



**Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituto de Florestas
Curso de Graduação em Engenharia Florestal**

Especificidade hospedeira de estirpes de rizóbio para leguminosas florestais

Fernando Soares Gonçalves

**Seropédica, RJ
Julho, 2009**

Especificidade hospedeira de estirpes de rizóbio para leguminosas florestais

Fernando Soares Gonçalves

Sob orientação do pesquisador
Sergio Miana de Faria

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

Seropédica, RJ
Julho, 2009

Especificidade hospedeira de estirpes de rizóbio para leguminosas florestais

Fernando Soares Gonçalves

Aprovada em 06 / 07 / 2009

Sergio Miana de Faria
Pesquisador-Embrapa Agrobiologia
(orientador)

Gustavo Ribeiro Xavier
Pesquisador-Embrapa Agrobiologia

Claudia Pozzi Jantalia
Pesquisadora-Embrapa Agrobiologia

*“No final tudo da certo.
Se ainda não deu certo é porque não acabou.”*

Zélia Cardoso de Melo

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Vicente e Maria que sempre me apoiaram em todos os momentos, a minha irmã Liliane e ao meu irmão Leandro, que estarão sempre comigo mesmo que a distancia seja grande.

À minha segunda família que me deu muito carinho e me trataram como um filho e sempre me apoiando. À minha sogrinha Selma, ao sogro Helio e aos cunhados Eduardo e Bruno.

À minha grande amiga e noiva Kelly pelo carinho, apoio, dedicação e companheirismo dedicado todos os dias.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo suporte para o meu desenvolvimento como cidadão e profissional.

À Embrapa Agrobiologia e a toda a minha família do Laboratório de Leguminosas pelos dias de alegria e risadas proporcionadas, principalmente nos dias de stress de final de período. Em especial aos pesquisadores Sergio Miana, Alexander Silva e Claudia Pozzi pela orientação. Ao doutorando Wardsson Lustrino Borges que sempre prestativo me ajudou muito, principalmente na análise filogenética das estirpes. Aos bolsistas Keila Dalle Laste, Oduvaldo Filho, Eduardo Fonseca, Joel Quintino, João, Rafael e Augusto pelos experimentos implantados e coletados, nódulos contados, trabalhos científicos produzidos e pela amizade. Aos técnicos Adriana dos Santos, Fernando Cunha e Telmo Felix pela grande ajuda e amizade.

À Companhia Vale e à Fapur pelo financiamento do projeto.

Aos componentes da banca examinadora pelo tempo e atenção disponibilizados.

Aos meus grandes amigos Ranieri, Andreia, Cátia, Ana Carolina e Alexandre que sempre dividiram comigo as alegrias e tristezas e sempre estarão comigo.

Aos funcionários da casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia muito obrigado pela ajuda prestada, pois sem ela a pesquisa não poderia ser realizada: Claudinho, Naldo, Luizinho, e Serginho por toda ajuda e boa vontade sempre!

Aos meus grandes amigos que fiz morando no alojamento: Ronan, Michel, Thobias, Alfredo, Jonas, Emanuel, Carlos, Leandro, Alexandre, Wilmar e Evandro. E a todos que direto ou indiretamente contribuíram para a minha formação.

E a Ele que sempre esteve presente.

Muito obrigado.

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a especificidade e ou promiscuidade entre estirpes de rizóbio com hospedeiros de leguminosas florestais. A base metodológica utilizada para a construção de um diagrama foi baseado em resultados obtidos em experimentos realizados na Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ) sob condições estéreis, utilizando vaso de *Leonard* na seleção de estirpes de alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio (FBN) para leguminosas florestais com potencial de utilização na recuperação de áreas degradadas, revegetação, entre outros fins. Os resultados encontrados apontam que existe um especificidade entre os hospedeiros e as estirpes isoladas da própria tribo, sendo mais evidente para na tribo *Mimoseae*, onde as estirpes que promovem a nodulação foram isoladas de hospedeiros da própria tribo. E algumas estirpes são altamente promiscuas, sendo viáveis para vários hospedeiros como as estirpes BR6205, BR5609 e BR3609 que são eficientes na fixação biológica de nitrogênio para mais de 15 espécies.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, inoculação cruzada, simbiose

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the specificity and/or promiscuity between rhizobial strains and legume species. The methodology applied for the construction of a diagram was based on results obtained in experiments performed at Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ) under sterile conditions, using Leonard fars for selection of rhizobial strains with high efficiency in the biological nitrogen fixation (BNF) legumes species hight with potential for using degraded areas, reforestation, among other uses. The results indicated that there is a hight specificity between host-plant and the strains isolated from the tribe, being more evident for the tribe *Mimoseae*, where the strains whide have induced a nodulation were isolated from species of their own tribe. And some strains were highly promiscuous and were ffcient for several species such as strains BR6205, BR5609 and BR3609 were efficient on plant growth for more than 15 species.

Keywords: biological nitrogen fixation, cross inoculation, symbiosis

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA	IX
1.Introdução	1
2.Revisão Bibliográfica	2
2.1 Importância das espécies leguminosas	2
2.2 Diversidade da simbiose rizóbio-leguminosas	2
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio	3
2.4 Processos de infecção e Especificidade hospedeira	4
3.Material e Métodos	5
4.Resultados e Discussão	5
4.1 Especificidade hospedeira da planta em relação a estirpe	5
4.2 Especificidade hospedeira da estirpe em relação a planta	6
5.Conclusões	11
6.Referência Bibliográfica	12

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Espécies leguminosas com suas respectivas estirpes que promoveram o maior incremento de parte aérea seca.....	8
---	---

1. INTRODUÇÃO

A família *Leguminosae* é a terceira maior família de plantas com flores possuindo cerca de 20.000 espécies e 700 gêneros (LEWIS, 1987), só sendo superada pela *Orchidaceae* e *Asteraceae* (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Esta família se destaca em importância tanto econômica quanto ambiental, e parte das qualidades oferecidas por indivíduos desta espécie se dá pela capacidade de simbiose com bactérias denominadas de rizóbio. Estas espécies de microorganismos possuem a enzima nitrogenase que é responsável pela fixação biológica de nitrogênio atmosférico, processo crucial do ciclo do nitrogênio, já que este processo é capaz de transformar o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), forma assimilável pelas plantas (YOUNG, 1992).

A maioria das espécies da família são capazes de se associar simbioticamente, mas dentro das divisões das sub-famílias das leguminosas, a simbiose é mais freqüente nas *Papilionoideae*, seguida da *Mimosoideae* e por último a *Caesalpinoideae*. Este fato pode estar relacionado pelo grau de evolução dos indivíduos dentro dos ciclos evolutivos, como as características dos nódulos, onde nódulos dos tipos caesalpinióide e amplamente distribuídos nas três subfamílias, enquanto outros quatro tipos de nódulos (*crotalarióide*, *lupinóide*, *aeschynomenoide* e *desmodioides*) são mais expressivos entre as *Papilionoideae*. O nódulo do tipo caesalpinióide é característico dos grupos menos avançados das subfamílias *Caesalpinoideae* e *Mimosoideae* e tribos predominantemente lenhosas de *Papilionoideae* (CORBY, 1988).

A importância das espécies arbóreas ou arbustivas fixadoras de nitrogênio atmosférico pode ser evidenciada em sistemas agroflorestais, agropastoris, programas de recuperação de áreas degradadas, função produtiva e ou protetora. Dentre as funções produtivas, podem-se destacar a produção de alimentos, madeira, forragem, lenha, carvão, mel e outros produtos. Dentre as funções protetoras, pode-se ressaltar o controle de erosão, a estabilidade de taludes, quebra ventos, aumento no estoque e qualidade da água, além de funções conservacionistas (FARIA, *et al.*, 1999).

Mas para que a relação leguminosa-rizóbio aconteça de forma eficiente o processo está modulado por fatores edafoclimáticos e influenciado por características genótípicas do macro e estirpe, acontecendo uma intensa troca de sinais moleculares, refletindo nas diferentes respostas em relação à faixa hospedeira, especificidade e eficiência simbiótica (HARTWIG, 1998).

A especificidade hospedeira citada acima se caracteriza como sendo a capacidade de espécies leguminosas formarem nódulos e fixar nitrogênio com diferentes estirpes de rizóbio isoladas de outras espécies e/ou representa a habilidade de uma estirpe de rizóbio em provocar a nodulação e fixar N_2 quando associada a cultivares ou espécies do hospedeiro específico (DOBEREINER *et al.*, 1971). Os mecanismos envolvidos na simbiose, que determinam a especificidade hospedeira, ainda não estão completamente elucidados, contudo se sabe que flavonóides e compostos fenólicos exsudados das raízes ativam ou inibem genes bacterianos da nodulação (PETERS & LONG, 1988).

Além destes fatores extremamente importantes e complexos para o acontecimento da simbiose rizóbio-leguminosa, um novo fato descoberto recentemente, é de grande importância, pois se acreditava que os microorganismos responsáveis pela FBN em leguminosas eram provenientes somente das alfaproteobactéria, mas Moulin (2001) descobriu em nódulos isolados de Mimosas, bactérias do grupo da betaproteobactéria, dando assim um novo rumo as pesquisas, ampliando o leque da biodiversidade de microorganismos promotores de FBN.

Por isso programas de seleção de estirpes de rizóbio para leguminosas se faz necessário, já que a estirpe pode ou não se associar com a planta e promover a nodulação, sendo eficiente ou não.

Este trabalho objetivou avaliar a especificidade e ou promiscuidade entre estirpes de rizóbio com hospedeiros de leguminosas florestais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância das espécies leguminosas

As espécies leguminosas possuem diversas capacidades de utilização, como as leguminosas forrageiras que constitui uma fonte alternativa para suprir o nitrogênio nas pastagens manejadas extensivamente (TOLEDO, 1985; CADISCH et al., 1994; THOMAS, 1992) transferindo o nitrogênio fixado para a gramínea associada através da reciclagem dos resíduos vegetais, promovendo a economia com fertilizantes nitrogenados (WHITNEY et al., 1967; THOMAS, 1992), visto que o nitrogênio em condições tropicais é, em geral, extremamente limitante (FRANCO et al., 1992).

Dentro do processo de recuperação de áreas de mineração à exemplo, as pilhas do rejeito da lavra do minério de ferro não possuem matéria orgânica, principal fonte de nutrientes. Portanto, leguminosas fixadoras de nitrogênio podem contribuir para a revegetação dessas áreas em substituição ao plantio convencional não sustentável, que consiste de um coquetel de gramíneas e leguminosas herbáceas, em geral, não inoculadas com rizóbio específico, além de receberem elevadas doses de fertilizantes químicos periodicamente (de FARIA, 2002).

Na sucessão vegetal estas se constitui um elemento importante dentro do processo, tais resultados foram encontrados por CHADA et al. (2004) onde analisando uma sucessão vegetal em uma encosta reflorestada com leguminosas arbóreas, na região de Mata Atlântica concluíram que o reflorestamento mostrou-se eficaz na ativação dos mecanismos de sucessão natural e, após 7 anos, 50 espécies de 25 famílias botânicas já colonizavam o sub-bosque dessa área, com a ressalva de que algumas espécies plantadas já começavam a entrar em senescência, com a tendência de saírem paulatinamente do sistema.

As leguminosas florestais também possuem aplicabilidade no desenvolvimento de sistemas agroflorestais, sistemas agrossilvipastoris (VIEIRA et al., 2003) e fornecimento de madeira, celulose e carvão (FURTINI NETO et al., 2000).

2.2 Diversidade da simbiose rizóbio-leguminosas

Entre as 20000 espécies de leguminosas descritas pelo mundo, só uma pequena proporção foi estudada a capacidade de nodulação. Embora grande biodiversidade de espécies de leguminosas esteja concentrada em regiões tropicais, a maioria dos estudos contemplam espécies localizadas em regiões temperadas. Uma recente exploração de espécies de leguminosas selvagens tropicais (árvores e arbustos) comprovou uma diversidade inesperada de simbiontes, resultando na descrição de numerosas novas espécies na China (CHEN *et al.* 1991, 1995; XU *et al.* 1995; TAN *et al.* 2001; WEI *et al.* 2002), África (de LAJUDIE *et al.* 1994, 1998; WILLEMS *et al.* 2000; MOULIN *et al.* 2001; SY *et al.* 2001; VANDAMME *et al.* 2002), Índia (RIVAS *et al.* 2003), e na América do Sul (MARTINEZ-ROMERO *et al.* 1991; SEGOVIA *et al.* 1993; WANG *et al.* 1998, 2002; VELAZQUEZ *et al.* 2001; TOLEDO *et al.* 2003).

Até meados da década de 90, acreditava-se que as leguminosas eram noduladas exclusivamente por rizóbios pertencentes ao grupo das alfaproteobacterias e a gêneros da

ordem *Rhizobiales*, sendo somente 7 (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*). Mas nos últimos 3 anos, este número se estendeu para 11 com descrições de nodulação por *Blastobacter* (VAN BERKUM & EARDLY 2002), *Ochrobactrum* (TRUJILLO *et al.* 2005), *Devosia* (RIVAS *et al.* 2003) e *Phyllobacterium* (VALVERDE *et al.* 2005).

E mais recentemente Moulin *et al.* (2001) descobriu em nódulos de leguminosas tropicais o gênero de *Burkholderia* que pertence a membros de betaproteobactéria, a partir deste ponto houve um número crescente de estudos que constataram novas estirpes nodulíferas pertencentes a classe das beta-proteobactéria (CHEN *et al.* 2001, 2003,; BARRETT & PARKER 2005), apesar de bactérias nodulíferas deste gênero apresentam afinidades filogenéticas com patógenos animais e vegetais (WORDELL FILHO *et al.*, 2006). A maioria destes estudos foi realizado em leguminosas tropicais (*Mimosa Pudica*, *Mimosa Diplotricha*, *Machaerium Lunatum*, *Aspalathus Carnosa*), sugerindo assim que a diversidade atual de bactéria nodulíferas para espécies leguminosas é largamente subestimada.

Esta nova descoberta é principalmente importante para o gênero *Burkholderia*, já que este parecer ser bastante específico para espécies do gênero *Mimosa*. O gênero *Mimosa* é amplo e complexo, englobando aproximadamente 500 espécies, sendo a maioria encontrada nas Américas. O maior centro de diversidade de *Mimosa* é o Brasil central, onde muitas espécies podem ser observadas nas vegetações da Caatinga e do Cerrado, onde é o gênero mais rico em espécies. O bioma Cerrado é também um importante centro de endemismo para plantas deste gênero. Considerando seu tamanho e sua importância ecológica potencial, existem ainda poucos estudos sobre o processo de nodulação e de fixação biológica do nitrogênio associado a *Mimosa spp.*, exceto para as espécies hoje utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas como *M. caesalpinifolia* e *M. scabrella* (FRANCO & FARIA, 1997).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) é um processo ecológica e economicamente vantajoso, que pode substituir os onerosos adubos químicos nitrogenados. No Brasil, o melhor exemplo de utilização desse processo é a cultura da soja, na qual a adubação química nitrogenada é totalmente substituída pela utilização de inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, o que representou uma economia para o país de cerca de US\$ 6 bilhões no ano de 2006 (HUNGRIA *et al.*, 2006).

A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) é a conversão de nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), catalisada por organismos vivos. Todos os organismos fixadores de nitrogênio, chamados de organismos diazotróficos, são procariotos e utilizam para a fixação a enzima conhecida como nitrogenase. Essa enzima é sensível ao oxigênio, que pode destruí-la irreversivelmente. Essa reação é endergônica, isto é, a amônia é mais rica em energia que o nitrogênio atmosférico, e para que a reação ocorra é necessário fornecimento de energia, armazenada na forma de ATP (YOUNG, 1996).

A FBN não é um processo realizado constantemente pelos organismos fixadores, mas ocorre apenas quando for insuficiente a concentração de nitrogênio fixado, pois o gasto de energia para FBN é alto, e quando a concentração de O_2 for baixa, pois este pode inativar a nitrogenase.

A biologia molecular da FBN é um assunto complexo, pois envolve vários processos bioquímicos ou de regulação gênica, além de haver diferenças importantes entre os vários organismos até hoje estudados (BALACHANDAR *et al.*, 2007).

2.4 Processos de infecção e Especificidade hospedeira

Na maioria das leguminosas, a infecção esta relacionada com a zona de crescimento dos pelos absorventes; sendo esta via de penetração comumente usada pelos rizóbios, resultando na formação de um cordão infeccioso e liberação dos rizóbios no citoplasma das células corticais do nódulo. Assim é para *Vigna sinensis* (BHUVANESWARI *et al.*, 1981). Em outras espécies dentre elas muitas arbóreas, a formação de nódulos ocorre por penetração intercelular na emergência das raízes laterais, como descrito para *Sesbania rostrata* (DUHOUX, 1984). Um terceiro tipo de infecção foi registrado por Faria *et al.* (1988) em *Mimosa scabrella*, onde o rizóbio penetra entre as células epidérmicas não estando associadas com raízes laterais. Em algumas espécies tidas como primitivas, o cordão infeccioso e persistente, não ocorrendo liberação bacteriana intracelular (FARIA *et al.*, 1986). Esses cordões infecciosos persistentes são encontrados entre as espécies de *Caesalpinioideae* e *Papilionoideae*.

A definição da faixa hospedeira é bastante variável entre as espécies de rizóbio e leguminosas, mas de modo geral tem sido observada especificidade simbiótica entre as espécies (SMITH & GOODMAN, 1999). O genótipo da planta por exemplo, pode desempenhar um papel essencial na seleção do estirpe (DEMEZAS *et al.*, 1995; PAFFETTI *et al.*, 1998).

A especificidade entre hospedeiro e estirpe na interação entre rizóbio e leguminosa, pode ser explicada por dois modelos. No primeiro, a especificidade deve-se ao reconhecimento ou não dos exsudatos da planta pela bactéria, que induz ou não os genes nod. Esse modelo foi verificado nas interações entre *Lotus* e *Rhizobium loti* e *Phaseolus* e *R. etli*. *Lotus* pode ser colonizado por *R. loti* mas não por *R. etli* mas, uma vez induzida a expressão constitutiva de genes nod em *R. etli*, a colonização ocorre.

No segundo modelo, a especificidade deve-se aos lipo-oligossacarídeos. Por exemplo, alfafa induz a expressão de genes nod tanto em *R. meliloti* como em *R. leguminosarum* *bv. viceae*. Portanto, ambos sintetizam lipo-oligossacarídeos. No entanto, os lipooligossacarídeos sintetizados por *R. leguminosarum* *bv. viceae* não induzem nodulação, mas apenas aqueles sintetizados por *R. meliloti* (LONG, 1996).

Entretanto, em algumas interações a especificidade entre rizóbio e hospedeiro pode ser bem menor como, por exemplo, a cepa NGR234 de *Rhizobium* nodula 232 diferentes espécies de plantas leguminosas, além de uma espécie não leguminosa também hospedeira de rizóbios, *Parasponia andersonii* (PUEPPKE & BROUGHTON, 1999).

Atualmente, para melhor entendimento entre a relação simbiote-hospedeiro, principalmente para elucidar fatos relacionados a especificidade, a avaliação da diversidade de bactérias tem sido fortemente influenciada pelo uso de técnicas moleculares. Conforme Woese (1987), a capacidade de se realizar o seqüenciamento de ácidos nucléicos teve um grande impacto tanto na microbiologia como na classificação dos microrganismos. Contudo, além do seqüenciamento, existem várias outras técnicas disponíveis para a caracterização de microrganismos, as quais levam em consideração tanto características fenotípicas como genotípicas, como, por exemplo, eletroforese de proteína total, perfil de ácidos graxos, sorologia e avaliação de características culturais e morfológicas dos microrganismos (VANDAMME *et al.*, 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A estrutura metodológica utilizada para desenvolver o projeto foi baseada em resultados de experimentos para seleção de estirpes de rizóbios para espécies leguminosas em condições esterilizadas.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, localizadas na Embrapa Agrobiologia seguindo a metodologia descrita por FARIA (1999) para seleção de estirpes em condições estéreis, denominadas de base de recomendação II.

Para implantação dos experimentos foram utilizados vasos de ‘Leonard’, contendo como substrato areia e vermiculita (2:1v:v) esterilizados (VINCENT, 1970). O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com três repetições. Os tratamentos foram: testemunha nitrogenada com adição de três diferentes fontes de nitrogênio mineral: NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e KNO_3 , testemunha absoluta (livre de bactérias e de N mineral) e estirpes de bactérias pertencentes a coleção do laboratório de leguminosas da Embrapa Agrobiologia.

As sementes utilizadas nos experimentos quando necessário para quebrar a sua dormência e uniformizar o plantio sofreram um processo de escarificação em ácido sulfúrico concentrado e esterilização superficial em peróxido de hidrogênio 30% e em seguida lavadas com água esterilizada (10x). Ou estas foram somente esterilizadas em peróxido de hidrogênio, pois não possuíam dormência. Posteriormente, foram colocadas em placas de Petri previamente esterilizadas, que continham filtro de papel e algodão umedecido e em seguida levadas a câmara de germinação até a emissão da radícula. Cada vaso de Leonard recebeu quatro plântulas.

Para o preparo do inóculo colônias puras de bactérias foram repicadas em tubos contendo 10 mL de meio 79 semi-sólido (FRED & WAKSMAN, 1928). A fim de acelerar a multiplicação, as bactérias ficaram sob agitação horizontal orbital (150 rpm), a temperatura de 27°C.

Após o crescimento das colônias, que variou de 3 a 7 dias, realizou-se a inoculação. No momento do plantio, adicionou-se com uma pipeta de precisão, 1 mL de inóculo (1×10^8 bactérias mL^{-1}) por plântula. Ao fim da inoculação cobriram-se as plântulas com areia estéril.

Após 15 dias foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma plântula por vaso. Todos os tratamentos receberam quinzenalmente solução nutritiva autoclavada (GRUZSMAN & DÖBEREINER, 1968). Semanalmente as testemunhas nitrogenadas receberam doses de nitrogênio mineral contendo 5 mg de N mL^{-1} .

Os experimentos foram coletados quando os tratamentos apresentaram diferenciação em altura entre tratamentos, sendo selecionada a estirpe que proporcionou o maior incremento de massa seca de parte aérea.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Especificidade hospedeira da planta em relação a estirpe

Na Tabela 1 estão demonstradas as espécies que sofreram o processo de seleção com as respectivas estirpes selecionadas por induzirem o maior incremento de parte aérea seca. A partir destes resultados foi construído um diagrama correlacionando as estirpes com os hospedeiros, mas este diagrama não está disponível neste trabalho.

Os resultados encontrados a partir do diagrama demonstram uma grande especificidade dos hospedeiros pelas estirpes isoladas da própria tribo, o fato que comprova este resultado é a linha diagonal de eficiência na FBN, onde os hospedeiros obtiveram a maior eficiência na FBN

com as estirpes isoladas da própria tribo ou espécie. Esta linha não é uma diagonal perfeita, pois nem sempre a estirpe que foi a mais eficiente para determinado hospedeiro foi isolada do próprio, conferindo assim uma linha tendenciosa, mas muitas das vezes corrompida.

Apesar do pequeno número de espécies testadas em relação ao tamanho da família, pode-se observar que existe uma grande relação entre as estirpes das espécies da mesma sub-família e tribo.

As espécies da tribo *Mimoseae* apresentam alta especificidade, pois só nodularam com as estirpes isoladas da própria tribo, com exceções de: *Microlobius foetidus* e *Leucaena diversifolia*, *Mimosa artemisiana*, *Mimosa pellita* e *Parapiptadenia rígida* que sofreram nodulação com estirpes isoladas da própria tribo mas também com estirpes isoladas de outras tribos. A espécie *Microlobius foetidus* apresentou uma alta eficiência na FBN quando inoculada com estirpes provenientes da tribo *Acacieae*, *Ingae* e *Papilionoideae*, mas quando inoculadas com estirpes isoladas da sua tribo (*Mimoseae*) estas não foram capazes de se associar e promover a nodulação. As estirpes que foram inoculadas nesta espécie (*Microlobius foetidus*) são respectivamente BR 3467 isolada de *Mimosa pellita*, BR 3454 isolada de *Mimosa scabrella*, BR 3466 isolada de *Mimosa tenuiflora* e BR 9002 isolada de *Parapiptadenia pterospema*, todas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* por diversos autores (MOULIN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 1995,2007; VANDAMME *et al.* 2002). Este resultado difere para os resultados encontrados para o restante dos hospedeiros da tribo *Mimoseae*, onde estes na sua maioria só foram capazes de nodular com estirpes isoladas da própria tribo.

As espécies *Acacia angustissima* e *Acacia salicina* pertencentes a tribo *Acacieae* se mostraram diferentes do restante das espécies da tribo, sendo incapazes de se associar com estirpes isoladas da própria tribo, enquanto que outras espécies como *Acacia crassicarpa* nodulou com as estirpes isoladas da tribo e sendo na sua maioria muito eficiente.

Dentre a sub-família *Papilionoideae* duas espécies pertencentes a tribo *Robinieae* se mostraram muito específicas. Estas espécies foram *Sesbania exasperata* e *Sesbania sesban*, sendo que para a primeira espécie esta foi capaz de nodular e ser muito eficiente na FBN somente com duas estirpes dentre as 22 estirpes testadas na espécie e para a segunda espécie esta foi capaz de nodular e ser muito eficiente na FBN somente com uma estirpe, dentre as 29 testadas.

Os hospedeiros das tribos *Phaseoleae*, *Milletieae*, *Acacieae* e *Ingae* apresentam uma grande promiscuidade à estirpes de rizóbio de varias tribos, sendo a promiscuidade das tribos *Phaseoleae* e *Milletieae* em maior grau que as demais. Este fato pode estar relacionado à evolução dentro da família *Leguminosae*, onde são consideradas entre as mais “evoluídas”.

Para alguns hospedeiros foi testado um pequeno número estirpes não podendo assim avaliar a especificidade ou promiscuidade tanto do hospedeiro ou da estirpe.

4.2 Especificidade hospedeira da estirpe em relação a planta

A maioria das estirpes foram isoladas de espécies ocorrentes no Brasil, com exceção da estirpe denominada de Godim que foi isolada de *Sesbania sesban* onde foi utilizado o solo da região de Cabo Verde na África. Esta espécie só foi capaz de nodular com o rizóbio nativo presente no solo da região de origem, demonstrando uma alta especificidade tanto da estirpe quanto do hospedeiro.

Os locais de coleta das estirpes se deram em sua maioria no Brasil, se concentrando na região sudeste, em destaque para cidade de Seropédica-RJ onde está localizada a Embrapa Agrobiologia que detém um grande número de pesquisas entorno das Leguminosas florestais.

O maior número de estirpe foi isolado de hospedeiros pertencentes a tribo *Mimoseae*, estes isolados estão sendo identificados por diversos autores como pertencentes ao grupo das

betaproteobactérias em específico do gênero *Burkholderia* (MOULIN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 1995,2007; VANDAMME *et al.* 2002). Estes resultados demonstram que este gênero é altamente específico, variado e difundido para as Mimosas das regiões do continente Americano [Brasil, Costa Rica, Guiana francesa, México, Panamá, Venezuela, E.U.A (Texas)] e de Taiwan (CHEN *et al.*, 2003; 2005; BARRETT & PARKER, 2005,; 2006; ANDAM *et al.*,2007).

As estirpes isoladas dos hospedeiros da tribo Mimoseae quando testadas a sua capacidade de associação com hospedeiros de tribos distintas se mostraram incapazes de promover a nodulação e/ou serem pouco eficientes na FBN, no entanto quando em associação com macrossibiontes da própria tribo estas estirpes se mostraram muito eficientes na FBN.

A exemplo temos a BR 3454 isolada de *Mimosa scabrella* Benth. sendo testada em 34 hospedeiro, onde que para os hospedeiros provenientes de espécies distintas das Mimosas esta não foi capaz de promover a nodulação e/ou nodular e ser pouco eficiente, com exceção da espécie *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. que dentre as mimosas testadas não foi capaz de se associar. Este fato comprova a especificidade hospedeira das estirpes oriundas dos hospedeiros da tribo Mimoseae, pelos mesmos (MENNA *et al.*,2006; BINDE *et al.*, 2009).

As estirpes BR 8205, BR 8801, BR 8601, BR 5004 e BR 3804 isoladas de hospedeiros pertencentes as tribos *Brongniartieae*, *Robineae*, *Sophororeae*, *Caesalpinieae* e *Cassieae* respectivamente se demonstraram uma maior eficiência quando associadas aos hospedeiros da sub-família *Papilionoideae*, em seguida um menor grau de eficiência quando associadas as tribos *Acacieae* e *Ingae*, já quando associadas aos hospedeiros da tribo *Mimoseae* estas na sua maioria não foram capazes de promover a nodulação.

As estirpes isoladas das tribos *Acacieae* e *Ingae* demonstraram-se como muito promiscua aos hospedeiros das tribos *Acacieae*, *Ingae*, *Desmodieae*, *Phaseoleae* e *Milletieae*. No entanto os hospedeiros *Acacia angustissima* e *Acacia salicina* não nodularam com a maioria das estirpes testadas isoladas da mesma tribo dos hospedeiros.

E as estirpes isoladas de *Samanea saman* BR6205, *Falcataria molucanna* BR 5609, *Acacia auriculiformis* BR3609, apresentaram uma grande abrangência de hospedeiros, sendo que estas estirpes foram mais eficientes para 15 espécies dentre a família Leguminosae.

Tabela 1: Espécies leguminosas com suas respectivas estirpes que promoveram o maior incremento de parte aérea seca.

Leguminosa Florestal	Ano de implantação do experimento	Qtde de N aplicado nas testemunhas nitrogenadas (mg)	Estirpes selecionada por induzir o maior PSPA¹
<i>Acacia angustissima</i> (Mill.) Kuntze	1991	540	BR 3610
<i>Acacia auriculiformis</i> Benth	1985	180	BR 3610
<i>Acacia crassicarpa</i> Benth	1996	130	BR 5004
<i>Acacia holosericea</i> G. Don	1994	70	BR 4406
<i>Acacia mangium</i> Willd.	1994	60	BR 3617
<i>Acacia mearnsii</i> De Wild	1984	120	BR 3608
<i>Acacia melanoxylon</i> R. Br.	1998	120	BR 3634
<i>Acacia podalyriifolia</i> G. Don	1984	210	BR 3611
<i>Acacia salicina</i> Lindl.	1991	202	BR 3624
<i>Acacia saligna</i> (Labill.) Wendl	1991	175	BR 8601
<i>Acosmium bijugum</i> (Vogel) Yakovlev	1993	140	BR 827
<i>Aeschynomene fluminensis</i> Vell.	1995	40	BR 9002
<i>Albizia guachapele</i> (Kunth) Dugand	1989	240	BR 6205
<i>Albizia lebbbeck</i> (L.) Benth.	1999	300	BR 5611
<i>Albizia procera</i> (Roxb.) Benth	1997	85	BR 5610
<i>Balizia pedicelaris</i> (DC.) Barneby & Grimes.	1985	200	BR 6815
<i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth	1983	370	BR 8603
<i>Calliandra macrocalyx</i> Harms	2002	215	BR 4305
<i>Calliandra surinamensis</i> Benth.	1985	200	BR 4301
<i>Chamaecrista cathartica</i> (Mart.) H.S. Irwin & Barneby	2002	80	BR 3815
<i>Chamaecrista ensiformis</i> (Vell.) H.S. Irwin & Barneby	1984	400	BR 3804
<i>Chamaecrista flexuosa</i> (L.) Greene	2001	70	BR 3804
<i>Clitoria fairchildiana</i> R.A. Howard	1984	70	BR 8007
<i>Dalbergia nigra</i> (Vell.) Benth	1983	410	BR 8404
<i>Desmodium cf. triflorum</i> (L.) DC	2007	275	BR 6009
<i>Desmodium leiocarpum</i> (Spreng.) G.	2007	495	BR 2216

Don			
<i>Dimorphandra jorgei</i> M.F.Silva	1983	100	BR 5004
<i>Diphysa americana</i> (Mill.) M. Sousa	1996	75	BR 5004
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong	1984	100	BR 4405
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq.) Griseb.	1990	420	BR 4406
<i>Erythrina falcata</i> Benth.	1996	70	BR 5609
<i>Erythrina fusca</i> Lour.	1995	60	BR 5609
<i>Erythrina speciosa</i> Andrews	1989	182	BR 3609
<i>Erythrina variegata</i> L.	1982	200	BR 3611
<i>Erythrina verna</i> Vell.	1997	80	BR 5401
<i>Falcataria moluccana</i> (Miq.) Barneby & J.W. Grimes	1983	290	BR 5611
<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Walp.	1983	150	BR 8801
<i>Hydrochorea corymbosa</i> (Rich.) Barneby & J.W. Grimes	1997	45	BR 5004
<i>Inga semialata</i> (Vell.) C. Mart.	1990	590	BR 6609
<i>Inga thibaudiana</i> DC. (SMF 1150)	1996	55	BR 6610
<i>Inga thibaudiana</i> DC. (SMF 1153)	1996	73	BR 6610
<i>Leucaena diversifolia</i> (Schltdl.) Benth.	1992	280	BR 8801
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	1983	150	BR 824
<i>Lonchocarpus costatus</i> Benth.	1983	260	BR 6010
<i>Microlobius foetidus</i> (Jacq.) M. Sousa & G. Andrade	1997	55	BR 6205
<i>Mimosa acutistipula</i> Benth.	1997	250	BR 3432
<i>Mimosa artemisiana</i> Heringer & Paula	1996	200	BR 3454
<i>Mimosa bimucronata</i> (DC.) Kuntze	1985	230	BR 3461
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.	1982	310	BR 3405
<i>Mimosa camporum</i> Benth.	1995	120	BR 3469
<i>Mimosa cf. extensa</i> Benth.	2006	97	BR 3509
<i>Mimosa flocculosa</i> Burkart	1984	120	BR 3463
<i>Mimosa pellita</i> Willd.	1995	60	BR 3467

<i>Mimosa pigra</i> L.	2006	200	BR 3462
<i>Mimosa quadrivalvis</i> L.	2006	140	BR 3505
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	1992	50	BR 3454
<i>Mimosa setosa</i> Benth.	2006	150	BR 3506
<i>Mimosa somnians</i> Willd.	2004	70	BR 4305
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	1992	470	BR 3466
<i>Mimosa velloziana</i> Mart.	2006	150	BR 3515
<i>Ormosia nitida</i> Vogel	1984	360	BR 4103
<i>Parapiptadenia pterosperma</i> (Benth.) Brenan	1983	270	BR 9004
<i>Parapiptadenia rigida</i> (Benth.) Brenan	1990	160	BR 9002
<i>Piptadenia adiantoides</i> (Spreng.) J.F. Macbr.	2007	300	BR 4830
<i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) J.F. Macbr.	1984	320	BR 4816
<i>Poecilanthe parviflora</i> Benth.	1985	220	BR8206
<i>Prosopis chilensis</i> (Molina) Stuntz	1991	300	BR 4007
<i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC.	1983	120	BR 4007
<i>Pterocarpus erinaceus</i> Poir.	1996	210	BR 3609
<i>Pterocarpus indicus</i> Willd.	1996	45	BR 8651
<i>Pterocarpus lucens</i> Guill. & Perr.	1996	35	BR 8653
<i>Samanea saman</i> (Jacq.) Merr.	1984	220	BR 6205
<i>Sclerolobium paniculatum</i> Vogel	1991	100	BR 6009
<i>Sesbania exasperata</i> Kunth	1995	80	BR 3630
<i>Sesbania sesban</i> (L.) Merr	1991	255	GODIM
<i>Sesbania virgata</i> (Cav.) Pers.	1981	100	BR 5404
<i>Stryphnodendron guianense</i> (Aubl.) Benth.	1997	195	BR 8801
<i>Tephrosia adunca</i> Benth.	2007	825	BR 3628
<i>Tephrosia sinapou</i> (Buc'hoz) A. Chev.	1994	120	BR 5610
<i>Vachellia farnesiana</i> (L.) Willd	1998	150	BR 3632

PSPA¹:Peso seco de parte aérea

5. CONCLUSÕES

Existe uma grande especificidade entre as bactérias e as espécies de leguminosas. A grande maioria das espécies da tribo *Mimoseae* nodulam apenas com bactérias isoladas do próprio gênero. As tribos *Phaseoleae*, *Milletieae*, *Acacieae* e *Ingeae* são muito promiscuas em relação as bactérias testadas, principalmente as estirpes isoladas das tribos *Acacieae* e *Ingae*. Algumas estirpes como BR6205, BR5609 e BR3609 são eficientes na fixação biológica de nitrogênio para mais de 15 espécies.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ANDAM, C.P., MONDO, S.J., and PARKER, M.A. **Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texan and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts.** *Appl Environ Microbiol* **73**: 4686–4690, 2007.
- BALACHANDAR, D.; RAJA, P.; KUMAR, K.; SUNDARAM, S.P. Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, v.2, n.2, p.49-57, 2007.
- BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. **Prevalence of *Burkholderia* sp., nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado island Panama.** *Systematic and Applied Microbiology*, **28**, 57–65, 2005.
- BARRETT, C.F., AND PARKER, M.A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1198–1206, 2006.
- BINDE, D.R.; MENNA, P.; BANGEL, E.V.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. **Rep-PCR fingerringing and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, Germany, (In Press, published online ahead of print, 2009 Mar 17), 2009.
- BHUVANESWARI, T.V.; BHAGWAT, A.A.; BAUER, W.D. **Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia.** *Plant Physiology*, v.68, p.1144-1149, 1981.
- CADISCH, G., SCHUNKE, R.M. and GILLER, K.E. **Nitrogen cycling in a pure grass and a grass-legume mixture on a red latosol in Brazil.** *Tropical Grasslands*, **28**: 43-52, 1994.
- CORBY, H.D.L. **Types of rhizobial nodules and their distribution among the Leguminosae.** *Kirkia*, **13**: 53-123, 1988.
- CHADA, S.S.; CAMPELLO, E.F.C.; DE FARIA, S.M. **Sucessão vegetal em uma encosta reflorestada com leguminosas arbóreas em Angra dos Reis, RJ.** *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.28, n.6, p.801-809, 2004.
- CHEN WX, Li GS, Qi YL *et al.* ***Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root of *Astragalus sinucus*.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, **41**, 275–280, 1991.
- CHEN W, WANG E, WANG S *et al.* **Characteristic of *Rhizobium tianshanense* sp. nov. a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**, 153–159, 1995.

- CHEN WM, LAEVENS S, LEE TM *et al.* ***Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient.** International Journal of Systematic Bacteriology, **51**, 1729–1735, 2001.
- CHEN WM, MOULIN L, BONTEMPS C *et al.* **Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in nature.** Journal of Bacteriology, **185**, 7266–7272, 2003.
- CHEN, W. M., DE FARIA, S. M., STRALIOTTO, R., PITARD, R. M., SIMOES- ARAUJO, J. L., CHOU, J. H., CHOU, Y. J., BARRIOS, E., PRESCOTT, A. R. & other authors **Proof that Burkholderia strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America.** Appl Environ Microbiol **71**, 7461–7471, 2005.
- CHEN, W-M; de FARIA, S. M.; JAMES, E.K.B; ELLIOTT, G.N; SPRENT, J. L.; VANDAMME, P. **Burkholderis nodosa sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. **57**, p. 1055-1059, 2007.
- DEMEZAS, D. H.; REARDON, T. B.; STRAIN, S. R.; WATSON, J. M.; GIBSON, A. **H.Diversity and genetic structure of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolated from *Trifolium subterraneum* L.** Molecular Ecology, v. **4**, n. **2**, p. 209-220. 1995.
- DOBEREINER, J. **Inoculação cruzada e eficiência na simbiose de leguminosas tropicais.** In: Dobereiner, J.; Eira, P.A. da.; Franco, A.A. & Campelo, A.B.P., Eds. As leguminosas na agricultura tropical. p.181-192, 1971.
- DUHOUX, E. **Ontogenese des nodules caulinaires de *Sesbania rostrata* (Légumineuses).** Canadian Journal of Botany, v.62, p.982-994, 1984.
- de FARIA, S.M.; SUTHERLAND, J.M.; SPRENT, J.F. **A new type of infected cell in root nodules of *Andira* spp (Leguminosae).** Plant Science, v.45, p.143-147, 1986.
- de FARIA, S.M.; HAY, G.T.; SPRENT, J.L. **Entry of rhizobial into roots of *Mimosa scabrella* Benth occurs between epidermal cells.** Journal of General Microbiology, v.134, p.2291-2296, 1988.
- de FARIA, S.M.; OLIVARES, F.L. de; LIMA, H.C.; MELO, R.B.; XAVIER, R. **Nodulação em florestais, especificidade hospedeira e as implicações na sistemática de Leguminosae.** In: Reunião Brasileira Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 23., Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 7., Simposio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 5., e Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2. FertiBio, 98. Anais. Caxambu, UFLA, cap.V. p.667-686, 1999.
- de FARIA, S.M. & GUEDES, R.E. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais (aproximação 1999).** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 4p. (Embrapa Agrobiologia. Recomendação Técnica, 5), 1999.

- de FARIA, S.M.; SILVA, M.G.; GRAIG, J.; E DIAS S.L.; LIMA, H.C.; NARA, M. **Revegetação com espécies arbóreas fixadoras de nitrogênio em taludes de exploração de ferro na Samarco minerações, Mariana MG**, In: Água e biodiversidade. Palestras... Belo Horizonte 521-522.p. SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 5., Belo Horizonte, MG. 2002.
- FRANCO, A. A. et al. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: Embrapa CNPBS, 8 p. 1992 (Embrapa . CNPBS. Comunicado Técnico, 9).
- FRANCO, A.A.; de FARIA, S.M. **The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics**. Soil Biology Biochemistry 29: 897-903, 1997.
- FRED, E. B. & WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganisms of the soil**. New York: Mcgraw-Hill Book Company, New York, 145p., 1928.
- FURTINI NETO, A.E.; SIQUEIRA, J.O.; CURTI, N.; MOREIRA, F.M.S. **Fertilização em reflorestamento com espécies nativas**. In: GONCALVES, J.L. DE m.; BENEDETTI, V. (Ed.). Nutrição e fertilização florestal. Piracicaba: IPEF, p.329-331, 2000.
- GRUZMAN, I. & DÖEBEREINER, J. **Reunião Latino Americana sobre Inoculantes para Leguminosas**. Anais... Porto Alegre: UFRGS, p. 84,1968.
- de LAJUDIE P, WILLEMS A, POT B *et al.* **Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. nov., *Sinorhizobium sahelii* sp. nov. and *Sinorhizobium teranga* sp. nov.** International Journal of Systematic Bacteriology, 44, 715–733, 1994.
- de LAJUDIE P, LAURENT-FUELELE E, WILLEMS A *et al.* ***Allorhizobium undicolla* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal**. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 1277–1290, 1998.
- LEWIS, G.P. **Legumes of Bahia**. Royal Botanic Gardens, Kew.p. 396, 1987.
- LONG, S. R. **Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective**. The Plant Cell, v. 8, n.10, 1996.
- HARTWIG, U. **The regulation of symbiotic N₂ Fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level**. *Perspectives in plant Ecology, evolution and systematics*, v. 1, p. 92-120, 1998.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; CRISPINO, C.C.; MORAES, J.Z.; SIBALDELLI, R.N.R.; MENDES, I.C.; ARIHARA, J. **Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and of N fertilizer to grain yield**. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v.86, p.927-939, 2006.

- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. ***Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp trees.** International Journal of Systematic Bacteriology, v.41, p.417- 426, 1991.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTINEZ-ROMERO, E. **Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants.** Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart, v.29, p.315-332, 2006.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, O.S. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**, 2. ed. Atual. e Ampliada, Lavras, Editora UFLA, p. 729, 2006.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. **Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria.** Nature 411:948-950, 2001.
- PAFFETTI, D.; DAGUIN, F.; FANCELLI, S.; GNOCCHI, S.; LIPPI, F.; SCOTTI, C.; BAZZICALUPO, M. **Influence of plant genotype on the selection of nodulating *Sinorhizobium meliloti* strains by *Medicago sativa*.** Antonie van Leeuwenhoek, v. 73, p. 3–8, 1998.
- PETERS, N.K. & LONG, S.R. **Alfafa root exudates and compounds, which promote or inhibit of *R. meliloti* nodulation genes.** Plant Physiology, v.88, p. 396-110, 1988.
- PUEPPKE, S. G.; BROUGHTON, W. J. ***Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges.** Molecular Plant Microbe Interactions, v. 12, p. 293-318, 1999.
- SMITH, K. P.; GOODMAN, R. M. **Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes.** Annual Reviews of Phytopathology, v. 37, p. 473–491, 1999.
- SY A, GIRAUD E, JOURAND P *et al.* **Methylotrophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes.** Journal of Bacteriology, 183, 214–220, 2001.
- RIVAS R, WILLEMS A, SUBBA-Rao NS *et al.* **Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India.** Systematic and Applied Microbiology, 26, 47–53, 2003.
- SEGOVIA L, YOUNG JPW, MARTINEZ-ROMERO E. **Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseolis type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov.** International Journal of Systematic Bacteriology, 43, 374–377, 1993.
- TAN ZY, KAN FL, PENG GX *et al.* ***Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China.** International Journal of Systematic Bacteriology, 51, 909–914, 2001.

- THOMAS, R.J. **The role of the legume in the nitrogen cycle of productive and sustainable pastures.** Grass For. Sci., 47: 133-142, 1992.
- TOLEDO, J.M. **Pasture development for cattle production in the major ecosystem of the tropical American lowlands.** In: International Grassland Congress, 15, 1985. Proceedings... Kyoto, Japan, 1985. p. 74- 78.
- TOLEDO I, LLORET L, MARTINEZ-ROMERO E ***Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico.** Systematic and Applied Microbiology, 26, 54–64, 2003.
- TRUJILLO ME, WILLEMS A, ABRIL A *et al.* **Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov.** Applied and Environmental Microbiology, 71, 1318–1327, 2005.
- VALVERDE A, VELÁZQUEZ E, FERNÁNDEZ-SANTOS F *et al.* ***Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology Papers in press, doi: 10.1099/ijms.0.63551–0, 2005.
- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; de VOS, P.; WILLEMS, A. ***Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes.** Systematic and Applied Microbiology, 25, 507–512, 2002.
- Van BERKUM P, EARDLY BD **The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*.** Applied and Environmental Microbiology, 68, 1132–1136, 2002.
- VELAZQUEZ E, IGUAL JM, WILLEMS A *et al.* ***Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco arid region (Argentina).** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 1011–1021, 2001.
- VIEIRA, A.R.R.; FEISTAUER, D.; SILVA, V.P da. **Adaptação de espécies arbóreas nativas em um sistema agrossilvicultural, submetidas a extremos climáticos de geada de Florianópolis.** Revista Arvore, Viçosa, v.27,n.5, p.627-634, 2003.
- VINCENT, J. M. **A Manual for de practical study of root-nodule bactéria.** london: international biological programme HANDBOOK, 15, 1970.
- WANG ET, TAN ZY, WILLEMS A *et al.* ***Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 1687–1693, 2002.
- WANG ET, VAN BERKUM P, BEENE D *et al.* ***Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*.** International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 687–699, 1998.

- WEI GH, WANG ET, TAN ZY, ZHU ME, CHEN WX *Rhizobium indigofera* spp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 2231–2239, 2002.
- WHITNEY, A.S.; KANEHIRO, Y.; SHERMAN, G.D. Nitrogen relationships of three tropical forage legumes in pure stands and in grass mixtures. Agron. J., v. 59, n.1, p. 47 – 50, 1967.
- WILLEMS A, DOIGNON-BOURCIER F, COOPMAN R *et al.* AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. Systematic and Applied Microbiology, 23, 137–147, 2000.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. Microbiological Reviews, v. 51, p. 221-271, 1987.
- WORDELL FILHO, J.A.; ROME, E.; GONÇALVES, P.A.S.; DEBARBA, J.F.; BOFF, P.; THOMAZELLI, L.F. Manejo Fitossanitário na Cultura da Cebola. Florianópolis: Epagri, p.226, 2006.
- YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction sequencing of a 16S rRNA gene segment. J. Bacteriol., v.173, p.2271-2277, 1991.
- YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Ed.). Biological nitrogen fixation. New York: Chapman & hall, p.43-86, 1992.
- YOUNG, J. P. W. Phylogeny and taxonomy of rhizobial. Plant and Soil, p.186: 45-52, 1996.
- XU LM, GE C, CUI Z, LI J, FAN H *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 45, 706–711, 1995.
- ZILLI, J.É.; VALISHESKI, R.R.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of northeastern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology., v.35, p.281-287, 2004.