



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

JAIRO DE OLIVEIRA TENORIO

DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS A *Clitoria fairchildiana* R. A. HOWARD

Dr. SERGIO MIANA DE FARIA
Orientador

SEROPÉDICA, RJ
NOVEMBRO – 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

JAIRO DE OLIVEIRA TENORIO

DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS A *Clitoria fairchildiana* R. A. HOWARD

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Dr. SERGIO MIANA DE FARIA
Orientador

SEROPÉDICA, RJ
NOVEMBRO – 2014

DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS A *Clitoria fairchildiana* R. A. HOWARD

JAIRO DE OLIVEIRA TENORIO

Monografia aprovada em 18 de novembro de 2014.

Comissão Examinadora:

Dr. Sergio Miana de Faria
Embrapa Agrobiologia
Orientador

Prof. Dr^a Irene da Silva Coelho
UFRRJ/IV/DMIV
Membro

MsC. Joel Quintino de Oliveira Júnior
UFRRJ/PPGCAF
Membro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus
e a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por te me permitido força e sabedoria para continuar sempre em busca do conhecimento, além de toda proteção.

Aos meus pais que sempre entenderam todas as fases que passei ao longo da graduação, por estarem ao meu lado quando mais precisei e principalmente por terem me dado todo suporte para que eu alcançasse meus objetivos.

A Mariucha Andrade Sobrinho, minha noiva, pelo total entendimento, torcida e apoio constante.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por ter sido um divisor de águas na minha vida, além de me proporcionar um ensino público de qualidade.

A Embrapa Agrobiologia que me permitiu ver a ciência com outros olhos.

Ao meu orientador Sergio Miana de Faria pelo apoio e todo suporte dado ao longo da minha formação.

Ao meu co-orientador, Ederson da Conceição Jesus, por me ajudar em momentos difíceis, por me mostrar que ciência vai muito além da pesquisa.

A Professora Irene da Silva Coelho que foi minha professora ao longo da graduação, e aceitou prontamente o convite para participar da banca examinadora deste trabalho.

Aos grandes amigos que construí na UFRRJ, sem eles meu caminho seria muito mais difícil, Eduardo Nunes, Marcelo Vinícius, Evelin Gianini, Carlos Eduardo (“Cadu”) e muitos outros.

A todos meus amigos de Muriqui, pelos anos de amizades e por estarem sempre comigo, Mauricio Hallais, Michel Medeiros, Claudio Donato, Juliana Mello, Thamirys Gomes, Bruna Nascimento, Julio Evangelista, e todos os outros.

Aos meus eternos amigos da UEZO pela força inicial que deram quando ingressei na UFRRJ, Laidson Paes, Caroline Ramos, Jessica Leite, Almir, Alberto, Letícia Cruz, Aline Cascaes, Rosane Trindade, Thaís e todos os outros.

Aos amigos da Embrapa Agrobiologia pela ajuda e apoio ao longo da minha jornada de crescimento científico, e por aturarem meu mau humor matinal sempre, Joel, Nathalia Fortuna, Maura, Isabelly, Camila Feder, Michele e Rafael.

RESUMO

O sombreiro (*Clitoria fairchildiana*) é uma leguminosa florestal nativa do Norte do Brasil, porém observado em outras regiões brasileiras devido ao seu uso extensivo na arborização urbana e recuperação de áreas degradadas. Esta espécie estabelece simbiose com rizóbios, que podem ter tido papel crítico na sua introdução bem-sucedida em outras regiões. Isto torna o sombreiro modelo em potencial para se compreender como a interação com microrganismos simbiotes afeta a adaptação de espécies vegetais a novos habitats. Destaca-se a possibilidade de que o simbiote fixador de N₂ tenha sido introduzido e/ou que o sombreiro esteja nodulando com rizóbios nativos da mata atlântica, caracterizando-o como uma leguminosa promíscua. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar rizóbios associados ao sombreiro do Norte e Sudeste do país de modo a estudar a diversidade destes microrganismos e sua relação com a planta hospedeira. Os nódulos coletados foram desinfestados superficialmente com H₂O₂ e utilizados para o isolamento de rizóbios em meio de cultivo YMA (79), com azul de bromotimol e pH 6,8 – 7,0, a 28°C. Após a purificação dos isolados (91), estes foram caracterizados morfológicamente. Além de testes de autenticação em siratro (*Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb) e avaliação da expressão do gene *nodC*. Os isolados das duas regiões apresentaram características distintas entre si. A maior parte dos isolados do Sudeste são de crescimento rápido a intermediário, alcalinizando o meio de cultivo, com colônias circulares, com diâmetros variáveis, a maioria apresentando borda inteira, superfície lisa e escassa a pouca produção de muco. A maioria destes isolados apresentou colônias opacas, com coloração variando entre branca, creme e amarela. Já os isolados do Norte do país são, em sua maioria, de crescimento rápido a lento, alterando o meio para ácido, alcalino ou neutro, com colônias circulares e irregulares, com diâmetro variáveis, bordas inteiras, superfície lisa, e muco variando de escasso a abundante. As colônias são opacas ou translúcidas, e com coloração variando entre incolor, branca, creme e amarela. Posteriormente, dos isolados testados, 39 apresentaram nodulação positiva, bem como presença do gene *nodC* em seu genoma, embora em outros isolados que não tenham apresentado nodulação positiva tenha se detectado a o gene *nodC*, estes resultados serão complementados com a identificação molecular dos isolados. Os resultados obtidos até o momento indicam que há variação quanto às espécies de rizóbios isolados do Norte e do Sudeste, o que torna o sombreiro capaz de se associar a uma alta diversidade de rizóbios.

Palavras chave: *Clitoria fairchildiana*, sombreiro, rizóbio, nodulação, *nodC*

ABSTRACT

The “sombreiro” (*Clitoria fairchildiana*) is a woody legume native species from Northern Brazil, but which is also found in other regions of the country due to its intensive use for shade in urban areas and for the reclamation of degraded areas. This species is able to get into symbiosis with rhizobia, which might have had a critical role in its successful introduction in other regions. That makes the “sombreiro” a potential model to help us understand how the interaction between the host plant and its symbiont can influence the adaptation of the host to new habitats. There are two possibilities: the symbiont might have been introduced with the “sombreiro”, or the plant might be nodulating with rhizobia native from the soil where it was introduced. Thus, the goal of this study was to compare rhizobia nodulating “sombreiro” from the North and Southeast of Brazil and study their diversity and relationship with the host plant. The nodules were treated with H₂O₂ and used to the isolation of rhizobia in YMA (79) medium, with bromotimol blue and pH 6,8 – 7,0, at 28°C. The morphology of the colonies of all isolates was evaluated. These isolates were tested for nodulation ability in siratro (*Macroptilium atropurpureum*) and were screened for the presence of the gene *nodC*. Isolates from the two regions present distinct characteristics. Most of the isolates from the Southeast are fast to intermediate growers, increasing the pH of the culture media, with circular colonies, with variable diameter, smooth surface and weak mucus production. The majority have opaque colonies and white, cream and yellow colors. On the other hand, isolated from the North are, mostly, fast or slow growers, with different pH changes, circular and irregular colonies, with variable diameter, smooth surface and mucus production varying from low to copious. Colonies are opaque or translucent, and transparent or with white, cream, yellow colors. Thirty-nine isolates were able to induce nodulation in siratro and presented the gene *nodC* in their genomes, but some isolates that were negative for nodulation were positive for the presence of the gene. The results indicate that rhizobia nodulating “sombreiro” in the North are distinct from those nodulation the plant in the Southeast, showing that this species is able to nodulate with a high diversity of rhizobia.

Keywords: *Clitoria fairchildiana*, sombreiro, rhizobia, nodulation, *nodC*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1 Diversidade Microbiana do Solo.....	2
2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	3
2.3 Simbiose e Ecologia Vegetal.....	3
2.4 Taxonomia de Rizóbios.....	4
2.5 <i>Clitoria fairchildiana</i> e a diversidade de rizóbios.....	5
3. OBJETIVOS	5
3.1 Objetivos Gerais.....	5
3.2 Objetivos Específicos.....	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	5
4.1 Coleta de nódulos no campo, desinfestação superficial e isolamento.....	5
4.2 Caracterização morfológica.....	6
4.3 Análise de agrupamento.....	6
4.4 Autenticação em casa de vegetação.....	6
4.5 Extração do DNA e avaliação da expressão do gene <i>nodC</i>	8
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	8
5.1 Isolamento e purificação.....	8
5.2 Caracterização morfológica.....	8
5.3 Análise de agrupamento.....	11
5.4 Autenticação, extração do DNA e avaliação da presença do gene <i>nodC</i>	12

6. CONCLUSÃO.....	13
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Etapas do processo de isolamento de rizóbios a partir dos nódulos de <i>Clitoria fairchildiana</i>	7
Figura 2:	Garrafa do tipo long neck com solução nutritiva de Norris modificada, e plântula em desenvolvimento.....	8
Figura 3:	Número de isolados de rizóbios de sombreiro de diferentes tipos de crescimento.....	10
Figura 4:	Proporção de isolados provenientes das três regiões amostradas, salientando o pH.....	10
Figura 5:	Diagrama representativo com base no grupamento dos isolados de acordo com suas características culturas em meio 79 (FRED & WAKSMAN, 1928) e sua proporção dentro dos dois principais grupos formados no dendrograma de acordo com a região geográfica amostrada.....	11
Figura 6:	Géis de agarose evidenciando os resultados positivos para o gene <i>nodC</i>	13

1. INTRODUÇÃO

Entre os ecossistemas terrestres, o solo apresenta a maior diversidade de organismos, micro, macro e mesofauna, devido a sua natureza dinâmica, heterogênea e complexa (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Os microrganismos contribuem nos distintos processos como na manutenção adequada dos ciclos naturais dos nutrientes, entre outros, variando sua diversidade em cada ecossistema. A fotossíntese e a fixação biológica de nitrogênio são processos biológicos principais, que geram simultaneamente energia e matéria orgânica, dos quais várias formas de vida são dependentes. Seja em um organismo simples ou dentro de uma associação simbiótica, representando sistemas biológicos eficientes (FAY, 1981).

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N₂) é uma etapa crucial do ciclo do nitrogênio. De acordo com estimativas recentes, este processo é responsável pela entrada de 145 Tg de N em ecossistemas terrestres a cada ano (GRUBER & GALLOWAY, 2008). A nitrogenase, enzima responsável por este processo, está presente em um número limitado de espécies de microrganismos, dentre os quais estão aqueles conhecidos genericamente como rizóbios, que formam nódulos nas raízes das leguminosas (Fabaceae), e que são considerados os principais fixadores de N₂ em ambientes terrestres (CLEVELAND et al., 1999; SPRENT, 2009).

Ecologicamente, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) pelas leguminosas é um processo de adaptação a uma situação de desbalanço de nitrogênio. A simbiose que se estabelece entre rizóbios e espécies de leguminosas é o mais eficiente de todos os processos biológicos fixadores de nitrogênio (KAHINDI et al., 1997). Nas últimas décadas estudos tem se intensificado, sobretudo em relação aos microrganismos simbiotes, tais como as bactérias fixadoras de nitrogênio (SOUZA et al., 2006).

Até recentemente era geralmente aceito que as leguminosas eram noduladas exclusivamente por membros das alfa-proteobactérias, pertencentes a gêneros das famílias Rhizobiaceae e Bradyrhizobiaceae, incluindo, dentre eles, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (YOUNG, 1996; van BERKUM & EARDLY, 2002). Nos últimos anos, mostrou-se que outras alfa-proteobactérias são capazes de induzir a formação de nódulos em leguminosas (MOULIN et al., 2002), incluindo estirpes de *Methylobacterium* (SY et al., 2001); *Blastobacter* (van BERKUM & EARDLY, 2002), *Devosia* (RIVAS et al., 2002), *Shinella* (LIN et al., 2008), *Ochrobactrum* (ZURDO-PIÑEIRO et al., 2007) e *Microvirga* (ARDLEY et al., 2011). Devido a importância ecológica e econômica dos rizóbios, a diversidade dessas bactérias tem sido investigada extensivamente e a taxonomia rizobiana vem sofrendo mudanças significativas nas últimas três décadas (LIU et al., 2005).

Devido sua extensão e posicionamento geográfico o Brasil disponibiliza uma infinidade de eventos geoclimáticos únicos no mundo devido a grande quantidade de biomas e ecossistemas, o que incluem dois “hotspots”. Como exemplo, tem-se as savanas como Cerrados, adjacentes à floresta seca como a Caatinga, Mata Atlântica e Amazônia. Em todos os biomas há ocorrência de espécies de leguminosas, comumente sendo as dominantes, o que torna o Brasil um lugar de referência para estudos de diversidade levando-se em conta a habilidade de aquisição da nodulação quanto a ampla ocorrência de leguminosas.

Considerando-se a região de endemismo do sombreiro (*Clitoria fairchildiana* R. A. Howard), esta espécie é característica de formações secundárias da floresta pluvial

amazônica, mas foi amplamente utilizada para arborização e como planta ornamental no Sudeste do Brasil devido à sua rusticidade e crescimento rápido (LORENZI, 1992). Quando se refere à diversidade de interações entre rizóbios e espécies leguminosas introduzidas a novos habitats ou cultivadas, a diversidade de rizóbios pode variar dependendo de diversos fatores. Deste modo, o presente trabalho tem por objetivo comparar rizóbios isolados de sombreiro da região norte e sudeste do país de modo a avaliar a diversidade rizobiana no referido hospedeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Diversidade Microbiana no Solo

A diversidade de microrganismos do solo é tão ampla quanto desconhecida. Um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos, o que representa numa totalidade, milhares de espécies. Porém, até o presente momento, poucas foram descobertas, talvez, menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas, de acordo com o habitat de estudo (ROSSELÓ-MORA & AMMAN, 2001).

Segundo Sharma *et al.*, (1998), a maioria das pesquisas são voltadas para a diversidade de macrorganismos com pouca atenção para os microrganismos. Segundo esses autores, a principal causa limitadora das pesquisas nesta área é a limitação de metodologias existentes, que não permitem um estudo mais aprofundado e amplo, como: procedimentos de cultivo e isolamento que usam apenas uma pequena amostra do ambiente, problemas de identificação das diferentes populações e número elevado de indivíduos por amostra são os problemas mais frequentemente encontrados para quantificar a diversidade microbiana.

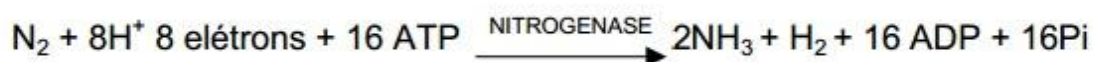
Os estudos da diversidade dos microrganismos ocorre, principalmente, através do conhecimento das características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, fiogenéticas e genéticas, que são aplicadas de forma conjunta ou individual nos trabalhos sobre rizóbios (ORMENÓ-ORRILLO *et al.*, 2006; ZRIBI *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2002; ANYANGO *et al.*, 1995; SOARES *et al.*, 2006; STROSCHEIN, 2007).

A avaliação da diversidade através das características culturais e morfológicas normalmente é o primeiro passo para a identificação de grupos taxonômicos de microrganismos. Estes descritores podem indicar diferenças fisiológicas importantes entre microrganismos, que podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais refinados (PELCZAR *et al.*, 1997).

Atualmente várias técnicas são utilizadas para identificar estirpes de rizóbios, o que constitui a taxonomia polifásica, e esta tem se caracterizado por manter o uso dos métodos fenotípicos clássicos, pois vale ressaltar que os mesmos nunca entrarão em desuso ou se tornarão obsoletos. A diversidade genética dos microrganismos nunca poderá ser avaliada apenas por um único critério, mesmo que se utilize de técnicas de genética molecular (BÉCQUER, 2004). A diversidade de rizóbios nativos é de suma importância, sendo uma fonte de recursos genéticos para seleções de isolados adaptados às diversas condições (MEDEIROS *et al.*, 2009).

2.2 – Fixação Biológica de Nitrogênio

A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) é o processo pelo qual o nitrogênio atmosférico (N₂), indisponível, para a maioria dos organismos, se torna fisiológica e metabolicamente disponível sob a forma de amônia (NH₃). Apenas um pequeno número de microrganismos na natureza, denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, é capaz de reduzir N₂ a NH₃, através do complexo enzimático da nitrogenase, descrito na equação abaixo (Figura 1).



As classes de organismos fixadores de nitrogênio mais importantes são as bactérias de vida livre e as simbióticas (RAVEN, *et al.* 2001). As bactérias simbióticas são as mais importantes em termos da quantidade total de nitrogênio fixado. Estas associações podem ser importantes em sistemas de agricultura sustentável (BALDANI, 1996) e em sistemas perturbados que se encontram em estádios de reabilitação e/ou recuperação, uma vez que o nitrogênio é escasso nesses ecossistemas (SILVA, 1994).

A fixação de N₂ é dependente da espécie hospedeira e do rizóbio, no entanto pode ser limitada por fatores como o pH do solo, toxidez de alumínio, manganês, deficiência de cálcio, fósforo, molibdênio etc., estresse hídrico ou temperaturas elevadas (SIQUEIRA & FRANCO 1988; BORDELEAU & PRÉVOST, 1994, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Existem muitas famílias botânicas na natureza, porém poucas são as famílias capazes de estabelecer simbiose com as bactérias do grupo dos rizóbios, como a família Fabaceae. Esta é uma das maiores famílias botânicas, com aproximadamente 20.000 espécies (SPRENT, 2001), e essas são, em sua maior parte, árvores tropicais (DÖBEREINER, 1984).

A presença das leguminosas em diferentes ecossistemas com baixa disponibilidade de N é atribuída, em grande parte, pela sua capacidade de fixar N em simbiose com rizóbios (GRAHAM & VANCE, 2003; SPRENT, 1994). Dentre as simbioses de fixadores de N₂ com plantas, a que se estabelece com leguminosas se destaca por sua importância econômica, que está relacionada não só à ampla distribuição geográfica e utilização do hospedeiro, como também à maior eficiência do processo decorrente de uma parceria entre vegetal e microrganismos mais evoluída (Moreira & Siqueira, 2002).

2.3 – Simbiose e Ecologia Vegetal

Simbioses mutualísticas, como a simbiose rizóbio-leguminosas, tem um papel crítico na introdução bem-sucedida de uma espécie vegetal em um novo ambiente. A falta de um simbiote compatível, especialmente quando a simbiose é altamente específica, pode ser uma barreira importante para a adaptação da espécie, conforme já relatado para *Pinus* spp., que depende de um simbiote ectomicorrízico (RICHARDSON *et al.*, 2000). Uma relevância prática disso é que a simbiose pode ser um mecanismo crucial para definir se uma espécie é ou não invasora. Visto que a relação entre uma espécie de leguminosa e o seu simbiote não é uma relação hereditária (PARKER, 2001), é possível que a sua adaptação se dê em função da transferência conjunta do simbiote ou que essas leguminosas sejam promíscuas, tendo a

capacidade de nodular com estirpes presentes na área onde foram introduzidas (RICHARDSON *et al.*, 2000).

Embora se considere que a falta de nodulação após a introdução de uma leguminosa em um novo ambiente seja uma exceção no caso de leguminosas arbóreas, estudos recentes indicam que esse pode ser o caso de algumas espécies relacionadas a beta-rizóbios. Existem evidências de que a simbiose de leguminosas do gênero *Mimosa* com bactérias fixadoras de N₂ ocorra preferencialmente com beta-rizóbios do gênero *Burkholderia* (BONTEMPS *et al.*, 2010) e foram apresentadas evidências de que a co-introdução do simbiote foi importante para a adaptação de espécies de mimosas nativas da América do Sul em vários países (CHEN *et al.*, 2005; BONTEMPS *et al.*, 2010). Como exemplo pode-se citar *M. pigra*, que é uma leguminosa invasora em Taiwan e que provavelmente teve seu sucesso na adaptação aos solos de Taiwan devido ao transporte de seus simbioses. Os autores chegaram a essa conclusão através da comparação entre rizóbios de Taiwan e rizóbios isolados da América do Sul, de onde *M. pigra* é nativa. Observou-se que havia uma relação filogenética entre esses rizóbios, trazendo evidências de que estes foram introduzidos em Taiwan.

2.4 – Taxonomia de rizóbios

Um marco na rizobiologia foi a descoberta, em 2001, de membros das beta-proteobactérias em nódulos de leguminosas tropicais, incluindo *Burkholderia* sp. (MOULIN *et al.*, 2001) e *Ralstonia taiwanesis* (CHEN *et al.*, 2001), quebrando o paradigma de que apenas alfa-proteobactérias poderiam estabelecer simbioses com leguminosas. Um estudo taxonômico feito por Vandamme *et al.* (2002) confirmou que as estirpes obtidas por Moulin *et al.* (2001) pertenciam ao gênero *Burkholderia*, sendo classificadas como as espécies recém descritas, *B. tuberosa* e *B. phymatum*, enquanto dois isolados de nódulos de *Mimosa diplotricha* e *M. pudica* pertenciam a *B. caribensis*. Analisados em conjunto, os estudos de Moulin *et al.* (2001), Chen. *et al.* (2001) e Vandamme *et al.* (2002), sugeriam que os então chamados “beta-rizóbios” (MOULIN *et al.*, 2002), podem de fato ser comuns em nódulos de leguminosas tropicais. Essa sugestão é fundamentada nos trabalhos de Chen e colaboradores, ao estudarem bactérias em nódulos de *Mimosa diplotricha* e *M. pudica*, mostraram que 94% de seus 180 isolados foram identificados como sendo do gênero *Ralstonia* (CHEN *et al.*, 2003).

Recentemente estudos realizados no Brasil, confirmaram que 98% dos isolados de bactérias associadas com espécies do gênero de *Mimosa* eram *Burkholderia* spp. e estas foram consideradas como sendo ancestrais ao rizóbio, derrubando assim a hipótese de que as Burkholderias tenham adquirido os genes fixadores de nitrogênio do rizóbio de forma horizontal (BONTEMPS *et al.*, 2010).

A taxonomia de rizóbios vem sofrendo alterações consideráveis nos últimos anos, estas mudanças configuram a existência de 18 gêneros que distribuem-se em 10 famílias e contabilizam 98 espécies (WEIR, 2012). Além dos tradicionais gêneros pertencentes a subclasse α -proteobactéria, também foram incluídos gêneros de bactérias que nodulam leguminosas pertencentes as subclasses β -proteobactérias e até mesmo γ -proteobactérias (SHIRASHI *et al.*, 2010; MAHDHI *et al.*, 2012).

Atualmente a classificação a nível de gêneros de rizóbios baseia-se na filogenia do 16S rRNA e a definição de espécies na análise polifásica (CHANG *et al.*, 2011), porém as características culturais ainda são importantes, já que podem indicar diferenças

morfofisiológicas importantes (ZHANG *et al.*, 2008; CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2009; CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010).

2.5 – *Clitoria fairchildiana* e a diversidade de rizóbios

Ainda se conhece pouco sobre que bactérias que estão associadas *Clitoria fairchildiana*, mas dados da literatura (MENNA *et al.*, 2006) e observações recentes feitas no laboratório de Leguminosas Florestais da Embrapa Agrobiologia indicam que essa espécie está associada a beta-rizóbios. Essa observação reforça resultados que mostram que a simbiose com beta-rizóbios se estende a espécies de outras subfamílias que não Mimosoideae (que vem sendo previamente descrito), que, no caso do sombreiro, é a subfamília Faboideae (ELLIOT *et al.*, 2007). Assim, o estudo destes simbioses levando-se em consideração a diversidade associada ao sombreiro destes, abre espaço para avanços na compreensão da evolução da simbiose beta-rizóbios-leguminosas.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

- Comparar isolados de rizóbios do Norte, Nordeste e Sudeste quanto a diversidade morfológica destes associados ao sombreiro (*Clitoria fairchildiana*).

3.2 – Objetivos específicos

- Obter isolados da região Norte e Sudeste;
- Caracterizar os isolados quanto a morfologia;
- Analisar o agrupamento obtido com os dados morfológicos;
- Autenticar os rizóbios com plantas iscas em casa de vegetação;
- Detectar o gene da análise do gene *nodC*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Coleta de nódulos no campo, desinfestação superficial e isolamento

Solo e mudas de *Clitoria fairchildiana* foram coletados nos estados de Minas Gerais e Pará, os isolados do Nordeste utilizados foram obtidos a partir da coleção do Laboratório de Leguminosas Florestais. Cinco gramas desse solo foram suspensos em 50 mL de solução de NaCl 0,55% e inoculados em mudas plantadas em vasos de Leonard com areia e vermiculita (proporção 2:1 v:v) estéreis. Após 4 meses, as plantas foram coletadas e utilizadas para o isolamento de rizóbios a partir dos nódulos. Os isolados do Nordeste foram obtidos na coleção de culturas do Laboratório de Leguminosas Florestais da Embrapa Agrobiologia.

Os nódulos coletados foram desinfestados superficialmente com álcool (imersão por 30 segundos), peróxido de hidrogênio concentrado (H₂O₂) por 3 a 5 minutos e água destilada estéril (5 lavagens sucessivas). Posteriormente sucedeu-se o isolamento das bactérias (rizóbios) em meio de cultivo manitol – extrato de levedura – ágar, também conhecido como YMA ou meio 79 (FRED & WAKSMAN, 1928), com azul de bromotimol e pH 6,8 – 7,0, a

28°C. Os nódulos desinfestados foram exprimidos no meio de cultivo e as bactérias que cresceram foram purificadas ao longo de várias etapas até que fosse garantido que as culturas estivessem puras (Figura 1). Estas foram armazenadas em tubos de ensaio contendo meio YMA e óleo mineral e em microtubos contendo glicerol, à temperatura de -20°C.

4.2 – Caracterização morfológica

Após a purificação dos isolados foi feita a caracterização morfológica das culturas em meio de cultivo YMA (79), com azul de bromotimol e pH 6,8 – 7,0, a 28°C. Os parâmetros analisados foram:

1. Tempo de crescimento: muito rápido (1 dia), rápida (2 a 3 dias), intermediário (4 a 5 dias), lento (6 a 10 dias) e muito lento (acima de 10 dias);
2. Diâmetro das colônias: avaliado na ocasião da 1ª observação de colônias isoladas e aos 5, 6-7, 8-9, 10-12 e 15 dias, respectivamente, para crescimentos muito rápido, rápido, intermediário, lento e muito lento;
3. Alteração do pH do meio: ácido (coloração amarela), alcalino (coloração azul) e neutro (sem alteração de cor);
4. Produção de muco: escassa, pouca, moderada e abundante;
5. Forma das colônias: puntiforme (< 1 mm), circular e irregular;
6. Elevação: plana, lenticular, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada
7. Borda: inteira, ondulada, lobada, denteada
8. Transparência: opaca e translúcida
9. Superfície: lisa, rugosa, papilada
10. Coloração das colônias: incolor, branco, creme, amarelo, outra.

4.3 – Análise de agrupamento

Transformando-se os dados qualitativos gerados na caracterização morfológica em uma matriz binária no Excel, foi feito o agrupamento das estirpes, por meio do software R, com distância de Jaccard e algoritmo UPGMA.

4.4 – Autenticação em casa de vegetação

O experimento de autenticação, que é realizado comumente para confirmar a capacidade nodulífera das estirpes isoladas, foi conduzido em casa de vegetação, com duração média de um mês, sem repetições. As sementes utilizadas foram de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) que é uma leguminosa promíscua (não possui especificidade com hospedeiro específico), pois não houve disponibilidade de sementes de sombreiro na ocasião da autenticação. O recipiente utilizado foram garrafas do tipo “long neck”, com papel filtro e adicionada solução de Norris modificada (GRUZMAN & DOBEREINER, 1968), e posteriormente este conjunto foi autoclavado. As sementes de siratro foram escarificadas durante 15 minutos em ácido sulfúrico concentrado, a desinfestação superficial foi feita em imersão em peróxido de hidrogênio e sucessivas lavagens em água destilada estéril e pré-

germinadas em placas de Petri com papel filtro e algodão previamente autoclavadas. Quando germinadas, as sementes foram transplantadas para as garrafas “long neck” e inoculadas com 1 mL de cultura de cada estirpe isolada (Figura 2). O experimento foi acompanhado periodicamente, a fim de se detectar em estágio inicial o surgimento de nódulos. A coleta ocorreu aproximadamente um mês após a inoculação e os nódulos foram armazenados em sílica gel para posterior isolamento.

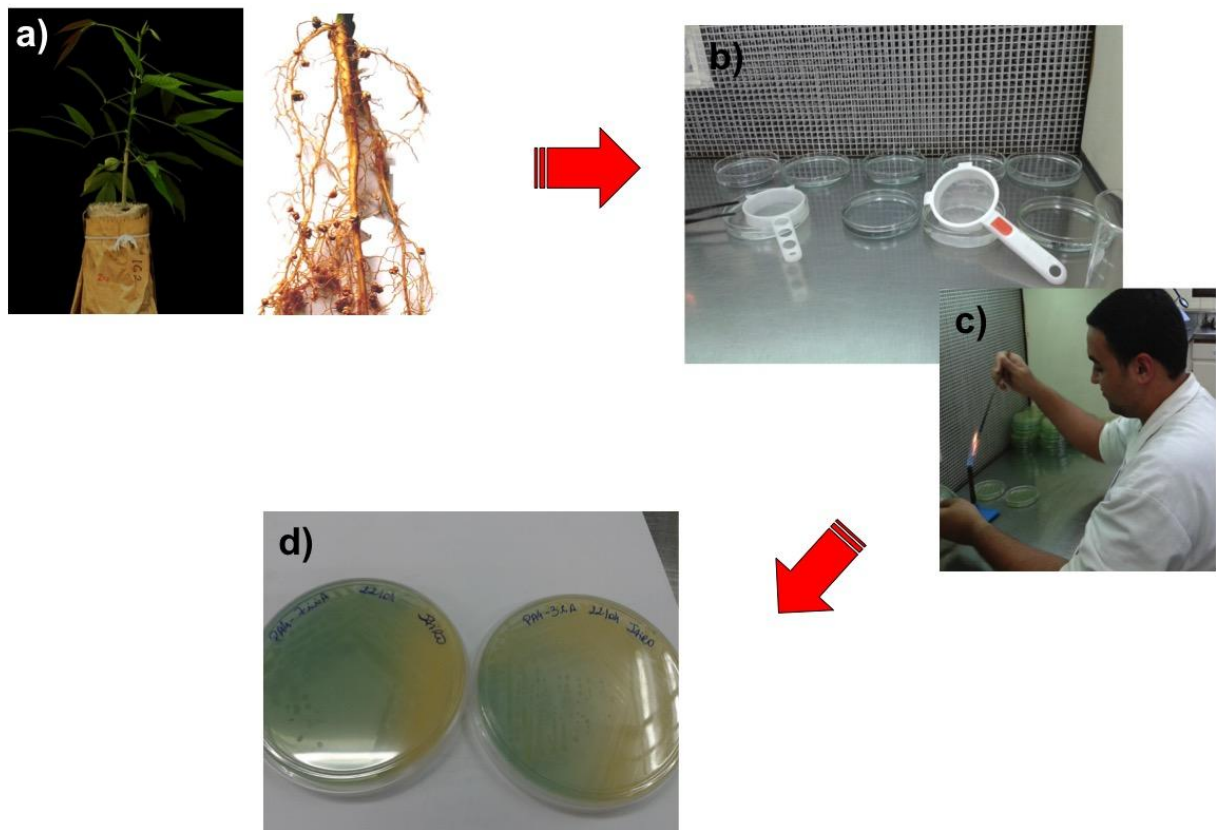


Figura 1 - Processo de isolamento de rizóbios a partir dos nódulos de *Clitoria fairchildiana*. (a) Planta de *C. fairchildiana* em vaso de Leonard e raiz nodulada; (b) procedimento de desinfestação superficial dos nódulos; (c) procedimento de isolamento; (d) estirpes purificadas em placa de petri.



Figura 2 - Garrafa do tipo long neck com solução nutritiva de Norris modificada, e plântula em desenvolvimento.

4.5 – Extração do DNA e avaliação da presença do gene *nodC*

A extração do DNA genômico de cada estirpe foi feita com o kit de extração *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega) conforme as instruções do fabricante. A extração do DNA foi realizada a partir de uma cultura de células crescidas em meio 79 líquido sob agitação constante de 150 rpm. Este DNA foi quantificado por espectrometria e a concentração foi ajustada para $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. O protocolo para eletroforese foi o padrão com gel de agarose a 1,5%.

O gene *nodC* foi amplificado a partir da reação de amplificação com os reagentes: tampão 1X; MgCl_2 , 1,5 mM; dNTPs, 0,3 mM; primer *nodCF*, 0,8 μM ; primer *nodCR*, 0,8 μM ; 0,05 U Taq por μL ; e 0,8 ng DNA por μL . O ciclo utilizado foi: desnaturação inicial a 95°C, por 5 min.; 30 ciclos de 95°C por 1 min.; 55°C, por 1min.; 72°C, por 1.5 m; e extensão final a 95°C por 3 min.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – Isolamento e purificação

Foram obtidos 91 isolados de rizóbios de sombreiro, sendo 37 da região Sudeste (Minas Gerais), 46 da região Norte (Pará) e 8 do Nordeste (Rio Grande do Norte).

5.2 – Caracterização morfológica

A maior parte dos isolados do Sudeste são de crescimento rápido a intermediário, alcalinizando o meio de cultivo (Figura 3 e 4). Além disso, estes isolados apresentaram colônias circulares, com diâmetros variáveis, a maioria apresentando borda inteira, superfície lisa e escassa a pouca produção de muco. A maioria destes isolados apresentou colônias opacas, com coloração variando entre branca, creme e amarela.

Por sua vez, os isolados do norte do país são, em sua maioria, de crescimento rápido a lento, alterando o meio para alcalino ou neutro, com colônias circulares e irregulares, com diâmetro variáveis, bordas inteiras, superfície lisa, e muco variando de escasso a abundante. As colônias são opacas ou translúcidas, e com coloração variando entre incolor, branca, creme e amarela. Quanto a região Nordeste devido ao baixo número de isolados em análise, as

características morfológicas identificadas ao se comparar com Norte e Sudeste apresentaram características de ambas regiões.

De acordo com Swift & Bignell (2001) a caracterização cultural é o primeiro passo para identificação de isolados de rizóbio. Os rizóbios clássicos podem ser divididos com base em características de alteração do pH e tempo de aparecimento de colônias, a saber: *Azorhizobium*, crescimento rápido e alcalinização intensa do meio de cultura, com colônias pequenas e secas; *Rhizobium* e *Ensifer* (anteriormente classificado como *Sinorhizobium*), com acidificação do meio de cultivo, crescimento rápido e, usualmente, produção abundante de muco; *Mesorhizobium*, com acidificação ou meio de cultura sem mudança de pH, crescimento intermediário e, usualmente, produção abundante de muco; e *Bradyrhizobium*, com alcalinização do meio de cultivo e crescimento lento. Porém, esta classificação permite uma divisão muito grosseira, além de não considerar o grupo recém descoberto de beta-rizóbios. Contudo, esta é uma primeira aproximação e pode até mesmo ser utilizada para estudos de diversidade, fornecendo resultados consideravelmente confiáveis. Jesus et al. (2005) utilizaram estas características para caracterizar a diversidade de solos da Amazônia e, posteriormente, resultado similar foi observado nas mesmas áreas quando rizóbios foram caracterizados por meio de técnicas moleculares (LIMA *et al.*, 2009). Tanto no que diz respeito à diversidade morfológica quanto à diversidade taxonômica, esta foi demonstrada como baixa na floresta por ambos os métodos.

Segundo Thies *et al.* (1991), a alcalinização do meio caracterizaria as estirpes como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. Porém, este gênero, em geral, apresenta espécies de crescimento lento (aparecimento de colônias a partir de 5 dias após a inoculação em meio de cultivo). O gênero *Azorhizobium* também alcaliniza o meio de cultura e, ao contrário de *Bradyrhizobium*, apresenta crescimento rápido, contudo este gênero está restrito a espécies de *Sesbania* (DREYFUS *et al.*, 1988; MOREIRA *et al.*, 2006). Uma terceira possibilidade é que esses isolados pertençam ao gênero *Burkholderia*, que apresenta estirpes de crescimento rápido, porém capazes de alcalinizar o meio de cultura. Esta indefinição quanto ao posicionamento taxonômico será esclarecida futuramente quando os isolados forem submetidos à amplificação e sequenciamento de marcadores filogenéticos.

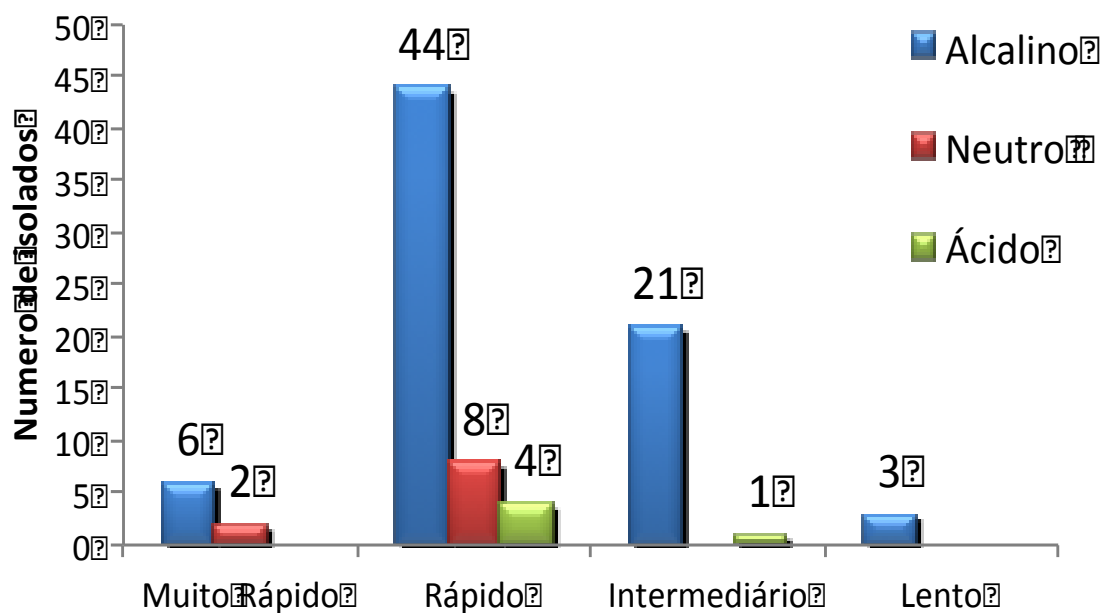


Figura 3 - Número de isolados de rizóbios de *Clitoria fairchildiana* de diferentes tipos de crescimento e reações de pH em meio de cultivo 79 (FRED & WAKSMAN, 1928) contendo azul de bromotimol (pH 6,8). O tempo de crescimento se refere ao tempo para o aparecimento de colônias isoladas: Muito rápido, 1 dia; Rápido, 2 a 3 dias; Intermediário, 4 a 5 dias; e Lento, a partir de 6 dias.

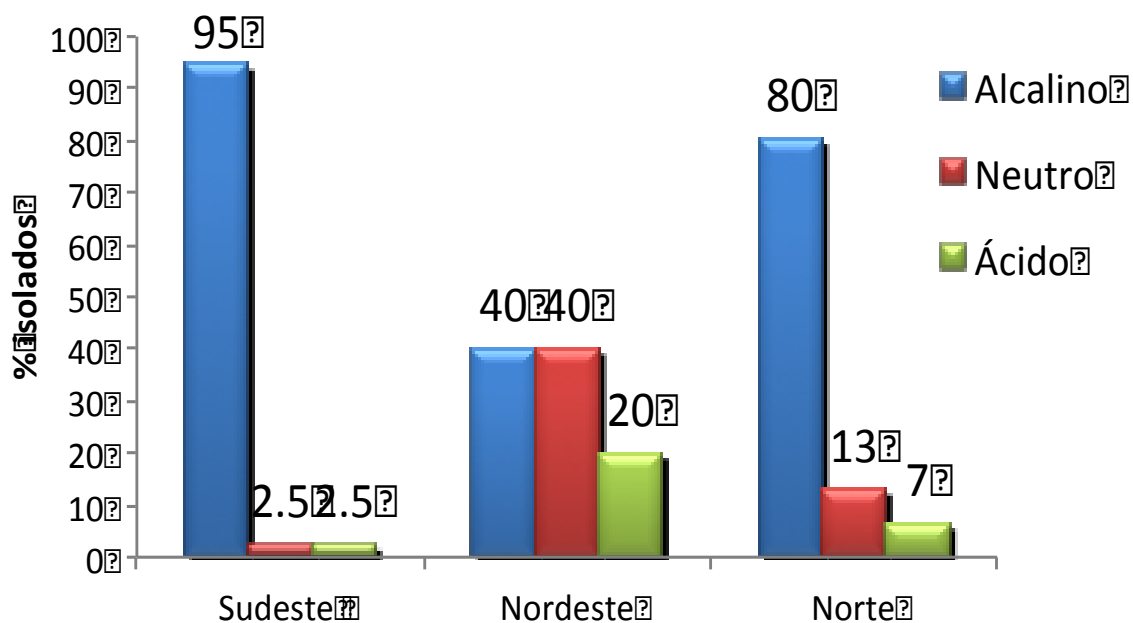


Figura 4 - Proporção de rizóbios isolados de nódulos de *Clitoria fairchildiana* provenientes do Sudeste (Minas Gerais), Norte (Pará) e Nordeste (Rio Grande do Norte) do Brasil, salientando o pH sua classificação com base na alteração do pH do meio de cultivo 79 (FRED & WAKSMAN, 1928) contendo azul de bromotimol (pH 6,8).

5.3 – Análise de agrupamento

O dendrograma gerado pelo software R a partir dos dados da caracterização morfológica separou as estirpes estudadas em dois grandes grupos (Figura 4), formados a uma distância de 70%. Um dos grupos possui maioria de isolados do Sudeste, com 74% dos isolados provenientes dessa região, 24% do Norte e 2% do Nordeste. O outro grupo, por sua vez, possui maioria de isolados do Norte, sendo 70% dos isolados provenientes dessa região, 20% do Sudeste e 10% do Nordeste (Figura 5).

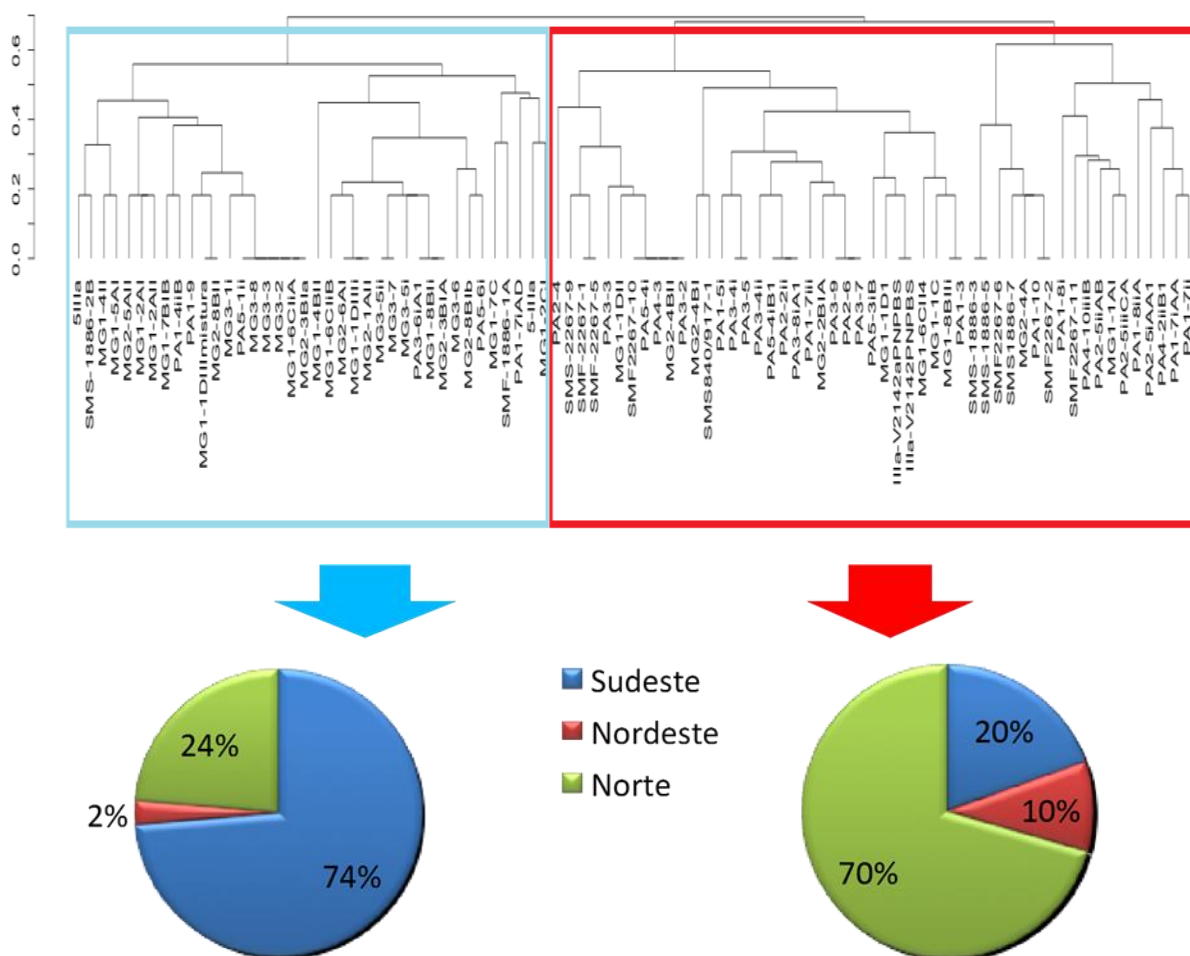


Figura 5 – Diagrama representativo com base no grupamento dos isolados de acordo com suas características culturas em meio de cultivo 79 com azul de bromotimol (pH 6,8) e sua proporção dentro dos dois principais grupos formados no dendrograma de acordo com a região geográfica amostrada. Códigos MG, PA e SMF se referem a isolados do Sudeste (Minas Gerais), Norte (Pará) e Nordeste (Rio Grande do Norte), respectivamente.

Os resultados obtidos até o momento indicam que há variação quanto às espécies de rizóbios isolados do Norte e do Sudeste, o que caracterizaria a *C. fairchildiana* como uma leguminosa promíscua, que tem capacidade de nodular com estirpes presentes na área onde foram introduzidas. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Oliveira Júnior (2011) que observou que *C. fairchildiana* foi capaz de nodular com 61 de 64 estirpes de rizóbio testadas em condições estéreis, oriundas da coleção da Embrapa Agrobiologia e pertencentes

às mais diversas espécies (e.g., *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Burkholderia* spp.). Porém, o mesmo autor também destacou que a maior eficiência foi observada quando *C. fairchildiana* estava associado a estirpes de *Bradyrhizobium*, e levantou a hipótese de que essa espécie tenha preferência por esse gênero como simbiote.

Segundo Perret *et al.* (2000) leguminosas são consideradas promíscuas quando nodulam com uma gama muito grande de estirpes rizobianas. Esta pode ser uma característica importante para que espécies vegetais dependentes de simbioses, como é o caso de *C. fairchildiana*, possam se estabelecer em novos ambientes. A falta de especificidade poderia contribuir para que ela se associe a estirpes nativas da área onde for introduzida, embora isto não garanta que essas estirpes sejam as mais eficientes. Isto requer mais estudos para determinar se a eficiência da estirpe está ou não relacionada ao local de origem da espécie simbiote, isto é, se estirpes provenientes da zona de endemismo da espécie são mais eficientes que estirpes de outras regiões. Ressalta-se a necessidade de analisar mais amostras, provenientes de outras localidades, de modo a se fazer uma inferência robusta quanto à diferenciação entre populações de rizóbio em função de sua localização geográfica.

Do ponto de vista ecológico, destaca-se ampla ocorrência e adaptação de leguminosas nos diversos biomas brasileiros e isso pode ser caracterizado pela promiscuidade encontrada nas leguminosas, e o que foi até o presente momento identificado para *C. fairchildiana*.

5.4 – Autenticação, extração do DNA e avaliação da presença do gene *nodC*

Foram utilizados para autenticação sessenta e quatro isolados, destes trinta e nove isolados foram positivos para nodulação em siratro (*Macroptilium atropurpureum*), sendo 24 deles provenientes do Sudeste e 15, provenientes do Norte. Os isolados do Nordeste não foram autenticados e, portanto, nada se sabe sobre sua capacidade de induzir nodulação em leguminosas.

A extração de DNA foi realizada eficientemente, o que permitiu a amplificação e avaliação da presença do gene *nodC*. Todos os isolados que apresentaram um único fragmento de aproximadamente 620 pares de bases foram considerados como positivos para presença desse gene no genoma.

A totalidade de isolados que induziram a formação de nódulos em siratro, apresentaram o *nodC* (Figura 6). Todavia, outros isolados que não induziram a nodulação nesta leguminosa apresentavam esse gene em seus genomas. Isso indica que embora o siratro seja uma leguminosa promíscua, e os isolados apresentem os genes para nodulação, esses provavelmente não são capazes de se associar ao siratro. Desta forma, será necessário a autenticação destes isolados em *C. fairchildiana*, a qual não foi possível em função da indisponibilidade de sementes na ocasião da experimentação.

O elevado número de isolados positivos para a nodulação em siratro e também para presença do gene *nodC*, aponta para a eficiência do procedimento de isolamento e recuperação de rizóbios a partir dos nódulos coletados. O *nodC* é um dos genes envolvidos na capacidade de induzir nodulação em leguminosas, mais especificamente, na síntese da enzima N-acetilglicosaminiltransferase, a qual é responsável pela síntese da estrutura básica dos fatores de nodulação em rizóbios (FRANCHE *et al.*, 2009). Por estar presente na grande maioria das estirpes de rizóbios, este gene é utilizado como um marcador molecular,

indicando o potencial da estirpe para nodular leguminosas. Contudo, o teste definitivo é a autenticação na planta hospedeira ou em uma outra leguminosa receptora, e onde se observe nodulação.

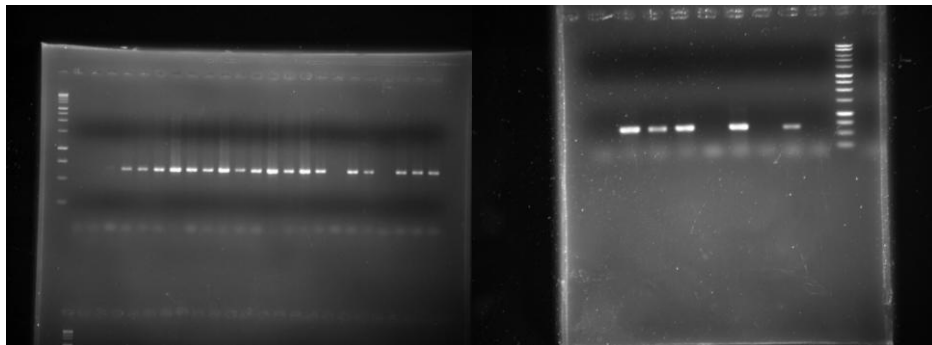


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação do gene *nodC*, evidenciando os resultados positivos para este. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1 Kb *DNA Ladder* da Promega, no primeiro gel sendo representado pela primeira coluna e no segundo a última coluna.

6. CONCLUSÃO

Sob diagnóstico acima descrito pode-se concluir que:

Há predominância de grupos de isolados distintos nas regiões Sudeste e Norte devido as características morfológicas contrastantes apresentadas pela maioria dos isolados entre as localidades geográficas em estudo, sugerindo, assim, que a espécie hospedeira do estudo é capaz de se associar a uma alta diversidade de rizóbios;

Além disso, mais análises quanto ao genoma destes isolados devem ser realizadas, pois, estes resultados são iniciais, e as técnicas até o presente momento utilizadas não são suficientes para inferir quanto a diversidade de rizóbios a nível de espécie.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied And Environmental Microbiology**, v.61, n.11, p.4016-4021, 1995.

ARDLEY, J. K.; PARKER, A. M.; DE MEYER, S. E.; TRENGOVE, R. D.; O'HARA, G. W.; REEVE, W. G.; YATES, R. J.; DILWORTH, M. J.; WILLEMS, A.; HOWIESON, J. G. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov., and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are Alphaproteobacterial root nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. *Mimosa caesalpinifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** ijs.0.035097-0; publicado on-line em 23 de dezembro de 2011.

BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de Herbaspirillum spp. no processo de inoculação e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 265p. Tese (Doutorado). Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.

BÉCQUER, C.J. Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias. **Revista Biología**, v.18, n.1, p.9-29, 2004.

BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; REIS JUNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; LOUREIRO, M. F.; DE FARIA, S. M.; SPRENT, J. I.; JAMES, E.K.; YOUNG P. W. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 44-52. 2010.

BORDELEAU, L. M.; PRÉVOST, D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 161, p. 115 – 125, 1994.

CHEN, W. M.; JAMES, E. K.; CHOU, J-H.; SHEU, S-Y.; YANG, S-Z.; SPRENT, J. I. β -rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **The New Phytologist**, v. 168, p. 661-675, 2005.

CHEN, W. M.; LAEVENS, S. ; LEE, T. M. ; COENYE, T. ; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W. M.; MOULIN, L. ; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P. ; BÉNA, G. ; BOIVIN-MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 7266-7272, 2003.

CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R.; SCHIMEL, D. S.; FISHER, H.; HOWARTH, R. W.; HEDIN, L. O.; PERAKIS, S.S.; LATTY, E.F.; VON FISCHER, J. C.; ELSEROAD, A.; WASSON, M. F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N_2) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 13, p. 623-645, 1999.

DÖBEREINER, J. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.19, s/n, p.83-90, jun. Edição Especial. 1984.

DREYFUS (B.), GARCIA (J.L.) and GILLIS (M.): Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 89-98, 1988.

ELLIOT, G. N.; CHEN, W-M; BONTEMPS, C.; CHOU, J-H; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J.; JAMES, E. K. Nodulation of *Cyclopia* spp. (Leguminosae, Papilionoideae) by *Burkholderia tuberum*. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1403-1411, 2007.

FAY, P. **Photosynthetic Micro-organisms: nitrogen fixation**. Oxford: Claredon, 1981. (Ecology, v. 1)

FENG, L.; ROUGHLEY, R.J.; COPELAND, L. Morphological changes of Rhizobia in peat cultures. **American Society for Microbiology**, v.68, n.3, p.1064-1070, 2002.

FRANCHE, C.; LIDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, v. 321, p. 35-59, 2009.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory Manual of General Microbiology with Special Reference to the Microorganisms of the Soil**. Mac-Graw-Hill book company, Inc.: New York, 145p. 1928.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 872-877, 2003.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J. N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v. 451, p. 293-296, 2008.

GRUZMAN, I.; DOBEREINER, J. **Anais da IV Reunião Latino-Americana sobre Inoculantes para Leguminosas**. Porto Alegre, p. 84, 1968.

KAHINDI, J. H. P.; WOOMER, P.; GEORGE, T.; MOREIRA, F. M. S.; KARANJA, N. K.; GILLER, K. E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 55-76, 1997.

LIN, D. X.; WANG, E. T.; TANG, H.; HAN, TI. X.; HE, Y. R.; GUAN, S. H.; CHEN, W. X. (2008) *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1409-1413, 2008.

LIU, J; WANG, E.T.; CHEN, W.X. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of the China. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, n.5, p.465-77, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1992.

- MAHDHI, M.; FTERICH, A.; REJILI, M.; RODRIGUEZ-LLORENTE, I. D.; MARS, M. Legume-nodulating bactéria (LNB) from three pasture legumes (*Vicia sativa*, *Trigonella marítima* and *Hedysarium spinosissimum*) in Tunisia. **Annals of Microbiology**. V. 62, p. 61-68, 2012.
- MEDEIROS, E. V.; MARTINS, C. M.; LIMA, J.A.M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R.; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy** (Online), v. 31, p. 529-535, 2009.
- MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; PITARD, R. M.; YOUNG, J. P. W.. *Azorhizobium doebereineriae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 197-206, 2006.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 620p.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2º ed. Atual e Aplicada, Lavras, Ed. UFLA, 729p. 2006.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARINEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 315-332, 2006.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950, 2001.
- MOULIN, L.; CHEN, W-M.; BÉNA, G.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Rhizobia: the family is expanding. Pages 61-65 in: **Nitrogen Fixation: Global Perspectives**. T. Finan, M. O'Brian, D. Layzell, K. Vessey, and W. Newton, eds. CAB International, 2002.
- NORRIS, D.O.T.; MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forest Journal, Nairobi**, v.29, p214-235. 1964.
- OLIVEIRA JÚNIOR, J. Q. de. Seleção de estirpes eficientes par leguminosas florestais. Monografia para conclusão de curso: UFRRJ, Engenharia Florestal. Seropédica, Rio de Janeiro: 2011. 26 p.
- ORMEÑO-ORRILLO, E.; VINUESA, P; ZÚÑIGA-DAVILA, D.; MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular diversity of native *Bradyrhizobia* isolated from (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.1, p.253-262, 2006.
- PARKER, M. A. Mutualism as a constraint on invasion success for legumes and rhizobia. **Diversity and Distributions**, v. 7, p. 125-136, 2001.

PELCZAR, JR.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia do Solo e do Ar. In: PELCZAR, JR.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. Vol II, Makron Books do Brasil Editora Ltda. 306-336. 1997.

PERRET, X., STAHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 180-201, 2000.

RAVEN, P.; EVETR, R.R; EICHHORN,S.E. Biologia Vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.307-311. 2001.

RICHARDSON, D. M.; ALLSOPP, N.; D'ANTONIO, C. M.; MILTON, S. J.; REJMANEK, M. Plant invasions - the role of mutualism. **Biology Reviews**, v. 75, p. 65-93, 2000.

RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5217-5222, 2002.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v.25, n.1, p. 39-67, 2001.

SHARMA, S.; RANGGER, A.; von LÜTZOW, M.; INSAM, H. Functional diversity of soil bacterial communities increases after maize litter amendment. **European Journal Soil Biogy**, v.34, n.2, p. 53-60, 1998.

SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. And Betaproteobacteria *Burkholderia* sp.. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 269-274, 2010.

SILVA, G. P. Caracterização química, física e mineralógica de materiais provenientes da mineração de ferro e comportamento de plantas para sua revegetação. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1994. 76p. (Tese de Mestrado).

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. Biotecnologia do solo : fundamentos e perspectivas,Ciências Agrárias nos Trópicos. Brasília: MEC/ABEAS; Lavras: ESAL/ FAEPE, p. 23. 1988.

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M. do; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B. de; MOREIRA, F. M. de S. Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native nodulating populations in Perdões (MG - Brazil): I - cowpea. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.5, p.795 802, 2006.

SOUZA, V. C. et al., Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. V. 10, n. 3, p. 612-618, 2006.

SPRENT, J. I. **Nodulation in Legumes**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001.

SPRENT, J. I. **Legume nodulation: A Global Perspective**. Wiley-Blackwell, 2009.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 214-220, 2001.

STROSCHEIN, M.R.D. **Caracterização de bactéria fixadora de nitrogênio em *Lupinus albus***. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - UFSM, Santa Maria, PR

Thies, J.E.; Bohlool, B.B.; Singleton, P.W. Subgroups of de Cawpea miscellany: symbiotic specificity within Bradyrhizobium spp. for Vigna unguiculata, Phaseolus lunatus, Arachis hipogaea and Macroptilium atropurpureum. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, D.C. v.57, n.5, p.1540-1545, 1991.

van BERKUM, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium Blastobacter denitrificans is a nitrogen-fixing symbiont of Aeschynomene indica. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1132-1136, 2002.

VANDAMME, P.; J. GORIS, W.; M. CHEN; P. DE VOS; A. WILLEMS. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 507-512, 2002.

WANG, H.; MAN, C. X.; WANG, E.T.; CHEN, W. X. Diversity of rhizobia and interactions among the host legumes and rhizobial genotypes in an agricultural-forestry ecosystem. **Plant and Soil**, v. 314, p. 169-182, 2009.

WEIR, B. S. The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. Disponível em: <http://www.rhizobia.com.nz/taxonomy/rhizobia>. Acessado em: 10/06/2014.

YOUNG, J. P. W. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 186, p. 45-52, 1996.

ZRIBI, K.; MHAMDI, R.; HUGUET, T; AOUANI, M.E. Diversity of *Sinorhizobium Meliloti* and *S. medicae* nodulating Medicago Truncatula according to host and soil origins. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, n.6-7, p.1009-1015, 2005.

ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; RIVAS, R.; TRUJILLO, M. E.; VIZCAINO, N.; CARRASCO, J. A.; CHAMBER, M.; PALOMARES, A.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 784-788, 2007.