0,5	73,4
Santana da Boa Vista	A	11	Neossolo quartzarênico	<i>Sesbania virgata</i>	A25.1	<i>R. tropici</i>	10	0,3	31,4	48	0	6,5	5,8	3,6	0,5	73,4
Santana da Boa Vista	A	11	Neossolo quartzarênico	<i>Sesbania virgata</i>	A25.3	<i>R. tropici</i>	10	0,3	31,4	48	0	6,5	5,8	3,6	0,5	73,4
Santana da Boa Vista	A	12	Neossolo quartzarênico	<i>Desmodium affine</i>	A30.2	<i>B. jicamae</i>	8	1,6	88,6	74	0,1	5,7	6,5	3,3	0,5	62
Santana da Boa Vista	A	12	Neossolo quartzarênico	<i>Desmodium incanum</i>	A28.5	<i>B. elkanii</i>	8	1,6	88,6	74	0,1	5,7	6,5	3,3	0,5	62
Santana da Boa Vista	A	12	Neossolo quartzarênico	<i>Desmodium incanum</i>	A28.6	<i>B. elkanii</i>	8	1,6	88,6	74	0,1	5,7	6,5	3,3	0,5	62
Santana da Boa Vista	A	12	Neossolo quartzarênico	<i>Mimosa</i> sp.2	A27.1	<i>B. mimosarum</i> <sup>5</sup>	8	1,6	88,6	74	0,1	5,7	6,5	3,3	0,5	62
Santana da Boa Vista	A	12	Neossolo quartzarênico	<i>Mimosa</i> sp.2	A27.2	<i>B. mimosarum</i>	8	1,6	88,6	74	0,1	5,7	6,5	3,3	0,5	62
Santana da Boa Vista	A	12	Neossolo quartzarênico	<i>Trifolium polymorphum</i>	A33.1	<i>B. elkanii</i>	8	1,6	88,6	74	0,1	5,7	6,5	3,3	0,5	62
Santana da Boa Vista	A	12	Neossolo quartzarênico	<i>Trifolium polymorphum</i>	A33.2	<i>B. elkanii</i>	8	1,6	88,6	74	0,1	5,7	6,5	3,3	0,5	62
Santana da Boa Vista	A	13	Neossolo quartzarênico	<i>Trifolium polymorphum</i>	A37.1	<i>B. elkanii</i>	10	1,6	1,5	73	0,2	5,1	6,6	2,3	0,6	47,5
Santana da Boa Vista	A	13	Neossolo quartzarênico	<i>Trifolium polymorphum</i>	A37.3	<i>B. elkanii</i>	10	1,6	1,5	73	0,2	5,1	6,6	2,3	0,6	47,5
Santana da Boa Vista	A	14	Cambissolo	<i>Desmodium affine</i>	A40.1	<i>B. elkanii</i>	14	1,8	1,5	82	0,2	5,6	8,9	3	0,7	44,7
Santana da Boa Vista	A	14	Cambissolo	<i>Desmodium affine</i>	A40.2	<i>B. elkanii</i>	14	1,8	1,5	82	0,2	5,6	8,9	3	0,7	44,7



Santana da Boa Vista	A	14	Cambissolo	<i>Desmodium affine</i>	A40.3	<i>B. elkanii</i>	14	1,8	1,5	82	0,2	5,6	8,9	3	0,7	44,7
Santana da Boa Vista	A	14	Cambissolo	<i>Desmodium incanum</i>	A39.5	<i>B. embrapense</i>	14	1,8	1,5	82	0,2	5,6	8,9	3	0,7	44,7
Encruzilhada do Sul	A	15	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A43.5	<i>B. elkanii</i>	21	1,8	1,5	191	0,5	5,2	11	3,3	1,7	50,2
Encruzilhada do Sul	A	15	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A43.6	<i>B. elkanii</i>	21	1,8	1,5	191	0,5	5,2	11	3,3	1,7	50,2
Encruzilhada do Sul	A	15	Neossolo litólico	<i>Mimosa</i> sp.3	A41.1	<i>B. mimosarum</i>	21	1,8	1,5	191	0,5	5,2	11	3,3	1,7	50,2
Encruzilhada do Sul	A	15	Neossolo litólico	<i>Mimosa</i> sp.3	A41.3	<i>B. mimosarum</i>	21	1,8	1,5	191	0,5	5,2	11	3,3	1,7	50,2
Encruzilhada do Sul	A	16	Neossolo litólico	<i>Chamaecrista nictitans</i>	A46.1	<i>R. leguminosarum</i>	27	0,5	23,8	96	0,5	5,6	11,5	3,6	3,2	61,9
Encruzilhada do Sul	A	16	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A45.4	<i>B. viridifuturi</i>	27	0,5	23,8	96	0,5	5,6	11,5	3,6	3,2	61,9
Encruzilhada do Sul	A	16	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	A45.5	<i>B. elkanii</i>	27	0,5	23,8	96	0,5	5,6	11,5	3,6	3,2	61,9
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Arachis burkartii</i>	B3.1	<i>B. daqingense</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Arachis burkartii</i>	B3.2	<i>B. daqingense</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Arachis burkartii</i>	B3.3	<i>B. daqingense</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Desmodium affine</i>	B9.1	<i>B. elkanii</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	B2.1	<i>B. tropiciagri</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	B2.2	<i>B. viridifuturi</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	B2.3	<i>B. viridifuturi</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Eriosema</i> sp.1	B5.1	<i>B. elkanii</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Eriosema</i> sp.1	B5.2	<i>B. elkanii</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Rhynchosia corylifolia</i>	B4.1	<i>A. caulinodans</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Rhynchosia corylifolia</i>	B4.2	<i>A. caulinodans</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Rhynchosia diversifolia</i>	B6.1	<i>B. elkanii</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Rhynchosia diversifolia</i>	B6.2	<i>B. elkanii</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Sesbania punicea</i>	B7.2	<i>B. yuanmingense</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Sesbania punicea</i>	B7.3	<i>B. yuanmingense</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Trifolium polymorphum</i>	B1.1	<i>B. elkanii</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Trifolium polymorphum</i>	B1.2	<i>B. elkanii</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Trifolium polymorphum</i>	B1.3	<i>B. elkanii</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.2	B8.1	<i>B. yuanmingense</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.2	B8.2	<i>B. yuanmingense</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8
Livramento	B	1	Argissolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.2	B8.3	<i>B. yuanmingense</i>	10	2,3	9,7	93	0,5	4,4	6,9	1,3	1	36,8

Livramento	B	2	Argissolo Vermelho	<i>Adesmia incana</i>	B11.2	<i>B. elkanii</i>	10	1,8	11,4	65	0,3	4,6	4	0,8	0,6	39
Livramento	B	2	Argissolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	B10.2	<i>B. elkanii</i>	10	1,8	11,4	65	0,3	4,6	4	0,8	0,6	39
Livramento	B	3	Neossolo litólico	<i>Adesmia incana</i>	B11.3	<i>B. elkanii</i>	10	2,6	28,1	252	0,2	4,9	24,7	14,3	5,8	84,2
Livramento	B	3	Neossolo litólico	<i>Arachis burkartii</i>	B15.1	<i>B. japonicum</i>	10	2,6	28,1	252	0,2	4,9	24,7	14,3	5,8	84,2
Livramento	B	3	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	B12.1	<i>B. viridifuturi</i>	10	2,6	28,1	252	0,2	4,9	24,7	14,3	5,8	84,2
Livramento	B	3	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	B12.2	<i>B. viridifuturi</i>	10	2,6	28,1	252	0,2	4,9	24,7	14,3	5,8	84,2
Livramento	B	3	Neossolo litólico	<i>Sesbania virgata</i>	B14.2	<i>R. sp.</i>	10	2,6	28,1	252	0,2	4,9	24,7	14,3	5,8	84,2
Livramento	B	3	Neossolo litólico	<i>Sesbania virgata</i>	B14.3	<i>R. sp.</i>	10	2,6	28,1	252	0,2	4,9	24,7	14,3	5,8	84,2
Livramento	B	4	Neossolo litólico	<i>Adesmia incana</i>	B18.1	<i>B. elkanii</i>	26	1,9	3,9	129	0,3	4,8	28,1	15,8	5,7	78,1
Livramento	B	4	Neossolo litólico	<i>Adesmia incana</i>	B18.2	<i>B. elkanii</i>	26	1,9	3,9	129	0,3	4,8	28,1	15,8	5,7	78,1
Livramento	B	4	Neossolo litólico	<i>Adesmia incana</i>	B19.1	<i>B. japonicum</i>	26	1,9	3,9	129	0,3	4,8	28,1	15,8	5,7	78,1
Livramento	B	4	Neossolo litólico	<i>Arachis burkartii</i>	B15.2	<i>B. japonicum</i>	26	1,9	3,9	129	0,3	4,8	28,1	15,8	5,7	78,1
Livramento	B	4	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	B16.1	<i>B. viridifuturi</i>	26	1,9	3,9	129	0,3	4,8	28,1	15,8	5,7	78,1
Livramento	B	4	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	B16.3	<i>B. viridifuturi</i>	26	1,9	3,9	129	0,3	4,8	28,1	15,8	5,7	78,1
Livramento	B	4	Neossolo litólico	<i>Trifolium polymorphum</i>	B17.1	<i>R. trifolii</i>	26	1,9	3,9	129	0,3	4,8	28,1	15,8	5,7	78,1
Livramento	B	4	Neossolo litólico	<i>Trifolium polymorphum</i>	B17.2	<i>R. trifolii</i>	26	1,9	3,9	129	0,3	4,8	28,1	15,8	5,7	78,1
Livramento	B	5	Neossolo litólico	<i>Adesmia incana</i>	B19.2	<i>B. japonicum</i>	21	2,3	3,9	192	0,1	5,4	31,7	17,3	8,3	82,7
Livramento	B	5	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	B20.3	<i>B. viridifuturi</i>	21	2,3	3,9	192	0,1	5,4	31,7	17,3	8,3	82,7
Livramento	B	5	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	B22.1	<i>B. liaoningense</i>	21	2,3	3,9	192	0,1	5,4	31,7	17,3	8,3	82,7
Livramento	B	5	Neossolo litólico	<i>Trifolium polymorphum</i>	B21.2	<i>B. japonicum</i>	21	2,3	3,9	192	0,1	5,4	31,7	17,3	8,3	82,7
Livramento	B	5	Neossolo litólico	<i>Trifolium polymorphum</i>	B21.3	<i>B. japonicum</i>	21	2,3	3,9	192	0,1	5,4	31,7	17,3	8,3	82,7
Livramento	B	6	Chernossolo Argilúvico	<i>Adesmia incana</i>	B24.2	<i>B. elkanii</i>	14	1,4	13,2	134	0	5,9	32	18,1	10,3	90,4
Livramento	B	6	Chernossolo Argilúvico	<i>Lupinus bracteolaris</i>	B25.1	<i>B. yuanmingense</i>	14	1,4	13,2	134	0	5,9	32	18,1	10,3	90,4
Livramento	B	6	Chernossolo Argilúvico	<i>Trifolium polymorphum</i>	B23.2	<i>B. japonicum</i>	14	1,4	13,2	134	0	5,9	32	18,1	10,3	90,4
Livramento	B	6	Chernossolo Argilúvico	<i>Trifolium polymorphum</i>	B23.3	<i>B. japonicum</i>	14	1,4	13,2	134	0	5,9	32	18,1	10,3	90,4
Livramento	B	7	Argissolo Vermelho	<i>Arachis burkartii</i>	B28.1	<i>B. daqingense</i>	13	5,1	4,7	204	0,2	5,5	5,9	2,2	1,6	73,7
Livramento	B	7	Argissolo Vermelho	<i>Arachis burkartii</i>	B28.2	<i>B. daqingense</i>	13	5,1	4,7	204	0,2	5,5	5,9	2,2	1,6	73,7
Livramento	B	7	Argissolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	B27.1	<i>B. japonicum</i>	13	5,1	4,7	204	0,2	5,5	5,9	2,2	1,6	73,7
Livramento	B	7	Argissolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	B27.2	<i>B. japonicum</i>	13	5,1	4,7	204	0,2	5,5	5,9	2,2	1,6	73,7
Livramento	B	7	Argissolo Vermelho	<i>Lupinus bracteolaris</i>	B25.2	<i>B. yuanmingense</i>	13	5,1	4,7	204	0,2	5,5	5,9	2,2	1,6	73,7

Livramento	B	7	Argissolo Vermelho	<i>Trifolium polymorphum</i>	B26.1	<i>B. elkanii</i>	13	5,1	4,7	204	0,2	5,5	5,9	2,2	1,6	73,7
Livramento	B	8	Argissolo Vermelho	<i>Adesmia incana</i>	B31.2	<i>B. japonicum</i>	5	1,9	2,3	97	0,1	4,8	6,1	2,3	1,1	59,8
Livramento	B	8	Argissolo Vermelho	<i>Adesmia incana</i>	B31.3	<i>B. japonicum</i>	5	1,9	2,3	97	0,1	4,8	6,1	2,3	1,1	59,8
Livramento	B	9	Argissolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	B32.2	<i>B. yuanmingense</i>	5	1,9	2,3	97	0,1	4,8	6,1	2,3	1,1	59,8
Livramento	B	9	Argissolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	B34.2	<i>B. elkanii</i>	16	2,6	3,1	129	1	4,5	18,3	2,9	1,2	24,7
Livramento	B	9	Argissolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	B34.3	<i>B. elkanii</i>	16	2,6	3,1	129	1	4,5	18,3	2,9	1,2	24,7
Livramento	B	9	Argissolo Vermelho	<i>Trifolium polymorphum</i>	B33.3	<i>B. elkanii</i>	16	2,6	3,1	129	1	4,5	18,3	2,9	1,2	24,7
Livramento	B	9	Argissolo Vermelho	<i>Trifolium polymorphum</i>	B33.1	<i>R. trifolii</i>	16	2,6	3,1	129	1	4,5	18,3	2,9	1,2	24,7
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Adesmia incana</i>	B39.1	<i>B. elkanii</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Adesmia incana</i>	B39.3	<i>B. elkanii</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Adesmia securifolia</i>	B36.1	<i>B. elkanii</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	B38.2	<i>B. elkanii</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Desmodium incanum</i>	B38.3	<i>B. japonicum</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Latirus sp. 1</i>	B41.1	<i>B. elkanii</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Latirus sp. 1</i>	B41.2	<i>B. elkanii</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Latirus sp. 1</i>	B41.3	<i>B. elkanii</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Sesbania virgata</i>	B42.1	<i>R. sp.</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Sesbania virgata</i>	B42.2	<i>R. sp.</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Trifolium repens</i>	B35.2	<i>B. japonicum</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Vicea graminea</i>	B40.2	<i>R. leguminosarum</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Vicea graminea</i>	B40.3	<i>R. leguminosarum</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Livramento	B	10	Neossolo litólico	<i>Vicea graminea</i>	B40.4	<i>R. leguminosarum</i>	19	2,7	45,2	139	0	5,8	22,6	12,2	4,5	75,8
Dom Pedrito	B	11	Chernossolo Argilúvico	<i>Desmodium incanum</i>	B45.2	<i>B. japonicum</i>	18	2,2	36,2	324	0,5	5,1	34,8	27	5,4	95,6
Dom Pedrito	B	11	Chernossolo Argilúvico	<i>Vigna peduncularis</i>	B48.3	<i>B. brasiliense</i>	18	2,2	36,2	324	0,5	5,1	34,8	27	5,4	95,6
Bagé	B	12	Luvissolo	<i>Desmodium incanum</i>	B50.1	<i>B. japonicum</i>	13	1,9	77,3	81	0	5,4	3,5	10	6,7	83
Bagé	B	12	Luvissolo	<i>Desmodium incanum</i>	B50.2	<i>B. japonicum</i>	13	1,9	77,3	81	0	5,4	3,5	10	6,7	83
Bagé	B	12	Luvissolo	<i>Desmodium incanum</i>	B50.3	<i>B. japonicum</i>	13	1,9	77,3	81	0	5,4	3,5	10	6,7	83
Bagé	B	14	Vertissolo	<i>Adesmia sp.1</i>	B59.1	<i>A. caulinodans</i>	36	2,8	8	73	0	6,6	29,2	19,2	7,5	93,3
Bagé	B	14	Vertissolo	<i>Trifolium polymorphum</i>	B55.1	<i>B. japonicum</i>	36	2,8	8	73	0	6,6	29,2	19,2	7,5	93,3
Bagé	B	15	Vertissolo	<i>Adesmia sp.1</i>	B59.2	<i>A. caulinodans</i>	9	1,7	159,6	40	0	6,1	28	17,4	8,6	93,8

Bagé	B	15	Neossolo litólico	<i>Trifolium polymorphum</i>	B60.3	<i>B. japonicum</i>	9	1,7	159,6	40	0	6,1	28	17,4	8,6	93,8
Bagé	B	15	Neossolo litólico	<i>Trifolium polymorphum</i>	B62.1	<i>B. japonicum</i>	9	1,7	159,6	40	0	6,1	28	17,4	8,6	93,8
Monte Alegre dos Campos	C	2	Neossolo Litólico	<i>Adesmia tristis</i>	C5.1	<i>MezoR. sp.</i>	42	4,9	2,3	78	4,1	4,4	22,4	1,8	0,9	13,2
Monte Alegre dos Campos	C	2	Neossolo Litólico	<i>Adesmia tristis</i>	C5.2	<i>MezoR. sp.</i>	42	4,9	2,3	78	4,1	4,4	22,4	1,8	0,9	13,2
Monte Alegre dos Campos	C	2	Neossolo Litólico	<i>Adesmia tristis</i>	C5.3	<i>MezoR. sp.</i>	42	4,9	2,3	78	4,1	4,4	22,4	1,8	0,9	13,2
Monte Alegre dos Campos	C	2	Neossolo Litólico	<i>Desmodium incanum</i>	C6.1	<i>B. elkanii</i>	42	4,9	2,3	78	4,1	4,4	22,4	1,8	0,9	13,2
Monte Alegre dos Campos	C	2	Neossolo Litólico	<i>Desmodium incanum</i>	C6.2	<i>B. elkanii</i>	42	4,9	2,3	78	4,1	4,4	22,4	1,8	0,9	13,2
Monte Alegre dos Campos	C	2	Neossolo Litólico	<i>Lupinus sp.1</i>	C4.1	<i>B. yuanmingense</i>	42	4,9	2,3	78	4,1	4,4	22,4	1,8	0,9	13,2
Monte Alegre dos Campos	C	2	Neossolo Litólico	<i>Lupinus sp.1</i>	C4.2	<i>B. yuanmingense</i>	42	4,9	2,3	78	4,1	4,4	22,4	1,8	0,9	13,2
Monte Alegre dos Campos	C	2	Neossolo Litólico	<i>Lupinus sp.1</i>	C4.3	<i>B. yuanmingense</i>	42	4,9	2,3	78	4,1	4,4	22,4	1,8	0,9	13,2
Monte Alegre dos Campos	C	3	Neossolo Litólico	<i>Adesmia latifolia</i>	C9.1	<i>R. sp.</i>	56	4,9	1,5	46	4,3	4,1	24,5	1,6	1	11,2
Monte Alegre dos Campos	C	3	Neossolo Litólico	<i>Adesmia latifolia</i>	C9.2	<i>R. sp.</i>	56	4,9	1,5	46	4,3	4,1	24,5	1,6	1	11,2
Monte Alegre dos Campos	C	3	Neossolo Litólico	<i>Adesmia latifolia</i>	C9.3	<i>R. sp.</i>	56	4,9	1,5	46	4,3	4,1	24,5	1,6	1	11,2
Monte Alegre dos Campos	C	3	Neossolo Litólico	<i>Adesmia tristis</i>	C8.1	<i>B. elkanii</i>	56	4,9	1,5	46	4,3	4,1	24,5	1,6	1	11,2
Monte Alegre dos Campos	C	3	Neossolo Litólico	<i>Adesmia tristis</i>	C8.2	<i>B. elkanii</i>	56	4,9	1,5	46	4,3	4,1	24,5	1,6	1	11,2
Monte Alegre dos Campos	C	3	Neossolo Litólico	<i>Adesmia tristis</i>	C8.3	<i>B. elkanii</i>	56	4,9	1,5	46	4,3	4,1	24,5	1,6	1	11,2
Monte Alegre dos Campos	C	3	Neossolo Litólico	<i>Lupinus sp.1</i>	C10.1	<i>B. elkanii</i>	56	4,9	1,5	46	4,3	4,1	24,5	1,6	1	11,2
Monte Alegre dos Campos	C	3	Neossolo Litólico	<i>Lupinus sp.1</i>	C10.3	<i>B. elkanii</i>	56	4,9	1,5	46	4,3	4,1	24,5	1,6	1	11,2
Bom Jesus	C	5	Neossolo Litólico	<i>Adesmia tristis</i>	C12.1	<i>B. elkanii</i>	17	3	38,6	260	0,4	5	17,6	8	2,4	65,1
Bom Jesus	C	5	Neossolo Litólico	<i>Adesmia tristis</i>	C12.3	<i>B. elkanii</i>	17	3	38,6	260	0,4	5	17,6	8	2,4	65,1
Bom Jesus	C	5	Neossolo Litólico	<i>Adesmia tristis</i>	C12.4	<i>B. elkanii</i>	17	3	38,6	260	0,4	5	17,6	8	2,4	65,1
Bom Jesus	C	5	Neossolo Litólico	<i>Desmodium affine</i>	C13.1	<i>B. elkanii</i>	17	3	38,6	260	0,4	5	17,6	8	2,4	65,1
Bom Jesus	C	5	Neossolo Litólico	<i>Desmodium affine</i>	C13.2	<i>B. elkanii</i>	17	3	38,6	260	0,4	5	17,6	8	2,4	65,1
Bom Jesus	C	5	Neossolo Litólico	<i>Desmodium affine</i>	C13.3	<i>B. elkanii</i>	17	3	38,6	260	0,4	5	17,6	8	2,4	65,1
Bom Jesus	C	6	Neossolo Litólico	<i>Mimosa sp.1</i>	C16.2	<i>B. phymatum</i>	12	6,4	58,7	131	0,2	4,8	17,9	9,4	2,3	69,2
Bom Jesus	C	6	Neossolo Litólico	<i>Mimosa sp.1</i>	C16.3	<i>B. phymatum</i>	12	6,4	58,7	131	0,2	4,8	17,9	9,4	2,3	69,2
Bom Jesus	C	6	Neossolo Litólico	<i>Vicea sp.1</i>	C14.1	<i>R. leguminosarum</i>	12	6,4	58,7	131	0,2	4,8	17,9	9,4	2,3	69,2
Bom Jesus	C	6	Neossolo Litólico	<i>Vicea sp.1</i>	C14.2	<i>R. leguminosarum</i>	12	6,4	58,7	131	0,2	4,8	17,9	9,4	2,3	69,2
Bom Jesus	C	6	Neossolo Litólico	<i>Vicea sp.1</i>	C14.3	<i>R. leguminosarum</i>	12	6,4	58,7	131	0,2	4,8	17,9	9,4	2,3	69,2
Bom Jesus	C	6	Neossolo Litólico	<i>Vicea sp.2</i>	C15.1	<i>R. leguminosarum</i>	12	6,4	58,7	131	0,2	4,8	17,9	9,4	2,3	69,2

Bom Jesus	C	6	Neossolo Litólico	<i>Vicea</i> sp.2	C15.2	<i>R. leguminosarum</i>	12	6,4	58,7	131	0,2	4,8	17,9	9,4	2,3	69,2
Bom Jesus	C	6	Neossolo Litólico	<i>Vicea</i> sp.2	C15.3	<i>R. leguminosarum</i>	12	6,4	58,7	131	0,2	4,8	17,9	9,4	2,3	69,2
Jaquirana	C	7	Cambissolo Húmico	<i>Mimosa</i> sp.3	C18.1	<i>B. mimosarum</i>	47	0,7	9,7	24	7,5	4,6	35,4	0,6	0,3	2,8
Jaquirana	C	7	Cambissolo Húmico	<i>Mimosa</i> sp.3	C18.2	<i>B. mimosarum</i>	47	0,7	9,7	24	7,5	4,6	35,4	0,6	0,3	2,8
Jaquirana	C	7	Cambissolo Húmico	<i>Mimosa</i> sp.3	C18.3	<i>B. mimosarum</i>	47	0,7	9,7	24	7,5	4,6	35,4	0,6	0,3	2,8
Cambará	C	8	Neossolo Litólico	<i>Adesmia punctata</i>	C22.1	<i>B. elkanii</i>	18	4,9	10,5	53	5,4	3,9	20,4	0,7	0,1	4,8
Cambará	C	8	Neossolo Litólico	<i>Adesmia punctata</i>	C22.2	<i>B. elkanii</i>	18	4,9	10,5	53	5,4	3,9	20,4	0,7	0,1	4,8
Cambará	C	8	Neossolo Litólico	<i>Mimosa ramosissima</i>	C20.1	<i>B. phymatum</i>	18	4,9	10,5	53	5,4	3,9	20,4	0,7	0,1	4,8
Cambará	C	8	Neossolo Litólico	<i>Mimosa ramosissima</i>	C20.2	<i>B. phymatum</i>	18	4,9	10,5	53	5,4	3,9	20,4	0,7	0,1	4,8
Cambará	C	8	Neossolo Litólico	<i>Mimosa ramosissima</i>	C20.3	<i>B. phymatum</i>	18	4,9	10,5	53	5,4	3,9	20,4	0,7	0,1	4,8
Cambará	C	8	Neossolo Litólico	<i>Mimosa</i> sp.4	C21.1	<i>B. phymatum</i>	18	4,9	10,5	53	5,4	3,9	20,4	0,7	0,1	4,8
Cambará	C	8	Neossolo Litólico	<i>Mimosa</i> sp.4	C21.2	<i>B. phymatum</i>	18	4,9	10,5	53	5,4	3,9	20,4	0,7	0,1	4,8
Cambará	C	8	Neossolo Litólico	<i>Mimosa</i> sp.4	C21.3	<i>B. phymatum</i>	18	4,9	10,5	53	5,4	3,9	20,4	0,7	0,1	4,8
Cambará	C	9	Cambissolo	<i>Collaea stenophylla</i>	C26.1	<i>R. sp.</i>	19	4,6	1,5	63	3,5	4,4	22,7	2,3	0,8	14,7
Cambará	C	9	Cambissolo	<i>Collaea stenophylla</i>	C26.3	<i>R. sp.</i>	19	4,6	1,5	63	3,5	4,4	22,7	2,3	0,8	14,7
Cambará	C	9	Cambissolo	<i>Galactia marginalis</i>	C25.1	<i>R. sp.</i>	19	4,6	1,5	63	3,5	4,4	22,7	2,3	0,8	14,7
Cambará	C	9	Cambissolo	<i>Galactia marginalis</i>	C25.2	<i>R. sp.</i>	19	4,6	1,5	63	3,5	4,4	22,7	2,3	0,8	14,7
Cambará	C	9	Cambissolo	<i>Galactia marginalis</i>	C25.3	<i>R. sp.</i>	19	4,6	1,5	63	3,5	4,4	22,7	2,3	0,8	14,7
Cambará	C	9	Cambissolo	<i>Lupinus reitzii</i>	C24.1	<i>B. iriomotense</i>	19	4,6	1,5	63	3,5	4,4	22,7	2,3	0,8	14,7
Cambará	C	9	Cambissolo	<i>Lupinus reitzii</i>	C24.2	<i>B. iriomotense</i>	19	4,6	1,5	63	3,5	4,4	22,7	2,3	0,8	14,7
Cambará	C	9	Cambissolo	<i>Lupinus reitzii</i>	C24.3	<i>B. iriomotense</i>	19	4,6	1,5	63	3,5	4,4	22,7	2,3	0,8	14,7
Cambará	C	9	Cambissolo	<i>Trifolium riograndensis</i>	C23.1	<i>B. japonicum</i>	19	4,6	1,5	63	3,5	4,4	22,7	2,3	0,8	14,7
Cambará	C	9	Cambissolo	<i>Trifolium riograndensis</i>	C23.3	<i>B. japonicum</i>	19	4,6	1,5	63	3,5	4,4	22,7	2,3	0,8	14,7
Tainhas	C	10	Neossolo Litólico	<i>Crotalaria lanceolata</i>	C28.2	<i>R. sp.</i>	33	3,1	0,7	70	5,5	4,3	20	0,3	0,1	3,2
Tainhas	C	10	Neossolo Litólico	<i>Lupinus bracteolaris</i>	C27.1	<i>B. iriomotense</i>	33	3,1	0,7	70	5,5	4,3	20	0,3	0,1	3,2
Tainhas	C	10	Neossolo Litólico	<i>Lupinus bracteolaris</i>	C27.2	<i>B. iriomotense</i>	33	3,1	0,7	70	5,5	4,3	20	0,3	0,1	3,2
Aratinga	C	11	Neossolo Litólico	<i>Desmodium adscendens</i>	C31.1	<i>B. elkanii</i>	22	1,9	37,4	244	0	5,8	26	15,1	5,5	88,1
Aratinga	C	11	Neossolo Litólico	<i>Desmodium adscendens</i>	C31.2	<i>B. elkanii</i>	22	1,9	37,4	244	0	5,8	26	15,1	5,5	88,1
Aratinga	C	11	Neossolo Litólico	<i>Desmodium incanum</i>	C29.1	<i>B. liaoningense</i>	22	1,9	37,4	244	0	5,8	26	15,1	5,5	88,1
Aratinga	C	11	Neossolo Litólico	<i>Desmodium incanum</i>	C29.3	<i>B. liaoningense</i>	22	1,9	37,4	244	0	5,8	26	15,1	5,5	88,1

Aratinga	C	12	Neossolo Litólico	<i>Desmodium adscendens</i>	C33.1	<i>B. elkanii</i>	25	1,3	13,2	236	0	5,9	22,5	13,2	5,2	90,3
Aratinga	C	12	Neossolo Litólico	<i>Desmodium adscendens</i>	C33.2	<i>B. elkanii</i>	25	1,3	13,2	236	0	5,9	22,5	13,2	5,2	90,3
Aratinga	C	12	Neossolo Litólico	<i>Desmodium adscendens</i>	C33.3	<i>B. elkanii</i>	25	1,3	13,2	236	0	5,9	22,5	13,2	5,2	90,3
Aratinga	C	12	Neossolo Litólico	<i>Indigofera asperifolia</i>	C34.1	<i>R. sp.</i>	25	1,3	13,2	236	0	5,9	22,5	13,2	5,2	90,3
Aratinga	C	12	Neossolo Litólico	<i>Indigofera asperifolia</i>	C34.2	<i>R. sp.</i>	25	1,3	13,2	236	0	5,9	22,5	13,2	5,2	90,3
Aratinga	C	12	Neossolo Litólico	<i>Indigofera asperifolia</i>	C34.3	<i>R. sp.</i>	25	1,3	13,2	236	0	5,9	22,5	13,2	5,2	90,3
Aratinga	C	12	Neossolo Litólico	<i>Rhynchosya sp.2</i>	C32.1	<i>B. japonicum</i>	25	1,3	13,2	236	0	5,9	22,5	13,2	5,2	90,3
Aratinga	C	12	Neossolo Litólico	<i>Rhynchosya sp.3</i>	C32.3	<i>B. japonicum</i>	25	1,3	13,2	236	0	5,9	22,5	13,2	5,2	90,3
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Adesmia sp.1</i>	D8.1	<i>R. leguminosarum</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Adesmia sp.1</i>	D8.2	<i>R. leguminosarum</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Adesmia sp.1</i>	D8.3	<i>R. leguminosarum</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Aeschynomene falcata</i>	D3.1	<i>R. sp.</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Aeschynomene falcata</i>	D3.2	<i>R. sp.</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Aeschynomene falcata</i>	D3.3	<i>R. sp.</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Desmanthus irgatus</i>	D2.1	<i>R. sp.</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Desmanthus irgatus</i>	D2.2	<i>R. sp.</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Desmanthus irgatus</i>	D2.3	<i>R. sp.</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Desmodium incanum</i>	D12.1	<i>B. yuanmingense</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Desmodium incanum</i>	D12.2	<i>B. yuanmingense</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Eriosema tacuareamboense</i>	D4.1	<i>R. sp.</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Eriosema tacuareamboense</i>	D4.2	<i>R. sp.</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Poiretia tetraphylla</i>	D7.2	<i>B. phymatum</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Poiretia tetraphylla</i>	D7.3	<i>R. sp.</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Rhynchosia corylifolia</i>	D1.1	<i>R. leguminosarum</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Rhynchosia corylifolia</i>	D1.2	<i>R. leguminosarum</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Rhynchosia corylifolia</i>	D1.3	<i>R. leguminosarum</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Rhynchosia corylifolia</i>	D5.1	<i>B. japonicum</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Rhynchosia corylifolia</i>	D5.2	<i>B. japonicum</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Stylosanthes leiocarpa</i>	D9.1	<i>B. japonicum</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Stylosanthes montevidensis</i>	D10.2	<i>B. japonicum</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5

Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Vigna peduncularis</i>	D6.1	<i>B. brasilense</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Soledade	D	1	Cambissolo	<i>Vigna peduncularis</i>	D6.2	<i>B. brasilense</i>	48	4,4	3,1	97	1,5	5,3	18,4	3,2	2,7	33,5
Cruz Alta	D	2	Latossolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	D16.1	<i>B. japonicum</i>	35	2,2	3,9	42	1	4,7	12	2,1	1,1	27,7
Cruz Alta	D	2	Latossolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	D16.3	<i>B. japonicum</i>	35	2,2	3,9	42	1	4,7	12	2,1	1,1	27,7
Cruz Alta	D	2	Latossolo Vermelho	<i>Lupinus reitzii</i>	D15.1	<i>B. iriomotense</i>	35	2,2	3,9	42	1	4,7	12	2,1	1,1	27,7
Cruz Alta	D	2	Latossolo Vermelho	<i>Lupinus reitzii</i>	D15.2	<i>B. iriomotense</i>	35	2,2	3,9	42	1	4,7	12	2,1	1,1	27,7
Cruz Alta	D	2	Latossolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.3	D64.2	<i>B. liaoningense</i>	35	2,2	3,9	42	1	4,7	12	2,1	1,1	27,7
Cruz Alta	D	2	Latossolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.3	D64.3	<i>B. liaoningense</i>	35	2,2	3,9	42	1	4,7	12	2,1	1,1	27,7
Ijuí	D	3	Latossolo Vermelho	<i>Ateleia glazioviana</i>	D17.1	<i>R. sp.</i>	34	5,5	37,4	80	0	8,7	18,8	8,7	3,7	67,2
Ijuí	D	3	Latossolo Vermelho	<i>Ateleia glazioviana</i>	D17.2	<i>R. sp.</i>	34	5,5	37,4	80	0	8,7	18,8	8,7	3,7	67,2
São Miguel das Missões	D	4	Neossolo Litólico	<i>Chamaecrista nictitans</i>	D19.1	<i>R. lupini</i>	17	2,6	222	137	0	5,3	34,8	20,3	10,6	90
São Miguel das Missões	D	4	Neossolo Litólico	<i>Chamaecrista nictitans</i>	D19.2	<i>R. lupini</i>	17	2,6	222	137	0	5,3	34,8	20,3	10,6	90
São Miguel das Missões	D	4	Neossolo Litólico	<i>Desmodium adscendens</i>	D20.3	<i>B. elkanii</i>	17	2,6	222	137	0	5,3	34,8	20,3	10,6	90
São Miguel das Missões	D	4	Neossolo Litólico	<i>Desmodium incanum</i>	D21.2	<i>B. japonicum</i>	17	2,6	222	137	0	5,3	34,8	20,3	10,6	90
São Miguel das Missões	D	4	Neossolo Litólico	<i>Desmodium incanum</i>	D21.3	<i>B. japonicum</i>	17	2,6	222	137	0	5,3	34,8	20,3	10,6	90
São Miguel das Missões	D	4	Neossolo Litólico	<i>Rhynchosia corylifolia</i>	D18.1	<i>R. leguminosarum</i>	17	2,6	222	137	0	5,3	34,8	20,3	10,6	90
São Miguel das Missões	D	4	Neossolo Litólico	<i>Rhynchosia corylifolia</i>	D18.2	<i>R. leguminosarum</i>	17	2,6	222	137	0	5,3	34,8	20,3	10,6	90
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Adesmia</i> sp.2	D29.2	<i>R. leguminosarum</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Adesmia</i> sp.2	D29.3	<i>R. leguminosarum</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Aeschynomene falcata</i>	D27.1	<i>R. sp.</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Aeschynomene falcata</i>	D27.2	<i>R. sp.</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Aeschynomene</i> sp.1	D28.1	<i>R. sp.</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Aeschynomene</i> sp.1	D28.2	<i>R. sp.</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Chamaecrista nictitans</i>	D25.1	<i>R. leguminosarum</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Chamaecrista nictitans</i>	D25.2	<i>R. leguminosarum</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Desmodium adscendens</i>	D26.1	<i>B. elkanii</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Desmodium incanum</i>	D23.2	<i>B. japonicum</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Desmodium incanum</i>	D23.3	<i>B. japonicum</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Indigofera suffruticosa</i>	D22.1	<i>R. indigofera</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2
Santo Antônio das Missões	D	5	Neossolo Litólico	<i>Macroptilium heterophyllum</i>	D24.2	<i>B. japonicum</i>	28	2,6	33,8	170	0	5,2	18,3	9	4,5	76,2

Itaroquém	D	6	Neossolo Litólico	<i>Arachis</i> sp.1	D30.1	<i>B. elkanii</i>	37	1,8	4,7	33	0	5,3	16,8	7	4,8	70,9
Itaroquém	D	6	Neossolo Litólico	<i>Arachis</i> sp.2	D30.2	<i>B. elkanii</i>	37	1,8	4,7	33	0	5,3	16,8	7	4,8	70,9
Itaroquém	D	6	Neossolo Litólico	<i>Arachis</i> sp.2	D30.3	<i>B. elkanii</i>	37	1,8	4,7	33	0	5,3	16,8	7	4,8	70,9
Itaroquém	D	6	Neossolo Litólico	<i>Senna</i> sp.1	D31.2	<i>B. japonicum</i>	37	1,8	4,7	33	0	5,3	16,8	7	4,8	70,9
Itaroquém	D	6	Neossolo Litólico	<i>Senna</i> sp.1	D31.3	<i>B. japonicum</i>	37	1,8	4,7	33	0	5,3	16,8	7	4,8	70,9
Itaroquém	D	6	Neossolo Litólico	<i>Senna</i> sp.2	D33.2	<i>B. japonicum</i>	37	1,8	4,7	33	0	5,3	16,8	7	4,8	70,9
Itaroquém	D	6	Neossolo Litólico	<i>Senna</i> sp.2	D33.3	<i>B. japonicum</i>	37	1,8	4,7	33	0	5,3	16,8	7	4,8	70,9
São Borja	D	7	Nitossolo	<i>Aeschynomene falcata</i>	D34.1	<i>R. sp.</i>	28	2	11,4	96	0,1	5,3	13,4	6,3	3,4	74,2
São Borja	D	7	Nitossolo	<i>Aeschynomene falcata</i>	D34.2	<i>R. sp.</i>	28	2	11,4	96	0,1	5,3	13,4	6,3	3,4	74,2
São Borja	D	7	Nitossolo	<i>Aeschynomene falcata</i>	D34.3	<i>R. sp.</i>	28	2	11,4	96	0,1	5,3	13,4	6,3	3,4	74,2
São Borja	D	7	Nitossolo	<i>Chamaecrista nictitans</i>	D35.1	<i>R. leguminosarum</i>	28	2	11,4	96	0,1	5,3	13,4	6,3	3,4	74,2
São Borja	D	7	Nitossolo	<i>Chamaecrista nictitans</i>	D35.2	<i>R. leguminosarum</i>	28	2	11,4	96	0,1	5,3	13,4	6,3	3,4	74,2
Uruguaina	D	9	Gleissolo	<i>Aeschynomene rudis</i>	D39.1	<i>R. sp.</i>	27	0,8	1,5	16	0,4	5,9	4,6	4,6	1,5	69,8
Uruguaina	D	9	Gleissolo	<i>Aeschynomene rudis</i>	D39.3	<i>R. sp.</i>	27	0,8	1,5	16	0,4	5,9	4,6	4,6	1,5	69,8
Uruguaina	D	9	Gleissolo	<i>Desmodium adscendens</i>	D40.2	<i>B. elkanii</i>	27	0,8	1,5	16	0,4	5,9	4,6	4,6	1,5	69,8
Uruguaina	D	9	Gleissolo	<i>Desmodium adscendens</i>	D40.3	<i>B. elkanii</i>	27	0,8	1,5	16	0,4	5,9	4,6	4,6	1,5	69,8
Uruguaina	D	10	Neossolo Litólico	<i>Chamaecrista rotundifolia</i>	D41.1	<i>R. sp.</i>	32	3,5	7,1	123	0	5,9	33,9	24,2	7,2	94,9
Uruguaina	D	10	Neossolo Litólico	<i>Chamaecrista rotundifolia</i>	D41.2	<i>R. sp.</i>	32	3,5	7,1	123	0	5,9	33,9	24,2	7,2	94,9
Uruguaina	D	10	Neossolo Litólico	<i>Chamaecrista rotundifolia</i>	D41.3	<i>R. sp.</i>	32	3,5	7,1	123	0	5,9	33,9	24,2	7,2	94,9
Uruguaina	D	10	Neossolo Litólico	<i>Macroptilium heterophyllum</i>	D42.1	<i>B. japonicum</i>	32	3,5	7,1	123	0	5,9	33,9	24,2	7,2	94,9
Uruguaina	D	10	Neossolo Litólico	<i>Macroptilium heterophyllum</i>	D42.2	<i>B. japonicum</i>	32	3,5	7,1	123	0	5,9	33,9	24,2	7,2	94,9
Uruguaina	D	10	Neossolo Litólico	<i>Mimosa</i> sp.3	D44.1	<i>B. mimosarum</i>	32	3,5	7,1	123	0	5,9	33,9	24,2	7,2	94,9
Uruguaina	D	10	Neossolo Litólico	<i>Mimosa</i> sp.3	D44.2	<i>B. mimosarum</i>	32	3,5	7,1	123	0	5,9	33,9	24,2	7,2	94,9
Uruguaina	D	10	Neossolo Litólico	<i>Mimosa</i> sp.3	D44.3	<i>B. mimosarum</i>	32	3,5	7,1	123	0	5,9	33,9	24,2	7,2	94,9
Alegrete	D	11	Neossolo Litólico	<i>Aeschynomene sensitiva</i>	D45.2	<i>R. sp.</i>	20	5,1	3,1	106	0	5,3	24,6	12,5	7,3	82,2
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Aeschynomene</i> sp.2	D46.1	<i>R. sp.</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Aeschynomene</i> sp.2	D46.2	<i>R. sp.</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Desmodium incanum</i>	D48.3	<i>B. japonicum</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Stylosanthes montevidensis</i>	D49.1	<i>B. stylosanthis</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Stylosanthes</i>	D49.3	<i>B. stylosanthis</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8



<i>montevidensis</i>																
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Stylosanthes</i> sp.1	D50.1	<i>B. japonicum</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Stylosanthes</i> sp.1	D50.2	<i>B. japonicum</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Stylosanthes</i> sp.1	D50.3	<i>B. japonicum</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.1	D52.1	<i>B. liaoningense</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.1	D52.3	<i>B. liaoningense</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.2	D53.1	<i>B. japonicum</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8
Manoel Viana	D	12	Latossolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.2	D53.3	<i>B. japonicum</i>	7	1,3	1,5	36	0,5	4,9	3	0,5	0,2	26,8
Manoel Viana	D	13	Latossolo Vermelho	<i>Aeschynomene falcata</i>	D54.2	<i>R. sp.</i>	17	1,4	1,5	72	0,4	4,8	4,3	0,8	0,6	36,6
Manoel Viana	D	13	Latossolo Vermelho	<i>Stylosanthes montevidensis</i>	D55.1	<i>B. stylosanthis</i>	17	1,4	1,5	72	0,4	4,8	4,3	0,8	0,6	36,6
São Francisco de Assis	D	14	Latossolo Vermelho	<i>Aeschynomene falcata</i>	D56.1	<i>R. sp.</i>	8	1	3,1	27	0,4	4,5	2,3	0,2	0,1	16,2
São Francisco de Assis	D	14	Latossolo Vermelho	<i>Aeschynomene falcata</i>	D56.2	<i>R. sp.</i>	8	1	3,1	27	0,4	4,5	2,3	0,2	0,1	16,2
São Francisco de Assis	D	14	Latossolo Vermelho	<i>Aeschynomene falcata</i>	D56.3	<i>R. sp.</i>	8	1	3,1	27	0,4	4,5	2,3	0,2	0,1	16,2
São Francisco de Assis	D	14	Latossolo Vermelho	<i>Aeschynomene</i> sp.1	D57.1	<i>R. sp.</i>	8	1	3,1	27	0,4	4,5	2,3	0,2	0,1	16,2
São Francisco de Assis	D	14	Latossolo Vermelho	<i>Aeschynomene</i> sp.1	D57.2	<i>R. sp.</i>	8	1	3,1	27	0,4	4,5	2,3	0,2	0,1	16,2
São Francisco de Assis	D	14	Latossolo Vermelho	<i>Chamaecrista nictitans</i>	D59.3	<i>R. lupini</i>	8	1	3,1	27	0,4	4,5	2,3	0,2	0,1	16,2
São Francisco de Assis	D	14	Latossolo Vermelho	<i>Chamaecrista rotundifolia</i>	D58.1	<i>R. sp.</i>	8	1	3,1	27	0,4	4,5	2,3	0,2	0,1	16,2
São Francisco de Assis	D	14	Latossolo Vermelho	<i>Chamaecrista rotundifolia</i>	D58.2	<i>R. sp.</i>	8	1	3,1	27	0,4	4,5	2,3	0,2	0,1	16,2
São Francisco de Assis	D	14	Latossolo Vermelho	<i>Desmodium cuneatum</i>	D59.2	<i>B. liaoningense</i>	8	1	3,1	27	0,4	4,5	2,3	0,2	0,1	16,2
São Francisco de Assis	D	15	Latossolo Vermelho	<i>Chamaecrista nictitans</i>	D59.4	<i>R. lupini</i>	10	0,7	4,7	15	0	5,8	4,4	1,6	1,2	68,4
São Francisco de Assis	D	15	Latossolo Vermelho	<i>Stylosanthes leiocarpa</i>	D60.3	<i>B. japonicum</i>	10	0,7	4,7	15	0	5,8	4,4	1,6	1,2	68,4
São Francisco de Assis	D	15	Latossolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.1	D61.1	<i>B. japonicum</i>	10	0,7	4,7	15	0	5,8	4,4	1,6	1,2	68,4
São Francisco de Assis	D	15	Latossolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.1	D61.2	<i>B. japonicum</i>	10	0,7	4,7	15	0	5,8	4,4	1,6	1,2	68,4
São Francisco de Assis	D	15	Latossolo Vermelho	<i>Zornia</i> sp.2	D62.2	<i>B. japonicum</i>	10	0,7	4,7	15	0	5,8	4,4	1,6	1,2	68,4
São Gabriel	D	16	Argissolo	<i>Aeschynomene falcata</i>	D63.1	<i>R. sp.</i>	6	1,5	91,1	16	0,3	4,2	3,8	0,9	0,1	27,8
São Gabriel	D	16	Argissolo	<i>Aeschynomene falcata</i>	D63.2	<i>R. sp.</i>	6	1,5	91,1	16	0,3	4,2	3,8	0,9	0,1	27,8
São Gabriel	D	16	Argissolo	<i>Crotalaria hilariana</i>	D64.1	<i>R. sp.</i>	6	1,5	91,1	16	0,3	4,2	3,8	0,9	0,1	27,8
São Gabriel	D	16	Argissolo	<i>Crotalaria hilariana</i>	D64.2	<i>R. sp.</i>	6	1,5	91,1	16	0,3	4,2	3,8	0,9	0,1	27,8
São Gabriel	D	16	Argissolo	<i>Crotalaria hilariana</i>	D64.3	<i>R. sp.</i>	6	1,5	91,1	16	0,3	4,2	3,8	0,9	0,1	27,8
São Gabriel	D	16	Argissolo	<i>Desmodium uncinatum</i>	D65.2	<i>B. viridifuturi</i>	6	1,5	91,1	16	0,3	4,2	3,8	0,9	0,1	27,8

São Gabriel	D	16	Argissolo	<i>Desmodium uncinatum</i>	D65.3	<i>B. viridifuturi</i>	6	1,5	91,1	16	0,3	4,2	3,8	0,9	0,1	27,8
São Gabriel	D	16	Argissolo	<i>Lupinus sp.1</i>	D66.1	<i>B. elkanii</i>	6	1,5	91,1	16	0,3	4,2	3,8	0,9	0,1	27,8
São Gabriel	D	16	Argissolo	<i>Macroptilium gibbosifolium</i>	D67.1	<i>R. melilot</i>	6	1,5	91,1	16	0,3	4,2	3,8	0,9	0,1	27,8
São Gabriel	D	16	Argissolo	<i>Macroptilium gibbosifolium</i>	D67.2	<i>R. melilot</i>	6	1,5	91,1	16	0,3	4,2	3,8	0,9	0,1	27,8
São Gabriel	D	16	Argissolo	<i>Stylosanthes leiocarpa</i>	D68.3	<i>B. japonicum</i>	6	1,5	91,1	16	0,3	4,2	3,8	0,9	0,1	27,8

\*Sequências dos genes recA, dnaK ou atpD comparadas ao banco de dados GeneBank (identidade maior que 85%).

<sup>1</sup>B. = *rhizobium*

<sup>2</sup>A. = *Azorhizobium*

<sup>3</sup>B. *phymatum* = *Burkholderia phymatum*

<sup>4</sup>R. = *Rizobium*

<sup>5</sup>B. *mimosarum* = *Burkholderia mimosarum*