



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA,
GENOTÍPICA E SIMBIÓTICA DE
Azorhizobium sp. DE *Sesbania virgata* (Caz.) Pers.**

YANÊ CARVALHO

2002

52949
MFJ-34499

YANÊ CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E
SIMBIÓTICA DE *Azorhizobium* sp. DE
Sesbania virgata (Caz.) Pers.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof^a. Fátima M. S. Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2002



Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Carvalho, Yanê

Caracterizaçãofenotípica, genotípica e simbiótica de *Azorhizobium* sp.
de *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. / -- Lavras : UFLA, 2002.

89 p. : il.

Orientadora: Palma M. S. Moreira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia

1. *Azorhizobium*
2. *Sesbania virgata*
3. Fixação biológica de nitrogênio
4. Marcadores moleculares. I. Universidade Federal de Lavras. II Título.

CDD-583.322

-633.3

YANÊ CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E
SIMBIÓTICA DE *Azorhizobium* sp. DE
Sesbania virgata (Caz.) Pers.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2002

Dr Sérgio Miana de Faria.

Embrapa-Agrobiologia

Prof. Eustáquio Sousa Dias

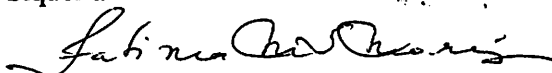
UFLA

Prof. Janice Guedes de Carvalho

UFLA

Prof. José Oswaldo Siqueira

UFLA



Profª. Fátima M. S. Moreira

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Para meu querido Billy.

*Durante as tempestades,
os carvalhos, ao contrário dos bambus,
se quebram, mas não se dobram.*

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	i
GENNERAL ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução geral.....	02
2 Referencial teórico.....	02
2.1 Simbiose rizóbio-leguminosa.....	02
2.2 Taxonomia atual dos rizóbios.....	05
2.3 Metodologias para a identificação e caracterização de rizóbios.....	08
2.4 O gênero de leguminosa hospedeira <i>Sesbania</i>	17
2.5 Simbiose entre rizóbios e <i>Sesbania spp.</i>	20
3 Referências bibliográficas.....	22
CAPÍTULO 2: Caracterização fenotípica e genotípica de estirpes de <i>Azorhizobium sp. nov.</i>	33
Resumo.....	33
Abstract.....	34
1 Introdução.....	35
2 Material e Métodos.....	36
2.1 Estirpes de rizóbio.....	36
2.2 Testes morfológicos.....	36
2.3 Utilização de fontes de carbono.....	36
2.4. Fixação de N ₂ em meio de cultura.....	38
2.5 Tolerância a sais.....	38
2.6 Efeito dediferentes temperaturas e valores de pH.....	39
2.7 Perfil de proteínas totais (SDS-PAGE).....	39
2.8 Amplificação do genes rDNA 16S e da Região rDNA16S-23S.....	39

2.9 Análise de perfis de restrição do gene rDNA 16S e Região 16S-23S	
rDNA	40
2.10 Sequenciamento do gene rDNA 16S	41
3 Resultados e Discussão.....	42
3.1 Características fenotípicas.....	42
3.2 Características genotípicas.....	50
4 Conclusões	58
5 Referências Bibliográficas	59
6 Anexo.....	63
CAPÍTULO 3 : Especificidade dos simbiontes <i>Sesbania virgata</i> e	
<i>Azorhizobium</i> sp nov.	72
Resumo	72
Abstract.....	73
1 Introdução	74
2 Material e Métodos.....	75
3 Resultados e Discussão.....	79
4 Conclusões	86
5 Referências Bibliográficas	87

RESUMO GERAL

CARVALHO, Y. Caracterização fenotípica, genotípica e simbiótica de *Azorhizobium* sp. de *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. Lavras: UFLA, 2002. 89 p. (Tese de - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)*

Trinta estirpes de rizóbio com características culturais em meio de cultura YMA, similares a *Azorhizobium caulinodans* (alcalinização e pouca produção de goma) isoladas da leguminosa nativa *Sesbania virgata* em diferentes locais do sudeste do Brasil (Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro) foram estudados. Características fenotípicas e genotípicas foram investigadas, incluindo testes fisiológicos, perfil de proteínas totais, perfis de restrição do gene rDNA 16S e espaço intergênico (rDNA 16S-23S) amplificados e sequenciamento total da bases do rDNA 16S. Constatou-se a fixação de nitrogênio em meio de cultura livre de N (sólido e semi-sólido) para os isolados de *Azorhizobium* sp. nov., porém com atividade da nitrogenase menor que para a estirpe ORS 571^T de *Azorhizobium caulinodans*. O perfil de proteínas totais foi relativamente similar para as 30 estirpes, mas pequenas diferenças as discriminaram em tres grupos. As análises de RFLP mostraram diferenças entre a espécie proposta e *Azorhizobium caulinodans*. O sequenciamento total do 16S rDNA encontrou 29 bases diferentes em BR 5401^T de *Azorhizobium* sp em relação à seqüência mais similar publicada ORS 571^T *Azorhizobium caulinodans*. Testes de infecção em plantas para estudar as relações simbióticas entre *Azorhizobium* sp. BR 5401^T, e *Sesbania virgata* (Caz.) Pers com outros parceiros foram realizados em vasos de Leonard. Quando diversa espécies de leguminosas foram inoculadas com BR 5401^T somente *S. virgata* nodulou eficientemente. Quando *Sesbania virgata* foi inoculada com estirpes tipo ou referência de espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium* e *Azorhizobium*, a nodulação ocorreu somente com a inoculação da estirpe homologa BR 5401^T. Assim, demonstrou-se que este grupo estirpes é fenotipicamente e filogeneticamente diferente de *Azorhizobium caulinodans* e outras espécies de rizóbio atualmente descritas e possui relação simbiótica altamente especifica quanto à fixação de nitrogênio com *Sesbania virgata*.

*Comitê Orientador : Prof^a Fátima M.S. Moreira – UFLA (Orientadora).

GENERAL ABSTRACT

CARVALHO, Y. Phenotypic, genotypic and symbiotic characterization of *Azorhizobium* sp of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. Lavras: UFLA, 2002. 89 p. (Thesis - Doctorate in Soil and Plant Nutrition)*

Thirty rhizobia strains with cultural characteristics on YMA similar to *Azorhizobium caulinodans* (alkalinization, few EPS “extracellular polysaccharide production”) isolated from the native leguminous species *Sesbania virgata* in different regions at south east Brazil (Minas Gerais and Rio de Janeiro states) were studied. Genetic, phenotypic and symbiotic characteristics were performed, including cultural and physiological tests, polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of total proteins, restriction fragment length polymorphism (RFLP) of Polymerase Chain reaction (PCR) amplified 16S rDNA and intergenic space between 16S and 23S rDNA and the total sequence of bases of 16S rDNA. In All isolates of *Azorhizobium* sp. were able to fix nitrogen in the free-living state in solid and semi-solid medium. The nitrogenase activity measured by acetylene reduction activity was smaller than that of the strain ORS 571^T of *Azorhizobium caulinodans*. SDS-PAGE of total proteins of all strains were relatively similar, but, small differences discriminated these strains into three groups. Analysis of RFLP showed differences between *Azorhizobium* sp. and *Azorhizobium caulinodans*. Total sequence of 16S rDNA shows differences in twenty nine different bases in BR 5401^T of *Azorhizobium* sp. in relation to the most similar published sequence, ORS 571^T *Azorhizobium caulinodans*. Plant infection tests to study the symbiotic relationships among *Azorhizobium* sp. nov BR 5401^T and *Sesbania virgata* (Caz.) Pers with others partners were carried out in Leonard jars. When diverse legume species were inoculated with BR 5401^T, only *S. virgata* nodulated efficiently. When *Sesbania virgata* was inoculated with type or reference strains of species belonging to the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium* and *Azorhizobium*, nodulation occurred only with the inoculation of the homologue strain BR 5401^T. It was demonstrated that this group is phenotypically and phylogenetically different from *Azorhizobium caulinodans* and other rhizobia species described. It was also found that there is a high specific relationship, mainly concerning to nitrogen fixation, between *Azorhizobium* sp. BR 5401^T and *Sesbania virgata*.

*Guidance Committee: Prof^a Fátima M.S. Moreira – UFLA (Major Professor).

CAPITULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Até 1988, as bactérias que formam simbiose com Leguminosas fixando nitrogênio pertenciam a dois gêneros, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Até que Dreyfus et al. (1988), através de análises fenotípicas, incluindo perfil de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e genéticas como composição de bases do DNA (conteúdo de C + G) e hibridização DNA-rRNA, descreveram um novo gênero, *Azorhizobium*, com uma única espécie, *A. caulinodans*, para rizóbios que nodulavam o caule de *Sesbania rostrata*,

Atualmente, são descritas mais de 30 espécies de rizóbios, distribuídas em 5 gêneros na sua maioria provenientes de leguminosas temperadas produtoras de grão. Nos últimos 10 anos, árvores tropicais passaram a ser investigadas e ao mesmo tempo, o advento dos métodos moleculares que culminaram com o sequenciamento do gene rDNA 16S permitiu a investigação mais profunda na taxonomia dos rizóbios, criando novos gêneros, espécies e biovars.

Ao longo deste percurso a simbiose rizóbio-leguminosa foi investigada e diversas plantas pertencentes as três subfamílias *Caesalpinioideae*, *Papilionoideae* e *Mimosoideae* da família *Leguminosae* foram examinadas quanto a sua nodulação, chegando atualmente a 24% de um total estimado em 19.700 espécies (Faria et al.,1999). Dentre os rizóbios que nodulam as leguminosas já pesquisadas, nenhuma espécie foi acrescentada ao gênero *Azorhizobium*.

Sesbania virgata (syn. *Sesbania marginata*) é uma leguminosa arbustiva adaptada a condições de alagamento que ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste do Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai (Pott e Pott, 1994). Esta espécie apresenta rápido crescimento o que a torna potencialmente utilizável para diversos usos como adubação verde, cercas vivas, lenha, entre outros, além do reflorestamento de margens de cursos de água. Os primeiros rizóbios nodulando esta espécie foram isolados por Campelo (1976).

Posteriormente, estes rizóbios foram identificados através de análises de de proteínas totais por Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), (Moreira et al.,1993), padrões de isoenzimas- MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) (Moreira et al.,1994) e seqüenciamento parcial do rDNA 16S, como pertencentes ao gênero *Azorhizobium*, porém com diferenças significativas entre a única espécie - *A. caulinodans* (Dreyfus et al., 1988) que indicavam tratar-se de uma nova espécie do gênero (Moreira et. al., 1998). A estirpe BR 5401(=Sm1), isolada por Campelo, foi indicada como a estirpe tipo desta nova espécie (Moreira et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi realizar novos testes de valor taxonômico no grupo de estirpes isoladas de *S. virgata* e verificar se estas são similares em características genéticas, fenotípicas e simbióticas a BR 5401, podendo assim corroborar a proposição de uma nova espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Simbiose rizóbio-leguminosa

A fixação de nitrogênio pela simbiose rizóbio-leguminosa é considerada a maior fonte de fixação por via biológica e também, o processo aplicado na agricultura mais estudado e explorado. Rizóbios, os diazotróficos mais

conhecidos são bactérias capazes de formar nódulos radiculares e em alguns casos caulinares em plantas da família *Ulmaceae* e principalmente *Leguminosae*. Esta simbiose é responsável por uma substancial parte do fluxo global de nitrogênio atmosférico fixado nas formas de amônia, nitrato e compostos orgânicos (Kahindi et al., 1997).

A família *Leguminosae* compreende árvores, arbustos, ervas e lianas, espécies de importância econômica em diversas áreas, como silvicultura, agricultura, farmacêutica, entre outras. Esta família é um dos grupos de vegetais superiores mais importantes e compreende três sub-famílias: *Caesalpinioideae* (cerca de 2000 espécies), *Papilionoideae* (cerca de 12.000 espécies) e *Mimosoideae* (cerca de 3000 espécies), totalizando mais de 19.700 espécies. Entre as *Papilionoideae* foram investigadas 24% do total de espécies e 95% nodulavam, para as subfamílias *Mimosoideae* e *Caesalpinioideae* somente 19% do total de espécies foram pesquisadas quanto a nodulação, sendo que destas, 90% das espécies de *Mimosoideae* e somente 24 % das espécies de *Caesalpinioideae* apresentaram nódulos (Faria et al., 1999).

Até o momento mais de 30 espécies de rizóbios foram descritas, entre espécies e biovares, pertencendo a 5 gêneros (Tabela 1), mas esta classificação está longe de ser representativa. Embora existam leguminosas que não nodulam, principalmente na subfamília *Caesalpinioideae*, o número real de espécies de rizóbio deve ser maior que o atual. Uma explicação para esta diferença entre o número de rizóbios e o número de leguminosas noduladoras pode ser o limitado número de espécies de leguminosas estudadas até hoje quanto a esta associação. Somente 19 a 24% das 19.700 leguminosas foram examinadas quanto a sua capacidade de nodular. Além disso, a maioria dos estudos sobre nodulação era direcionada quase que exclusivamente as culturas agrícolas de importância econômica, como soja, feijão, ervilha, alfafa e trevo, entre outras espécies

restritas a poucos grupos de divergência da família *Papilionoideae* (Graham, 1976; Moreira et al., 1998).

TABELA 1. Rizóbios atualmente conhecidos e hospedeira original (adaptado de Siqueira e Moreira, 2001)

Gênero	Espécie
<i>Rhizobium</i> (Frank, 1889)	<i>R. leguminosarum</i> (Frank, 1889) biovars phaseoli, trifolii, viciae (Jordan, 1984)
	<i>R. tropici</i> (Martinez-Romero et al., 1991)
	<i>R. etli</i> (Segovia et al., 1993)
	<i>R. giardinii</i> biovar giardinii e phaseoli (Amarger et al., 1997)
	<i>R. gallicum</i> biovar gallicum e phaseoli (Amarger et al. 1997)
	<i>R. hainanense</i> (Chen et al., 1997)
	<i>R. mongolense</i> (Van Berkum et al., 1998)
	<i>R. huautlense</i> (Wang et al., 1999b)
Não definido	<i>R. undicola</i> (De Lajudie et al., 1998b)
	<i>R. galegae</i> biovar orientalis, officinalis (Lindstrom, 1989)
<i>Sinorhizobium</i> (De Lajudie et al. 1994)	<i>S. meliloti</i> (De Lajudie et al. 1994)
	<i>S. fredii</i> quimovar siensis, fredii (Scholla e Elkan, 1984; Chen et al., 1988; De Lajudie et al. 1994)
	<i>S. saheli</i> (De Lajudie et al. 1994)
	<i>S. teranga</i> biovar acaciae (De Lajudie et al., 1994;) biovar sesbaniae (Boivin et al., 1997)
	<i>S. medicae</i> (Rome et al., 1996)
	<i>S. arboris</i> (Nick et al., 1998)
<i>Mezorhizobium</i> (Jarvis et al., 1982)	<i>S. kostiense</i> (Nick et al., 1998)
	<i>M. loti</i> (Jarvis et al., 1982; Jarvis et al., 1997)
	<i>M. huakuii</i> (Chen et al., 1991; Jarvis et al., 1997)
	<i>M. ciceri</i> (Nour et al., 1994; Jarvis et al., 1997)
	<i>M. tianshanense</i> (Chen et al., 1995; Jarvis et al., 1997)
	<i>M. mediterraneum</i> (Nour et al., 1995; Jarvis et al., 1997)
	<i>M. plurifarium</i> (De Lajudie et al., 1998a)
	<i>M. amorphae</i> (Wang et al., 1999a)
<i>M. chacoense</i> (Velazques et al. 2001)	
<i>Bradyrhizobium</i> (Jordan, 1982)	<i>M. yanglingense</i> (Tan et al. 2001)
	<i>B. japonicum</i> (Jordan, 1982)
	<i>B. elkani</i> (Kuykendall et al., 1992)
<i>Azorhizobium</i>	<i>B. liaoningense</i> (Xu et al., 1995)
	<i>A. caulinodans</i> (Dreyfus et al., 1988)

Dos últimos rizóbios reconhecidos, apenas *Sinorhizobium teranga*, *S saheli* e *Mezorhizobium plurifarium* provêm de árvores e arbustos selvagens de áreas tropicais (De Lajudie et al. 1994, 1998), áreas cuja grande biodiversidade de leguminosas é conhecida. A investigação da simbiose e dos microsimbiontes nestas áreas promete o surgimento de futuras novas espécies (Haukka et al., 1996; Moreira et al., 1998).

O estudo da fixação biológica de N_2 em Leguminosas florestais no Brasil foi intensificado nos últimos 18 anos. A investigação da nodulação de espécies nativas da região Amazônica e da Mata Atlântica descobriu muitas espécies noduladas não conhecidas como tal, a maior parte árvores e muitas de importância econômica (Faria et al. 1989, 1998; Moreira et al., 1993).

Adicionalmente, cerca de 3000 estirpes de rizóbios foram isoladas de diversos tipos de solo e vegetação e grupos de divergência de *Leguminosae* (Faria et al., 1984 e 1987; Moreira et al., 1993), revelando a nodulação de leguminosas até então desconhecidas e estirpes de rizóbio que não pertenciam às espécies conhecidas. Essas pesquisas indicam que rizóbios tropicais representam, provavelmente, uma fonte não explorada da diversidade microbiana com valores econômicos e ecológicos.

2.2 Taxonomia atual dos rizóbios

Por muito tempo a definição das espécies foi baseada na sua velocidade de crescimento em meio de cultura, morfologia e faixa de hospedeiros (Jordan e Allen, 1974), mas este conceito foi abandonado após ter sido verificada a promiscuidade simbiótica de algumas leguminosas e exemplos de sobreposição na faixa de hospedeiros e não tem sido considerado desde a primeira edição do *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology* (Jordan, 1984).

Mais tarde, a descoberta de que os genes que codificam a nodulação, fixação de N_2 e especificidade da hospedeira de rizóbios de rápido crescimento

estão localizados nos plasmídeos simbioticamente transmissíveis, confirmou esta decisão (Nutti et al., 1979; Brewin et al., 1980).

Diferenças morfológicas e fisiológicas descritas por Fred et al.(1932) e a apresentação de um grupo de espécies que cresciam vagarosamente em meio de cultura levou Jordan, em 1982, a propor a criação do gênero *Bradyrhizobium* para agrupar as bactérias de crescimento lento que nodulavam soja.

Iniciava-se, assim, uma série de mudanças na taxonomia de bactérias nodulantes fixadoras de nitrogênio, que culminariam com a introdução de técnicas de biologia molecular para acessar as similaridades e diferenças entre as bactérias, baseadas na sua filogenia (Young e Haukka, 1996).

Leguminosas que formam simbiose com rizóbios geralmente, nodulam na raiz, mas, algumas leguminosas dos gêneros *Neptunia*, *Aeschynomene* e *Sesbania* nodulam na raiz e no caule. Dreyfus et al. (1988) isolou estirpes de nódulos do caule de *S. rostrata* que possuíam a capacidade de fixar N atmosférico em cultura livre de N. Testes de hibridização DNA-RNA indicaram que essas estirpes não pertenciam aos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, em 1988, Dreyfus et al. publicaram seus resultados, caracterizando um novo gênero: o *Azorhizobium*.

No começo do século XX, os taxonomistas metazoários formulavam que a forma era essencial para a classificação bacteriana no sistema filogenético. As características fisiológicas não eram confiáveis pela grande adaptabilidade das bactérias às condições ambientais, sendo então definidas como secundárias (Vandame et al., 1996).Atualmente, a classificação de rizóbios utiliza taxonomia polifásica, a qual procura integrar diferentes tipos de informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas do microrganismo de interesse, buscando uma classificação de consenso (Graham et al., 1991, De Lajudie et al., 1994, Vandamme et al., 1996).

Os avanços obtidos nas últimas décadas possibilitaram a classificação dos microrganismos com base nas relações naturais entre as bactérias, definidas pelas relações filogenéticas codificadas pelo sequenciamento do rDNA 16S (Woese, 1987). A caracterização molecular mostrou-se uma ferramenta confiável para a classificação bacteriana pois ao nível molecular os procariotos são tão complexos, estáveis e claramente definidos como os eucariotos. (Woese, 1987).

A análise da seqüência das regiões do rDNA 16S tem revelado uma diversidade maior que a anteriormente reconhecida, levando a importantes revisões na taxonomia e sistemática deste grupo e na descrição de novos gêneros e espécies (Vinuesa et al., 1998); num futuro próximo espera-se a subdivisão de *Rhizobium* em novos gêneros (Haukka et al., 1996). O sequenciamento do rDNA 16S confirmou a bem estabelecida subdivisão de rizóbio em 5 gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*. (Jarvis et al., 1992; Laguerre et al., 1993; Van Berkum et al., 1996).

Apesar de pertencerem à subdivisão Alfa das Proteobacterias, os rizóbios são microrganismos polifiléticos (Young e Haukka, 1996), localizando-se em ramos diversos da árvore filogenética, e também filogeneticamente heterogêneos, possuindo uma relação bem distanciada entre si (Stackbrandt e Goebel, 1994), mas bem próxima a outros grupos de bactérias que não incluem simbioses de plantas (Willens e Collins 1993; Young et al., 1991). O gênero *Bradyrhizobium* é proximamente relacionado ao gênero *Rhodopseudomonas*, que possui bactérias de vida livre, fototróficas e fixadoras de N₂ (Young et al., 1991) e *Azorhizobium caulinodans* localiza-se em um subramo rDNA possuindo relação filogenética mais próxima aos gêneros *Xanthobacter spp* e *Aquabacter spp*, que incluem bactérias aquáticas não simbióticas, do que a outros rizóbios (Rinaudo et al., 1991; Rainey et al., 1996).

Recente revisão taxonomica, (Young et al., 2001) resultou na inclusão de 4 espécies do gênero *Agrobacteriu*, (*A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. radiobacter* e *A. vitis* bactéria fitopatogenica e *Allorhizobium undicola* espécie de (De Lajudie et al., 1998b) rizóbio isolado de *Neptunia natans* ao gênero *Rhizobium*, devido semelhanças genéticas.

A proposição de novas espécies está a cargo do Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana, que recomenda padrões mínimos para validar a publicação de novos taxa, evitando situações em que a literatura inclua muitas bactérias descritas inadequadamente para uma mesma estirpe tipo. Para que seja proposto uma nova espécie recomenda-se que um grupo grande de organismos seja estudado, quanto à características morfológicas, culturais e genotípicas, como homologia DNA:DNA, hibridização rDNA :DNA; análise do rDNA 16S, RFLP do DNA, eletroforese de enzimas-MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) e performance simbiótica com hospedeiros. A comunicação da nova espécie deverá ser publicada no *International Journal of Systematic Bacteriology* e a estirpe tipo depositada em coleções internacionalmente conhecidas, onde estarão à disposição dos pesquisadores (Graham et al., 1991).

O gênero é de mais difícil definição entre as bactérias que as espécies. Ainda não existem regras para definir o grau de similaridade e diferenças entre e dentro dos gêneros, assim sua extensão varia muito entre os grupos bacterianos (Haukka, 1997).

2.3 Metodologias utilizadas na identificação e caracterização de rizóbios

Perfil de Proteínas totais

A análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) tem sido utilizada para a caracterização da diversidade em isolados bacterianos, sendo considerada um método bastante confiável para a comparação de grandes grupos de estirpes proxiramente relacionadas

(Vandamme et al., 1996). O padrão de proteína obtido para uma dada estirpe bacteriana, é um reflexo do padrão genético e pode ser comparado com padrões de outras estirpes.

Após crescimento em meio de cultura as proteínas são extraídas e lavadas com tampão salino (NaPBS) e centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4° C. Em seguida ao precipitado é adicionado o tampão de tratamento da amostra (Mercaptoetanol, Glicerol, Sódio dodecil sulfato) e aquecido a 95° C por 10 minutos. A proteína é desnaturada por aquecimento, na presença do Mercaptoetanol, que rompe as ligações dissulfeto (S-S). O SDS confere carga negativa aos polipeptídeos, que na eletroforese migram para o polo positivo de acordo com seus pesos moleculares. Após a eletroforese os géis são corados (Azul de Coomassie) e os perfis de proteínas revelados (Figura 1).

A eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas celulares pode produzir padrões de até 30 bandas. As diferenças ente padrões protéicos obtidos podem ser utilizadas para distinguir gêneros, espécies e até mesmo estirpes de rizóbio, sendo empregadas para estudos taxonômicos.

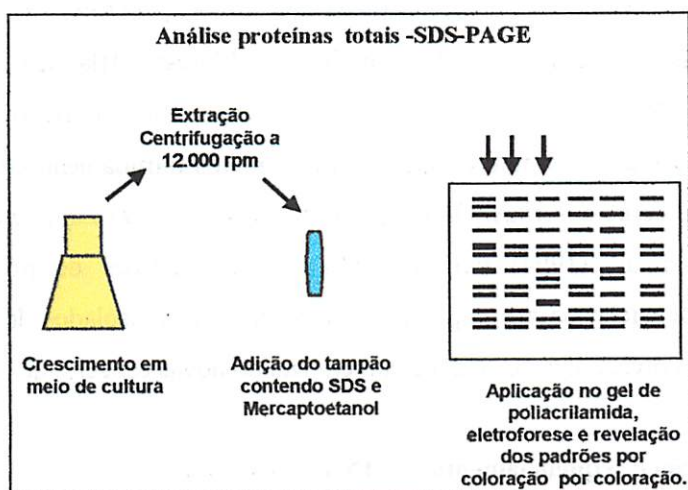


FIGURA 1. Análise de proteínas pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Este método foi uma importante ferramenta na classificação de *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus et al., 1988) *Rhizobium galegae* (Lindström, 1989) *Sinorhizobium fredii* (Chen et al., 1988), *S. teranga* e *S. saheli* (De Lajudie et al., 1994).

Diferenças entre perfis de proteína de estirpes são devidas a diferentes constituições genéticas ou diferentes estados fisiológicos. A padronização dos procedimentos é essencial para a comparação de estirpes de rizóbio com diferentes tempos de crescimento. Estirpes de *Bradyrhizobium* de lento crescimento, extraídas no fim da fase *lag* ou no início da fase *log* podem exibir diferenças relacionadas ao seu estado fisiológico de colheita (Van Rossum, et al., 1995).

No estudo da diversidade e ecologia de bradyrhizobios de *Acacia albida* no Senegal, foi utilizada a análise dos perfis de proteínas totais obtidos por SDS-PAGE (Dupuy et al., 1994). Os isolados identificados como *B. japonicum* foram confirmados por hibridização de DNA.

Moreira et al. (1993), através desta metodologia, compararam 171 isolados de rizóbio de crescimento rápido e lento obtidos de nódulos de leguminosas tropicais da região amazônica e Floresta Atlântica, a diferentes espécies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*. Entre os isolados de crescimento rápido os autores identificaram muitos agrupamentos distintos das espécies até então descritas. Outros pesquisadores como De Lajudie et al. (1994) e Dupuy et al. (1994) também utilizaram os padrões de proteína como metodologia inicial para agrupar um grande número de isolados desconhecidos, acessando a diversidade local e até caracterizando novas espécies de rizóbio.

Amplificação e sequenciamento do DNA ribossômico

A reação em cadeia da polimerase (PCR) revolucionou o estudo da ecologia microbiana, permitindo o desenvolvimento de protocolos altamente

sensíveis e específicos para a detecção de microrganismos, plasmídeos, ou genes. Esta técnica permite a amplificação *in vitro* de pequenos e específicos segmentos do DNA, pela ligação de “primers” oligonucleotídicos, obtendo-se várias cópias da região delimitada (Saiki et al. 1985).

Na amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase, a dupla fita de DNA é desnaturada a 93°C o anelamento (62°C) dos iniciadores (primers) oligonucleotídeos nas fitas simples limita a região a ser amplificada, a extensão (72°C) ocorre a partir dos iniciadores, pela ação da enzima TAQ-DNA polimerase que insere as bases nitrogenadas (Adenina, Guanina, Tiamina e Citosina). O ciclo de temperaturas é repetido diversas vezes (34), permitindo a multiplicação exponencial da região genômica limitada (Figura 2).

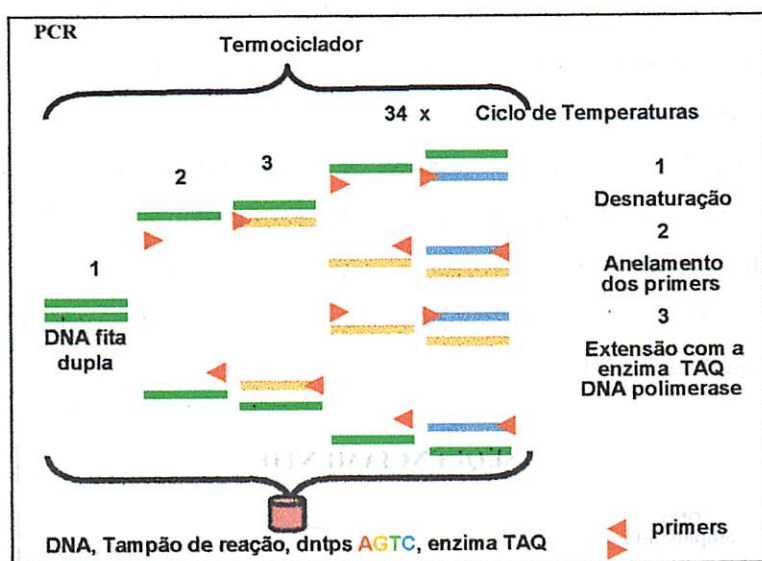


FIGURA 2. Reação da polimerase em cadeia (PCR).

O rDNA bacteriano é classificado, de acordo com sua taxa de sedimentação, como 5S, 16S ou 23S. O rDNA 16S é associado com a menor subunidade do ribossoma e sua caracterização tem sido amplamente utilizada em estudos taxonômicos, evolucionários e ecológicos, não apenas para definir taxa,

mas também para detectar quais taxa estão presentes (Woese, 1987; Fox et al., 1992; Olsen et al., 1994).

Nos genes rDNA, todas as propriedades de um relógio evolucionário são encontradas. Ele está presente em todas as bactérias, tem a mesma função e possui ambos domínios: altamente conservados e variáveis (Fox et al., 1980, Vandanme et al., 1996).

No sequenciamento de bases (Adenina, Citosina, Tiamina e Guanina), o gene ou região genômica é purificado, novamente amplificado com auxílio de kits próprios e depois levado ao sequenciador, que submete a seqüência de bases a uma eletroforese. Um computador conectado a o sequenciador, converte o perfil de bandas em letras ACTG. A seqüência obtida é comparada via Internet com centenas de outras, depositadas nos bancos de genômicos (www.GenBank) onde um programa (ClustalW) compara e fornece a % de similaridade entre seqüências (Figura 3).

Comparações entre as seqüências de nucleotídeos completas ou parciais do rDNA 16S, têm sido amplamente utilizadas para avaliar relação filogenéticas entre muitas espécies de rizóbio (Jarvis et al., 1992; Laguerre et al., 1993). A seqüência completa é, atualmente, pré-requisito para a descrição de novas espécies (Haukka, 1997).

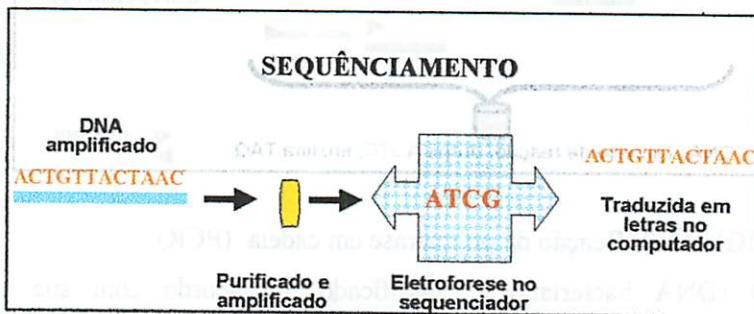


FIGURA 3. Sequenciamento de bases nitrogenadas.

Em um tempo relativamente pequeno, desde que o primeiro sequenciamento parcial da subunidade ribossomal rDNA para rizóbio, foi notificado por Young, et al., (1991), grande quantidade de dados da seqüência SSU têm sido publicada para as estirpes padrões das espécies classificadas e muitas outras estirpes (Young e Haukka, 1996). Uma das grandes vantagens do sequenciamento do rDNA é a possibilidade de armazenar a seqüência em bancos de dados disponibilizando-a para futuros estudos.

A estrutura primária da molécula do 16S é altamente conservada e espécies que possuem 70% ou mais de homologia do DNA usualmente possuem mais de 97% de identidade em suas seqüências. Esta diferença de 3 a 45% nucleotídeos não está distribuída ao acaso ao longo da estrutura primária da molécula mas concentrada principalmente nas chamadas regiões hipervariáveis (Stackebrand e Goebel, 1994).

As diferenças entre a seqüência total do 16S entre espécies de rizóbio proximamente relacionadas pode ser muito pequena, como por exemplo, somente quatro bases e uma deleção (na seqüência de 1421 bases) entre *Sinorhizobium meliloti* e *S. medicae* (Rome et al., 1996). Nick, (1998) na descrição de duas novas espécies de *Sinorhizobium*, comparou a similaridade de várias espécies e as diferenças entre estas variaram de 3 pares de base entre *S. meliloti* e *S. medicae* (num total de 1423 bases pareadas), 8 pares de base para *S. arboris* espécie nova e *S. medicae*, e até 35 pares de bases entre *S. medicae* e *S. terangae* e *S. meliloti* e *S. terangae* (1436 bases pareadas). Entre espécies descritas de *Mesorhizobium*, as seqüências do rDNA 16S possuem geralmente 97% de similaridade (Tan et al. 1997). De Lajudie et al., (1998a) caracterizando a nova espécie de *Mezorhizobium* (*M. plurifarum*), encontraram entre esta e *M. huakuii* uma diferença de apenas 6 pares de base entre as 1398 pareadas.

Embora seja um poderoso instrumento de investigação taxonômica, o sequenciamento do rDNA 16S não deve ser o único utilizado. Pesquisas

revelaram variações alélicas, microheterogeneidade ou recombinação entre os genes do 16S de várias espécies bacterianas, inclusive rizóbio (Haukka et al., 1996; Fox et al., 1992; Haukka, 1997). Isto possibilita o aparecimento de mais de uma seqüência para a mesma espécie (Graham et al., 1991, Fox et al., 1992 Oyazu et al., 1993 e Stackebrandt e Goebels, 1994). Haukka et al (1996) pesquisando a diversidade de seqüências 16S rDNA entre rizóbios isolados de *Acacia senegal* encontraram um isolado de *Sinorhizobium* que após clonagem apresentou 2 seqüências distintas entre seus operons rDNA. A descoberta de que algumas estirpes carregam duas diferentes seqüências de rDNA 16S, sugere a recombinação ou transferência de genes do rDNA 16S entre espécies de um gênero, indicando cautela no uso desta técnica para diferenciar estirpes dentro de espécies (Laguerre et al., 1994 Young e Haukka 1996). Clayton et al. (1995), examinando as seqüências 16S depositadas no GenBank, encontraram alto nível de variação intraespecífica (dentro e entre espécies).

Desde que o sequenciamento do 16S tem sido utilizado para determinar a posição filogenética de um organismo, em que uma única seqüência é necessária, a heterogeneidade pode ter permanecido indetectada em muitas espécies. Isto, devido ao sequenciamento de um único clone ou porque bandas menores do sequenciamento direto foram ignoradas. Este ponto é ilustrado pelo caso do *S. saheli* no qual a única seqüência publicada é uma mistura artefactual e duas diferentes seqüências (Young e Haukka, 1996).

Alguns pesquisadores consideram que a análise da seqüência genética não garante a identidade das espécies, principalmente para espécies que tenham divergido recentemente (Fox et al., 1992; Haukka et al., 1996; Clayton et al., 1995).

Stackbrandt e Goebels (1994) sugerem que quando a similaridade entre as seqüências do 16S rDNA de duas espécies for maior ou igual a 97%, a reassociação DNA-DNA deve ser usada para a determinação das espécies. Na

reassociação, o rDNA marcado de uma estirpe é hibridizado com o DNA total de cada uma das outras espécies, e a temperatura de fusão (T_m) da molécula híbrida permite estimar a similaridade de cada par. A comparação deve ser feita para cada par de microrganismos. Este grau de relação tem sido correlacionado com 97% ou mais, de similaridade na seqüência do rDNA 16S (Haukka, 1997)

Análise de perfis de restrição

A análise de seqüências de rDNA amplificadas por PCR, digeridas a seguir com enzimas de restrição de corte freqüente (sítios de 4 pb) e visualização dos fragmentos resultantes por eletroforese em gel de agarose, consiste na técnica denominada PCR-RFLP (Polimerase Chain Reaction- Randon Fragment Lenght Polimorfism) ou ARDRA (Amplified Ribossomal DNA Restrictions Analysis) quando refere-se à análise de fragmentos do gene rDNA 16S.

Análise de perfis de restrição (PCR-RFLP) consiste na digestão do pedaço de DNA amplificado dor PCR com enzimas de restrição de corte frequente (4 pares de base) e visualização dos perfil de bandas formado após eletroforese em gel de agarose. O gel é corado com Brometo de etídeo e revelado sob luz Ultra violeta.

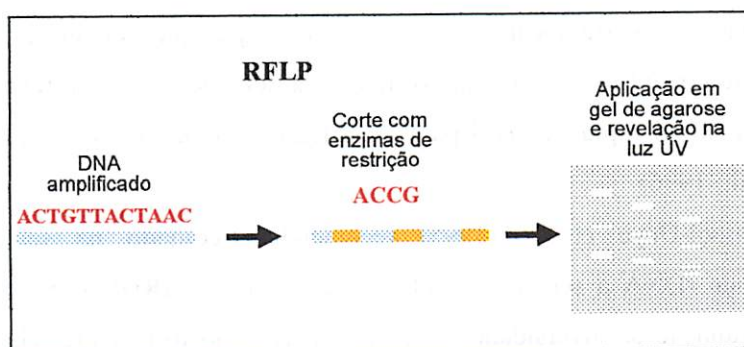


FIGURA 4. PCR- RFLP

Este método, desenvolvido para estudos comparativos de linhagens isoladas e caracterização de genomas bacterianos, baseia-se no princípio de que os sítios de restrição, existentes no operon de rDNA são conservados e refletem padrões filogenéticos e tem sido amplamente utilizado em estudos de diversidade (Laguerre et al., 1996). Os perfis obtidos, compostos de 2 a 10 fragmentos, são espécie-específicos, e a similaridade entre as bactérias pode ser verificada através de um dendrograma resultante dos padrões (Nick, 1998).

Esta técnica foi utilizada inicialmente por Laguerre et al. (1994), que demonstraram que as topologias das árvores filogenéticas obtidas por mapeamento dos sítios de restrição e por alinhamento de seqüências apresentam-se bem relacionadas. O método, além de ser uma ferramenta poderosa para a estimativa rápida de relações filogenéticas, é mais fácil de analisar que padrões complexos de bandas obtidos por outras técnicas de “fingerprints” e pode ser conveniente quando se analisa um grande número de amostras.

Outra região genômica a ser investigada é o espaço entre os genes 16S e 23S (Intergênica). Esta região concentra os RNA de transferência, bem como segmentos de DNA com seqüência variável de nucleotídeos, de maneira que, variação considerável pode ocorrer no tamanho e seqüência entre estirpes ou espécies (Gurtker e Stanisch, 1996). Produtos de PCR com iniciadores dirigidos a esta região geram fragmentos de cerca de 1350 pb, que podem resultar em variações de tamanho, levando alguns autores a defender o uso da análise IGS como um método rápido e geral para identificar bactérias (Nour et al., 1994; Paffitti et al., 1996).

Massol-Deya et al. (1995) recomendam cuidado na seleção do fragmento de rDNA a ser amplificado e analisado por ARDRA. Se o estudo objetiva avaliação da diversidade em grupo microbiano fortemente relacionado filogeneticamente, o fragmento deve preferencialmente incluir a região espaçadora Intergênica (IGS) do operon 16S-23S.

De Lajudie et al. (1998b) utilizaram, entre outras técnicas, o PCR-RFLP do espaço intergênico para classificar um grupo de rizóbios isolados dos nódulos caulinares de *Neptunia natans*, propondo a nova espécie *Allorhizobium undicola*. A diversidade dos rizóbios do grão de bico também foi estudada por este método em associação com testes fenotípicos, que confirmaram a diversidade das estirpes. (Nour et al., 1994).

Vinuesa et al. (1998), em estudo envolvendo 9 isolados de leguminosas arbóreas e diversas estirpes de referência, observaram que a análise de agrupamento dos padrões de RFLP obtidos do IGS com três enzimas de restrição, revelaram 6 agrupamentos distintos, enquanto que por RFLP do 16S com 4 enzimas apenas grupamentos 3 haviam sido detectados. Neste estudo, os autores procederam uma investigação conjunta dos dados provenientes dos padrões de restrição do IGS e do 16S, uma vez que estas , constituem, regiões genômicas contíguas. A partir desta análise, foi possível obter um agrupamento de consenso, dividindo as estirpes nos mesmos 6 genótipos distintos definidos pelos padrões de restrição do IGS, mas em concordância com os dados do RFLP do 16S.

2.4 O gênero de leguminosa hospedeira *Sesbania*

O gênero *Sesbania*, pertencente à família *Leguminosae*, sub-família *Papilionoideae* e tribo *Robinieae*, compreende aproximadamente 150 espécies, comumente encontradas em cursos de água ou locais alagados (Allen e Allen, 1981). Em recente revisão taxonômica do gênero, Monteiro (1984) relata a existência das espécies encontradas nas América: (1) subgenero *Sesbania* com três espécies nativas (*S. emerus*, *S. exasperata*, *S. oligosperma*) e três introduzidas (*S. bispinosa*, *S. sericea*, *S. sesban*); (2) subgenero *Daubetonia*, com cinco espécies nativas (*S. cavanillesii*, *S. drummondii*, *S. macroptera*, *S.*

punicea, *S. virgata*); (3) subgenero Agati, com a espécie introduzida *S. grandiflora*.

Este importante gênero de leguminosa exibe potencial para uso em solos alagados, adubação verde, exploração agroflorestal e produção de grãos (Boivin et al., 1997). Folhas de *S. grandiflora* produzem ácido ascórbico e *S. aegyptiaca* produz fibras (Turk e Keyser 1992). Outras espécies podem ser utilizadas na formação de cercas vivas, barreiras contra o vento e, em alguns casos como fornecedores de fibras de boa qualidade (Allen e Allen, 1981).

Este gênero é muito estudado quanto a nodulação (Roberts et al., 1980, De Lajudie et al., 1994; Dreyfus et al., 1988; Rinaudo et al., 1991) apresentando rizóbios pertencentes a 3 gêneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*

Sesbania virgata (Caz.) Pers., conhecida popularmente como cambaí (Eisinger, 1989), sarazinho, mãe-josé e feijãozinho (Pott e Pott, 1994), é uma espécie arbustiva de aproximadamente dois metros de altura (Figura 3), possui folhas alternas paripenadas, flores amarelas e fruto marginado (Figuras 1 e 2). Apresenta floração mais intensa nos meses de janeiro, abril, setembro e outubro e frutificação nos meses de janeiro, outubro e novembro (Eisinger, 1989).



FIGURA 5. Flores e frutos de *Sesbania virgata*

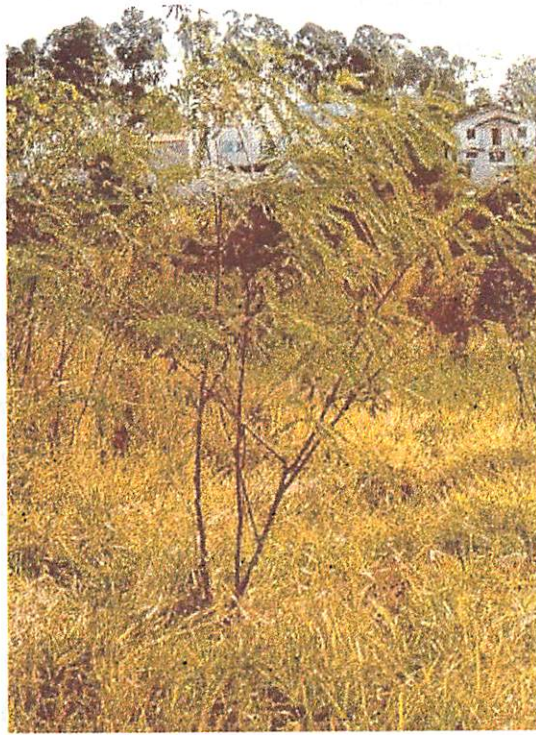


FIGURA 6. *Sesbania virgata*.

A espécie apresenta plasticidade morfo-anatômica que permite sua adaptação em condições edáficas redutoras. Em condições de alagamento, apresenta acentuadas rachaduras corticais na base do caule e raiz principal e entumescimento cortical esponjoso do caule, pela formação de aerênquima. (Davanso-Fabro et al., 1998). Durante o período de inundação, a árvore produz inúmeras raízes adventícias, que se desidratam e morrem, quando a lâmina d'água abaixa.

Pode ser encontrada em campos alagáveis, solos arenosos ou argilosos, distribuindo-se pelas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai (Pott e Pott, 1994). Esta espécie tem sido amplamente

usada no reflorestamento da mata ciliar, na recuperação de solos degradados e no controle da erosão (Allen e Allen, 1981; Franco et al., 1996). Sua capacidade de fixar N₂ permite seu crescimento rápido em solos deficientes, favorecendo sua utilização como adubo verde.

Os primeiros rizóbios nodulando *Sesbania virgata* foram isolados por Campelo (1976) em trabalho sobre a nodulação de leguminosas florestais.

2.5 Simbiose entre rizóbios e *Sesbania* spp

Das 30 espécies de rizóbio descritas até o presente 4 espécies, *Rhizobium huautlense* (Wang et al., 1999b); *Sinorhizobium saheli* (De Lajudie et al., 1994); *Sinorhizobium terangae* biovar *sesbaniae* (Boivin et al., 1997) e *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus et al., 1988), foram originalmente isoladas de três espécies de *Sesbania*, respectivamente *S. herbacea*, *S. pachycarpa* e *S. rostrata*.

Sinorhizobium saheli e *S. teranga* (De Lajudie et al., 1994) são espécies recentes de rizóbio, isoladas de espécies de *Sesbania* na África. *S. saheli* foi isolada de *Sesbania cannabina*, *S. grandiflora*, *S. rostrata* e *S. pachycarpa*, e *S. teranga* de *Sesbania rostrata*, *S. sesban* e *S. cannabina* e espécies de *Acacia*. Estes rizóbios foram encontrados nodulando raiz e caule de *S. rostrata* (Boivin et al., 1997).

Jordan (1984) no “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology”, cita *Bradyrhizobium* spp. nodulando *Sesbania* sp e o mesmo rizóbio foi utilizado no estudo da nodulação de *Sesbania exasperata* (Souza et al., 2000).

Diferente dos rizóbios geralmente encontrados em nódulos radiculares das leguminosas, *Azorhizobium* foi isolado do caule de *S. rostrata*. Após testes de hibridização DNA-RNA, que indicaram que estas estirpes não pertenciam aos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, Dreyfus et al. (1988) publicaram seus resultados, caracterizando o novo gênero.

Rinaudo et al., (1991) isolaram 2 estirpes nodulando *S. rostrata* que possuíam características de *Azorhizobium*, mas em testes de hibridização DNA-rDNA apresentaram-se distintas de *A. caulinodans*. Estas estirpes não devem ser confundidas com as estirpes aqui descritas porque, diferentemente da nova espécie aqui proposta, uma estirpe nodulou eficientemente *S. rostrata* e a outra não fixava N₂ em meio livre de N.

Duas estirpes (BR 5401 e BR 5404) pertencentes ao grupo de estirpes da espécie aqui proposta foram incluídas em estudos de biodiversidade de rizóbios utilizando Padrão de proteínas totais-SDS-PAGE (Moreira et al.,1993) e análise de padrões de isoenzimas-MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) (Moreira et al.,1994). Os resultados obtidos colocaram-nas em grupos de MEE e SDS-PAGE distinto das demais espécies e estirpes tipo conhecidas e de *A. caulinodans*.

Em estudo de sequenciamento parcial do rDNA 16S envolvendo 44 estirpes provenientes da análise de proteínas totais (Moreira et al., 1998), a estirpe BR 5401 obteve seqüência de 260 pb distinta das estirpes tipo incluídas no trabalho, e a seqüência de rizóbio mais próximo foi a *A. caulinodans* indicando que a mesma deve pertencer a uma nova espécie deste gênero.

Posteriormente foram isoladas da mesma hospedeira, crescendo em outras regiões do Rio de Janeiro e Minas Gerais, outras estirpes com características semelhantes, constituindo um grupo de 30 estirpes (Faria et al 1996, Barberi et al., 1998, Gonçalves, 2000).

As estirpes isoladas de *S. virgata* possuem morfologia da colônia semelhante à morfologia da colônia de *Azorhizobium caulinodans*: incolor, transparente, convexa, puntiforme com 0,2 mm de diâmetro, pouca produção de exopolissacarídeo, crescimento intermediário e reação alcalina. Todas foram testadas quanto a sua capacidade de fixar N₂ em meio livre de nitrogênio.

A partir das diferenças encontradas, a nova espécie foi apresentada e proposta com o nome *Azorhizobium johannense* no 12th International Congress on Nitrogen Fixation, em Foz do Iguaçu-PR, 1999 (Moreira et al., 1999).

Este trabalho pretende realizar no grupo de estirpes isolado dos nódulos de *Sesbania virgata* algumas das investigações requeridas para a proposição de uma nova espécie de rizóbio pelo Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, O.N.; ALLEN, E.K, **The Leguminosae. A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation.**, Madison, University of Wisconsin Press, 1981.
- AMARGER, N; MACHERET, V; LAGUERRE, G. *Rhizobium galicum* sp nov. and *Rhizobium giardinii* sp nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 996-1006, 1997.
- BARBERI, A.; CARNEIRO, A.C.; MOREIRA, F.S.M.; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v. 4, p. 145-153, 1998.
- BOIVIN C.; NDOYE, J.; LORTET, G.; NDIAYE, A.; LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli*, and *S. teranga* bv. *Sesbaniae* can form stem nodules on *Sesbania rostrata* although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, p. 1040-1047, 1997.
- BREWIN, N.J.; BERINGER, J.E.; JOHNSTON, A.W.B. Plasmid mediate transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal General Microbiology**, Reading, v.120, p. 413-420, 1980.

- CAMPELO, A.B. **Caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp de leguminosas florestais.**, Rio de Janeiro, UFRRj, 1976. 122p. Tese de Mestrado.
- CLAYTON, R.A.; SUTTON, G.; HINKLE, P.S.; BULT, C.; FIELDS, C. **Intraespecific variation in small-subunit rDNA sequences in GenBank: why single may not adequately represent prokaryotic taxa.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.45, p.595-599, 1995.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. **Numerical taxonomy study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.38, p.392-397, 1988.
- CHEN, W.X.; LI, G.S.; QI, Y.L.; WANG, E.T.; YUAN, H.L.; LI, J.L. ***Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from root nodules of *Astragalus sinicus*.** *International Journal of Systematic Bacteriology* Washington, v.41, p. 275-280, 1991.
- CHEN, W.E.; WANG, E.; WANG, S.; LI, S.; CHEN, W; LI, Y. **Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from na arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.43, p. 153-159, 1995.
- CHEN, W.X.; TAN, Z.Y.; GAO, J.L.; LI, Y.; WANG, E.T. ***Rhizobium hainanense* sp. nov. isolated from tropical legumes.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v. 47, p. 870-873, 1997.
- DAVANSO-FABRO, V.M.; MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA M. **Tolerância à inundação: aspectos da anatomia ecológica e do desenvolvimento da *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. (Fabaceae).** *Brasilian Archives of Biology and Tecnology*, Curitiba, v 41, p. 475-482, 1998.
- De LAJUDIE, P; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. **Polyphasic taxonomy of Rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp nov., and *Sinorhizobium teranga* sp nov.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.44, p. 715-733, 1994.

- De LAJUDIE, P.; WILLENS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.M.S.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.48, p.369-382, 1998a.
- De LAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KESTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. , *Allorhizobium undicola* gen. Nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.48, p.1277 - 1290. 1998b.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; 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**, Washington, v. 38, p. 89-98. 1988.
- DUPUY, N.; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDERBRUAENE, I.; MAESTROJUAN, G.; DREYFUS, B.; KERSTER, K.; COLLINS, M.D.; GILLIS, M. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p. 461-473, 1994.
- EISINGER, S.M. Levantamento dos gêneros *Sesbania*, *Indigofera* e *Tephrosia* no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRS, 1989.94p.
- FARIA, S.M.; FRANCO, A.; JESUS, R.M.; MENANDRO, M.S.; BAITELLO, J.B. DOBEREINER, J.; SPRENT, J.I. New nodulating legume trees from south-east Brazil. **New Phytologist**, London, v.98, p.317-328, 1984.
- FARIA, S.M.; LIMA, H.C.; FRANCO, A.A.; MUCCI, E.S.F.; SPRENT, J.I. Nodulation of legumes trees from SE Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, v.99, p. 347-356, 1987.
- FARIA, S.M. Isolamento de estirpes de rizóbio de nódulos de *S. virgata* no Estado do Rio de Janeiro, 1996.
- FARIA, S.M.; LIMA, H.C.; OLIVARES, F.L.; MELO, R.B.; XAVIER, R.P. Nodulação em espécies florestais especificidade hospedeira e implicações na sistemática de Leguminosae. In: **Inter-relação fertilidade, biologia do**

- solo e nutrição de plantas. eds: SIQUEIRA, J.O. MOREIRA, F.M.S., LOPES, A.S. GUILHERME, L.R.G. FAQUIN, V. FURTINI NETO, A.E. CARVALHO J.G. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Universidade Federal de Lavras- Departamento de Ciência do Solo Lavras- MG 1999, p.667-686.
- FOX, G.E.; WISOTZKEY, J.D.; JURTSUK, P.J.R. How Close is Close: rDNA 16S Sequence Identity may Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v. ., p.166-170. 1992
- FRANCO, A.A.; CAMPELO, E.F.C; DIAS, L.E.; FARIA, S.M. Uso de leguminosas associadas a microrganismos na revegetação de áreas de mineração de bauxita em Porto Trombetas-PA. *EMBRAPA Agrobiologia*, 1996. 69p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 27).
- FRANK, B. Über die Parasiten in den Wurzelanschwellungen de Papilionaceen. *Botanische Zeitung*, v.37, p.377-388, 393-400, 1889.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; McCOY, E. *Root nodule bacteria and leguminous plants*. Madison, WI: University of Wisconsin, 1932.
- GONÇALVES, M. Especificidade de estirpes de *Azhorizobium* sp nov. na simbiose com *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2000. 43p.
- GRAHAM, P.H. Identification and classification of root nodule bacteria. In: NUTMAN, P.S.(ed) *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge University Press, 1976. p. 99-112.
- GRAHAM, P.H. SADOVISCKY, M.J.; KEYSER, H.H.; BARNET, Y.M.; BRADLEY, R.S.; COOPER, J.E.; DE LEY, D.J.; JARVIS, B.D.W.; ROSLYCKY, E.B.; STRIHDOM, B.W.; YOUNG, J.P.W. Proposed Minimal Standards for the Description of New Genera and Species of Root- and Stem-Nodulating Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.41, p.582-87. 1991.
- HAUKKA, K. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from tropical tree legumes. Academic Dissertation in Microbiology, Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki, 1997.

- HAUKKA, K.; LINDSTROM, K.; YOUNG, P.W. Diversity of Partial rDNA 16S Sequences Among and Within Strains of African Rhizobia Isolated from *Acacia* and *Prosopis*. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v.19, p. 352-359, 1996.
- JARVIS, B.D.W.; PANKHURST, C.E.; PATEL, J.J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 32, p. 378-380, 1982.
- JARVIS, B.D.W.; DOWNER, H.L.; YOUNG, J.P.W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.42, p. 93-96, 1992.
- JARVIS, B.D.W.; van BERKUM, W.X.; CHEN, S.M.; NOUR, M.P.; FERNADEZ, J.C.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tiashanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.895-898. 1997.
- JORDAN, D.C; ALLEN, O.N. Rhizobiaceae.. ed BUCHANAN R.E.; GIBBONS, In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th edition, Baltimore, Willians e Wilkins, 1974, p.261-264.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradirhizobium* gen. Nov, a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.32, p.136-139, 1982.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae, In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G.(eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore, Willians e Wilkins, 1984, p.234-244.
- 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**, Geva, v.6, p.55-76, 1997.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan, 1982 and proposal for

- Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p. 501-505, 1992.
- LAGUERRE, G.; BARDIN, M.; AMARGUER, N. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hybridization. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, p.1142-1149, 1993.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M.; REVOY, F.; AMARGUER, N. Rapid Identification of Rhizobia by Restriction fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified rDNA 16S Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p. 56-63, 1994.
- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P. ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprint and PCR-Restriction fragment polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62 p 2029-2036, 1996.
- LINDSTROM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 39, p. 365- 367, 1989.
- MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.B.; FRANCO, A.A; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a new species nodulating *Phaseolus vulgaris* L Beans and *Leucena* trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, p. 417-426, 1991.
- MARTINEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Plant and Soil**, The Hague, v.161, p.11-20, 1994.
- MASSOL-DEYA, A.A; ODELSON, D.A; HICKEY, R.F; THEDJE, J.M. Bacterial community fingerprint of amplified 16S and 23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: AKKERMANS, A.D; ELSAS, J.D. VAN; BRUIJIN, F.J. de eds. **Molecular microbial Ecology Manual**, Kluwer Academic Press, 1995. p.1-8.
- MONTEIRO, R. The species of *Sesbania* Scop. (Leguminosae) in Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.37, p.309-331, 1994.

- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K. FRANCO, A. Characterization of Rhizobia Isolated from Different Divergence Groups of Tropical Leguminosae by Comparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis of their Total Proteins. **Systematic Applied Microbiology**, Washington, v.16, p.135-146, 1993.
- MOREIRA, F.M.S.; MARTINEZ-ROMERO, E.;SEGOVIA, L; FRANCO, A.A. Genetic diversity of rhizobia and bradyrhizobia from native tropical species characterized by multilocus enzyme electrophoresis, p 88. In 7th International Symposium of Microbial Ecology Abstracts, Santos SP Brazil, 1994.
- MOREIRA, F.M.S.; HAUKKA, K.; YOUNG, P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p.04-11, 1998.
- MOREIRA, M.S.; CARVALHO, Y.; GONÇALVES, M.; HAUKKA, K.; YOUNG; P.J.W. FARIA; S.M FRANCO,A. A. CRUZ; L.M.; PEDROSA F.O *Azorhizobium johannense* sp. nov. and *Sesbania virgata* (Caz.) Pers.: a highly specific symbiosis. Pedrosa, F.O.; Hungria, M.; Yates, G.; Newton, W.E. (Ed). **Nitrogen Fixation: From molecules to crop productivity**, Current Plant Science and Biotechnology in agriculture Vol 38 Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Netherlands, Proceedings of 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Foz do Iguacu, Paraná, Brazil, setembro de 12-17, 1999. 669 p., p. 197.
- NICK, G. Polyphasic taxonomy of rhizobia isolated from tropical tree legumes. Academic Dissertation in Microbiology, Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki ,1998.
- NICK, G.; DE LAJUDIE, P.; EARDLY, B.D; SOUMALAINEN, S.; PAULIN, L.; ZHANG, X.; GILLIS, M.; LINDSTROM, K. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., two new species isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. **International Journal of Systematic Bacteriology** Submitted., 1998.
- NOUR, S.M.; CLEYET-MAREL, I.C.; BECK, D.; EFFOSSE, A.; FERNANDEZ, M.P. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, p. 345-354, 1994.

- NOUR, S.M.; CLEYET-MAREL, J.C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M.P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) and of *Rhizobium mediterraneum* sp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 640-648, 1995.
- NUTI, M.P.; LEPIDI, R.K.; PRAKASH, R.K.; SCHILPEROOT, R.A.; CANNON, F.C. Evidence for nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. **Nature**, v.282, p. 533-535, 1979.
- OLSEN, G.J.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.176, p.1-6, 1994.
- OYAZU, H.; MATSUMOTO, S.; MINAMISAWA, K.; GAMOU, T. Distribution of rhizobia in leguminous plants surveyed by phylogenetic identification. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v.39, p. 339-354, 1993
- PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. **Applied and Environmental Microbiology** Washington, v.62, p. 2279-2285, 1996.
- POTT, A.; POTT, V.J. *Plantas do Pantanal*. Corumbá: EMBRAPA/CPAP/SPI, 1994,320p.
- RAINEY, F.A.; WIEGEL, J. 16S Ribosomal DNA sequence analysis confirms the close relationships between the genera *Xanthobacter*, *Azorhizobium* e *Aquabacter* and reveals a lack of phylogenetic coherence among *Xanthobacter* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p.607-610, 1996.
- RINAUDO, G.; ORENGA, S.; FERNANDEZ, M.P.; MEUGNIER, H.; BARDIN, R. DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem-and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.114-120, 1991.
- ROBERTS, G.P.; LEPS, W.T.; SILVER, L.E.; BRIL, J.W. Use of two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.39, p.414-422, 1980.

- ROME, S.; FERNANDEZ, M.P.; BRUNEL, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. *Sinorhizobium medicae* sp. nov. isolated from annual *Medicago* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p.972-980, 1996.
- SAIKI, R.K.; SCARF, S.; FALOONA, F.A.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomics sequences restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SCHOLLA, M.H.; ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp. nov. a fast-growing species that effectively nodulates soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.34, p.484-486, 1984.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTINEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.374-377, 1993.
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. **Biologia e bioquímica do solo**. Curso de Pós-graduação "Latu sensu" (Especialização) a Distância: Solos e Meio Ambiente, Lavras, UFLA/FAEPE, 2001, 291p.
- SOUZA L. A. G., RIBAS T. T. M.; ALFAIA S. S. Efeito da inoculação com rizóbios e da adubação nitrogenada de mudas de *Sesbania exasperata* (Leg. Pap.) em dois solos ácidos da Amazônia. GIOTTO E.; BECKER A.B.; MATIUZZI, F.R.(ed) **Anais da FERTIBIO 2000**, (CD Room),-UFSM-Santa Maria, RS, 2000.
- STACKBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and rDNA 16S sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, p. 846-849, 1994.
- TAN Z.Y., XU, X.D. WANG E.T., GAG, J.L., MARTINEZ-ROMERO, E., CHEN WX **Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia**. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 874-879, 1997.
- TAN Z.Y., KAN F.L, PENG GX, WANG E.T, REINHOLD-HUREK B, CHEN WX ***Rhizobium yanglingense* sp nov.**, isolated from arid and semi-arid

- regions in China. **TI International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Oxford, v.51, p.909-914, 2001.
- TURK, D; KEYSER H.H. Rhizobia that nodulate tree legumes specificity of the host for nodulation and effectiveness. **Canadian Journal of Microbiology** Ottawa, v.38, p.451-460, 1992.
- VANDAMME, P. POT, B; GILLIS, M.;DEVOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, p. 407-438. 1996.
- Van BERKUM, P.; BEYENE, D.;EARDLY, B.D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p. 240-244, 1996.
- Van BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, T.A.; EARDLY, B. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is the one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen fixing symbioses with *Medicago ruthenica* (L.) Ledebour. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 13-22, 1998.
- Van ROSSUN, D.; SCHUURMANS, F.P.; GILLIS, M.;MUYOTCHA, Van VERSEVELD, H.W., STOUTHAMER, A.H.; BOOGERD, F.C. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.599-1609, 1995.
- VELAZQUEZ, E. IGUAL, J.M.; WILLENS, A. FERNÁNDEZ, M.P.; MUÑOS, E.; MATEOS, P.F.; ABRIL, A.; TORO, N.; NORMAND, P. CERVANTES, E.; GILLIS, M.; MARTINES-MOLINA, E. *Mesorhizobium chacoense* sp.nov., a novel species that nodulate *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Oxford,v.51, p. 1011-1021, 2001.
- VINUESA, P.; RADEMAKER, J.L.W.; BRUINJN, F.J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legume of the canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding rDNA 16S (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive esxtragenic palindromic PCR

- genomic fingerprint, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.2096-2104, 1998.
- WANG, E.T.; Van BERKUM, P.; BEYENE; SUI, X.H.; CHEN, W.X.; MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.49, p. 51-65, 1999a
- WANG, E.T.; Van BERKUM, P.; BEYENE, D.; SUI, X.H.; DORADO, O.; CHEN, W.X.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium huatlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.48, p. 687-699, 1999b.
- WILLENS, A.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on rDNA 16S gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, p. 305-313, 1993.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbial Reviews**, june 1987 p. 221-227.
- XU, L.M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J.; FAN, H.; *Bradyrhizobium liaonigense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p. 305-313, 1995.
- YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L. EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain Btail by polymerase chain reaction-based sequencing of 16S rDNA gene segment. **Journal Bacteriology Oxford**, v.173, p. 2271-2277, 1991.
- YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New phitopatology**, Oxford, v.133, p. 01-08, 1996.
- YOUNG, J.M., KUYKENDALL, L.D., MARTINEZ-ROMERO, E., KERR, A. SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 19998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology**, Oxford, v.51, p.89-103, 2001.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DAS ESTIRPES DE *Azorhizobium* sp nov.

RESUMO

CARVALHO, Y. Caracterização fenotípica e genotípica das estirpes de *Azorhizobium* sp nov. Lavras: UFLA, 2002. Cap.2. 38p. (Tese-Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)*.

Um grupo de trinta estirpes de rizóbio isoladas de nódulos radiculares de *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. crescendo em diferentes regiões do sudeste do Brasil (Municípios dos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais) e com características culturais em YMA semelhantes a *Azorhizobium caulidonans* (alcalinização, crescimento intermediário e pequena produção de goma) foi estudado. Características genéticas e fenotípicas foram conduzidas, incluindo testes culturais e fisiológicos, perfil de proteína total obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), perfis de polimorfismo de fragmentos obtidos por restrição enzimática (RFLP) do gene rDNA 16S e do espaço intergênico entre rDNA 16Sr e 23S amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR). Concluiu-se que este grupo é fenotípica e filogeneticamente similar a BR5401 identificada anteriormente como uma possível nova espécie do gênero *Azorhizobium*.

*Comitê Orientador : Profª Fátima M.S. Moreira – UFLA (Orientadora).

ABSTRACT

CARVALHO, Y. Fenotipic and e genotipic characterization of strains from *Azorhizobium* sp nov. Lavras: UFLA, 2002. Chap.2. 38p. (Thesis - Doctorate in Soil and plant nutrition)*.

Thirty rhizobia strains with cultural characteristics on YMA similar to *Azorhizobium caulinodans* (alkalinization, few extracelular polissacaride production, intermediate growth) were isolated from the native species *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. Growing at different regions in southeast Brazil (Minas Gerais and Rio de Janeiro states). Genetic and phenotypic characteristics were performed, including cultural and physiological tests, polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of total proteins, restriction fragment length polymorphism (RFLP) of Polimerase Chain reaction (PCR) amplified 16S rDNA and intergenic space between 16S and 23S rDNA. It was demonstrated that this group is phenotypically and phylogenetically similar to BR5401, previously identified as a probably new species of the genus *Azorhizobium*.

*Guidance Committee : Profª Fátima M.S. Moreira – UFLA (Major Professor).

1 INTRODUÇÃO

Até 1988 as bactérias que formam simbiose com leguminosas fixando nitrogênio pertenciam a dois gêneros, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984). Em 1988 Dreyfus et al. descreveram um novo gênero, *Azorhizobium*, com uma única espécie, *A. caulinodans*, para rizóbios que nodulavam o caule de *Sesbania rostrata*, através de análises fenotípicas, incluindo perfil de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e genéticas como composição de bases do DNA (conteúdo de C + G) e hibridização DNA-rRNA.

Desde então, com o avanço e uso de métodos moleculares e análise de estirpes isoladas de várias espécies de leguminosas, incluindo espécies tropicais, novos gêneros de rizóbio foram descritos (Jarvis et al., 1997; De Lajudie et al., 1994; 1998). No entanto, nenhuma nova espécie foi acrescentada ao gênero *Azorhizobium*.

Estudos sobre estirpes de rizóbios isoladas de espécies nativas de leguminosas florestais através da análise de proteínas totais por eletroforese em Gel de Poliacrilamida, (Moreira et al., 1993) e padrões de isoenzimas-MEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) (Moreira et al., 1995) revelaram alta diversidade. Estes estudos incluíram duas estirpes não identificadas isoladas por Campelo (1976) de nódulos radiculares de *Sesbania marginata* (syn. *S. virgata*) que se situaram em grupos de MEE e SDS-PAGE distintos de estirpes tipo das espécies de rizóbio conhecidas, incluindo *A. caulinodans*. Posteriormente o seqüenciamento parcial do rDNA 16S envolvendo 44 estirpes de leguminosas florestais representantes de grupos obtidos por análise de proteínas totais (Moreira et al., 1993) revelou que a estirpe BR 5401, isolada de *S. virgata* possuía seqüência de 260 pb distinta (diferença de 8 pares de bases) e mais próxima a de *A. caulinodans* indicando que a mesma deveria pertencer a uma nova espécie deste gênero (Moreira et al., 1998).

Para descrição de novas espécies de rizóbio Graham et al. (1991) sugeriram padrões mínimos que incluem características genéticas, fenotípicas e simbióticas. Além da análise de um grupo relativamente grande de estirpes.

Novas estirpes foram posteriormente isoladas de plantas de *Sesbania virgata* ocorrendo em diferentes Municípios dos Estados de Minas e Rio de Janeiro (Faria, 1996 não publicado; Barberi et al., 1998; Gonçalves, 2000; Carvalho, neste trabalho).

O objetivo deste trabalho foi realizar novos testes de valor taxonômico em 29 estirpes isoladas de *S. virgata* e verificar se estas são similares em características genéticas e fenotípicas a BR 5401, podendo assim corroborar a proposição de uma nova espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estirpes de rizóbio

Foram estudadas 30 estirpes de *Azorhizobium* isoladas de nódulos radiculares de *Sesbania virgata* de vários Municípios do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Foram incluídas também estirpes tipo de espécies dos gêneros descritos de rizóbio (Tabela 1).

2.2 Testes morfológicos

A forma das células para bactérias crescendo em meio semi-sólido foi verificada e fotografada em microscopia contraste-fase (Nikon EFD-3)

2.3 Utilização de fontes de carbono –

Para análise de fontes de carbono utilizadas por cinco estirpes (BR 5401, BR 5414 BR 5425, UFLA 0I-51B e UFLA 01-606), o meio YMA (Vincent, 1970) foi modificado pela substituição do extrato de levedura por 0,1% de

TABELA 1. Estirpes estudadas, origem e referências.

Estirpes e Hospedeiros	Local de Origem (Município ou País)	Referências
<i>Azorhizobium sp.</i> de <i>Sesbania virgata</i> BR5401, BR5402, BR5404	Seropédica – RJ	Campello, 1976; Moreira et al., 1998.
UFLA 01-49b, UFLA 01-50b, UFLA 01-51b, UFLA 01-54b BR 5413, BR 5414, BR 5415 BR 5416, BR 5417, BR 5418, BR 5430.	Itutinga-MG Paracambi – RJ Itaguaí – RJ	Barbieri et al., 1998 Faria, 1996, não publicado
BR 5419, BR 5420, BR 5421 BR 5422, BR 5423, BR 5424, BR 5425, BR 5426, BR 5427, BR 5428	Volta Redonda - RJ CampoGrande - RJ	
UFLA 01-601, UFLA 01-602 UFLA 01-605 UFLA 01-606, UFLA 01-603, UFLA 01-604	Lavras-MG Ijaci –MG Ribeirão Vermelho-MG Lavras-MG	Gonçalves, 2000 Este trabalho
<i>A. caulinodans</i> ORS 571 ^T de <i>Sesbania rostrata</i>	Senegal	Dreyfus et al., 1988
<i>Bradyrhizobium elkani</i> USDA 76 ^T de <i>Glycine max</i>	USA	Kuykendall et al., 1992
<i>Mesorhizobium loti</i> NZP 2213 ^T de <i>Lotus corniculatus</i>	Nova Zelândia	Jarvis et al., 1982
<i>Sinorhizobium meliloti</i> NZP 4027 ^T de <i>Medicago sativa</i>	Austrália	Dangeard, 1926
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T de <i>Phaseolus vulgaris</i>	Colômbia	Martinez-Romero et., al., 1991

NH₄NO₃ e do manitol por um das fontes de carbono testadas: arabinose, celulose, citrato de sódio, frutose, gluconato, glucose, lactose, lactato de sódio e sacarose. O meio foi solidificado com 1,4 % de agar e 0,0025% de Azul de Bromotimol foi adicionado como indicador de pH. O pH do meio foi ajustado para 6,8. Foi testado também o crescimento em meio mínimo (sais do YMA e ágar).

2.4 Fixação de N₂ em meio de cultura

A habilidade de crescimento fixando nitrogênio atmosférico foi verificada para as trinta estirpes de *Azorhizobium* sp. nov. em meio de cultura semi-sólido LO (Dreyfus et al., 1983) sem nitrogênio na forma combinada em frascos de 10 mL contendo 4 mL de meio. As estirpes tipo de *Bradyrhizobium elkani* (USDA 76) de *Mesorhizobium loti* (NZP 2213) *Sinorhizobium meliloti* (NZP 4027) e *Rhizobium tropici* (CIAT 899) foram utilizadas como controle. O crescimento foi avaliado através da formação de película característica. Para três estirpes (BR 5401, BR 5414, e UFLA 01-602) foi medida a atividade da nitrogenase pelo método de redução de acetileno (ARA) (Dilworth, 1966). A leitura da atividade da nitrogenase foi efetuada a cada 24 horas, sendo os frascos incubados na presença de 2% de C₂H₂. Após 1 hora de incubação foi analisada a produção de etileno por cromatografia gasosa em um equipamento Varian Star 3400 CX. Foi também avaliado o crescimento destas estirpes, incluindo as referências, em meio de cultura mínimo (sais do YMA) sólido adicionado de lactato de sódio para estirpes do gênero *Azorhizobium* e manitol como fonte de carbono (10g L⁻¹) para estirpes das outras espécies. Este foi distribuído em frascos de 10 mL na base de 4 mL de meio por frasco. Após cinco dias de incubação foi avaliada pela medida da atividade da nitrogenase realizada como no meio semi-sólido.

2.5 Tolerância a sais

O teste de tolerância a sais de cinco estirpes (BR 5401, BR 5414 BR 5425, UFLA 01-51B e UFLA 01-606) foi feito em meio de cultura LO (Dreyfus et al., 1983) acrescido de NaCl (5,0, 10 e 20 g L⁻¹) ou KNO₃ (80 g L⁻¹) (Dreyfus et al., 1988). A capacidade de denitrificação foi verificada em meio LO semi-sólido acrescido de NH₄NO₃ 0,4 g L⁻¹ (Dreyfus et al., 1988). Também foi verificado o crescimento em meio Luria Broth (LB) (peptona de caseína, 10 gL⁻¹; extrato de levedura, 5 g L⁻¹; NaCl, 10 g L⁻¹).

2.6 Efeito de diferentes temperaturas e valores de pH

O crescimento de cinco estirpes (BR 5401, BR 5414 BR 5425, UFLA 01-51B e UFLA 01-606) em diversas temperaturas (12°, 20° 35° e 44°C) e diferentes valores de pH (5,0, 6,0 8,0 e 9,0) foi efetuado em meio LO semi sólido sem fonte de nitrogênio.

Nos testes de habilidade de crescimento em fontes de carbono, tolerância a sais e fixação de N em meio de cultura o inóculo foi preparado a partir de colônias crescidas em meio YMA e lavadas com solução NaCl 0,08%. A temperatura de incubação dos testes foi 28° C.

2.7 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)-

A análise das proteínas totais foi efetuada nas 30 estirpes de *Azorhizobium* sp. nov, e em estirpes tipo de espécies dos outros gêneros de rizóbio: *Bradyrhizobium japonicum* (ATCC 10324^T), *Mesorhizobium loti* (NZP 2213^T), *Sinorhizobium meliloti* (NZP 4027^T) e *Rhizobium tropici* (CIAT 899^T) conforme Moreira et al. (1993). Os isolados cresceram em meio TY líquido contendo em g L⁻¹ (tryptona 5; extrato de levedura 0,75; KH₂PO₄, 0,454; Na₂HPO₄.12H₂O, 2.388; CaCl₂ 1; pH 6.8) durante 6 dias, a 28°C, sob agitação pendular. Após extração, as células foram solubilizadas em SDS e a proteína total submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pelo método de Laemmli (1970) modificado por Jackmam (1987) e utilizado por Moreira et al. (1993). Os padrões eletroforéticos de proteínas dos isolados foram agrupados de acordo com a presença ou ausência de banda nos perfis.

2.8 Amplificação dos genes 16 rDNA e da região intergênica entre o 16S e o 23S rDNA

A amplificação foi efetuada num volume final de 50 µl contendo: 10 ul de suspensão bacteriana de colônia isolada de meio LN sólido (LO + 1 g L⁻¹

(NH₄)₂SO₄) e diluída em 1 ml de água ultra pura esterilizada (Purificador USF Elga - UHQ), 5 µL de Tampão (10X PCR Buffer concentração final 1,5 mMol L⁻¹), 0,2 mMol L⁻¹ de cada dNTP, 0,1 pmol/µL de cada iniciador (primers) e 1 U de TaqDNA polimerase. Com exceção dos iniciadores, provenientes do Departamento de Bioquímica da UFPR (Y1 e Y2) e da Escola Paulista de Medicina (p23 e pHr), todos os ingredientes utilizados foram da Pharmacia. Para amplificação do gene 16S rDNA foram utilizados os iniciadores Y1 (5' TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC3') e Y3 (5'CTGACCCCACTTCA GCATTGTTCCAAT3') (Young et al., 1991). Para a análise da região intergênica utilizou-se os iniciadores p23 (GGTTCCTTTTCACCTTCCCTC) e pHr (TGCGGCTGGATCACCTCCTT) (Massol-Deya et al., 1995; Honeycut, 1995, In: Akkermans et al., 1995). As reações foram realizadas em termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400) com o seguinte ciclo de temperaturas, para ambas as amplificações, 2 min 93°C, 34 ciclos de (45 s a 93°C, 45 s a 62°C e 2 min a 72°C), e 5 minutos a 72°C (Young et al., 1991). Após reação de amplificação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7% (~6V/cm 30min) e coradas com 0,5µg/mL de Brometo de etídeo para a verificação do tamanho e concentração do amplificado por comparação com padrões de peso molecular (1Kb Pharmacia).

2.9 Análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por enzimas de restrição nos produtos amplificados do rDNA 16S e da Região Intergênica entre o rDNA 16S e o 23 S

Aliquotas de 10 µl dos produtos amplificados foram adicionadas a uma quantidade de enzima (5 U por reação) tampão (One for all Buffer) e água ultra pura (Purificador USF Elga - UHQ) para um volume final de 15 µl. e incubadas a 37 °C por no mínimo 3 horas. Foram utilizadas as seguintes enzimas de restrição: *Hinf* I, (G'ANTC) *Rsa*I (GT'AC), *Alu*I (AG'CT) *Hae*III (GG'CC) e

MspI (C'CGG) (Laguerre et al 1994), sendo todas as enzimas e o Tampão da Pharmacia. O tamanho dos fragmentos de restrição obtidos de cada enzima foi comparado por eletroforese em gel de agarose 2,0% a 80 V por 2,30 horas coradas com Brometo de etídio por 20 minutos e fotografados sob luz UV. (Polaroid GelCam, Filtro Laranja 15) utilizando como referência padrões de peso molecular (100 Base-Pair Ladder -Pharmacia).

2.10 Sequenciamento do gene 16S rDNA

O sequenciamento completo do gene rDNA 16S foi feito no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná em Curitiba-PR por Leonardo Cruz, Doutorando do Curso de Pós Graduação em Bioquímica da UFPR. Para o sequenciamento foram utilizados os iniciadores (primers) Y1, 16S362f, 16S786f e 16S1203f para a fita inteira do DNA e os iniciadores Y3, 16S805r, 16S10110r e Y2 para o sequenciamento da fita reversa (Cruz, 2001) (Tabela 2).

TABELA 2. Iniciadores utilizados na amplificação e sequenciamento do rDNA 16S

Iniciador	Gene	Sequência (5'→ 3')	Referência
Y1	16S	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	Young et al. 1991
16S362f	16S	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	Cruz, 2001
16S786f	16S	CGAAAGCGTGGGAGCAAACAGG	Cruz, 2001
16S1203f	16S	GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC	Cruz, 2001
Y3	16S	TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC	Young et al. 1991
16S10110r	16S	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC	Cruz, 2001
16S805r	16S	GACTACCAGGGTATCTAATCCTG	Cruz, 2001
Y2	16S	CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	Young et al. 1991

O DNA bacteriano amplificado foi purificado em colunas de gel permeação Nucleon QC Clean-up Spin Column Kit (Amersham). Aliquotas de 1,0 a 1,5 ul do amplificado, 10 a 15 pmol do iniciador Y1, 6 a 8,0 ul de Ready

Reaction Cycle Sequencing Kit (PE Biosystem) e água ultrapura em volume final de 20 µl foram misturadas. A reação foi ao termociclador 25 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15s anelamento a 62 °C por 10s e extensão a 60 °C por 4min.

Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados com 4 volumes de isopropanol 75%, centrifugados (13.000 rpm, 25 min), lavados com etanol 70% e centrifugados novamente (13.000 rpm, 5 min), secos a vácuo até a leitura no sequenciador, quando foram diluídos em Blue Dextran/EDTA solubilizado em formamida deionizada. Foi utilizado o sequenciador automático ABI PRISM 377 *Genetic Analyzer* (PE Biosystem).

A sequência obtida foi alinhada com sequências de algumas bactérias obtidas no GenBank, utilizando o programa ClustalW, e foram comparadas através de parâmetros padrões formando a matriz (Tabela 1 no anexo).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características fenotípicas

Características morfológicas e bioquímicas

Através do microscópio de contraste-fase foi possível visualizar bactérias em forma de bastonetes com grânulos de poly-hydroxibutirato, refráteis neste tipo de microscopia (Figura 1).

As estirpes testadas utilizaram caseína, citrato de sódio, gluconato, frutose e glucose, porém o melhor crescimento foi obtido com lactato de sódio (Tabela 3). As estirpes não cresceram em manitol, arabinose, lactose e celulose e sacarose. A estirpe tipo de *A. caulinodans* testada obteve idênticos resultados e concordou com os resultados obtidos por Dreyfus et al.(1988).

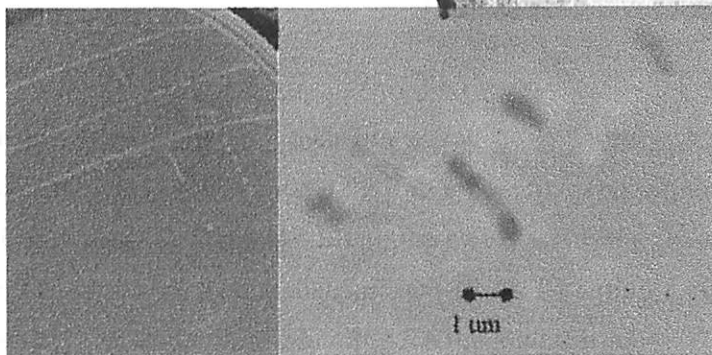


FIGURA 1. Colônias de *Azorhizobium* sp nov em meio YMA sólido e bactérias visualizadas em microscópio contraste fase.

Crescimento em meio livre de N_2 e atividade da nitrogenase

Em meio semi-sólido LO modificado e incubadas a 28 °C, todas as 30 estirpes de *Azorhizobium* sp nov e a estirpe tipo de *Azorhizobium caulinodans* cresceram formando película próxima à superfície, sendo que a película das estirpes de *Azorhizobium* sp nov demorou mais para se formar e chegar a superfície do meio de cultura (4 dias) do que a estirpe de *A. caulinodans* (2 dias) (Figura 2).

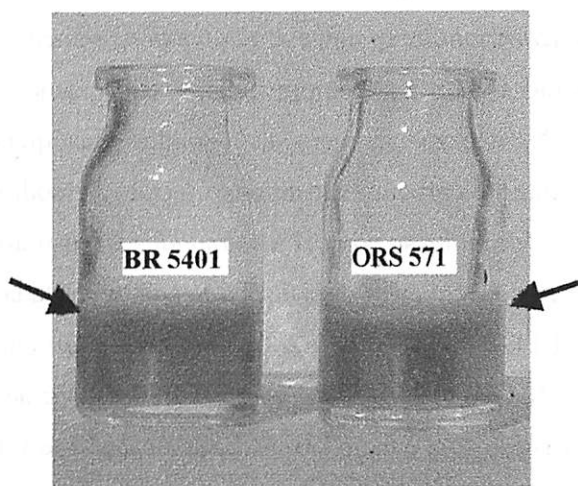


FIGURA 2. Película em meio semi sólido

Para *Azorhizobium* sp nov a atividade da nitrogenase avaliada pelo método de redução do acetileno foi de 13,7 nmol as 72 horas para a estirpe BR 5401, 19,0 nmol as 96 horas para a estirpe BR 5414, e 10,8 nmol as 96 horas de incubação para a estirpe UFLA 01-606, enquanto que para as estirpes tipo de *A. caulinodans* o valor máximo de ARA foi de 55,7 nmol as 120 horas de incubação (Figura 3). Em meio LO sólido, todas as três estirpes testadas cresceram absorvendo indicador (Azul de bromotimol) e alcalinizando o meio de cultura.

Foi detectada atividade da nitrogenase somente para as estirpes de *Azorhizobium* sp nov. (BR 5401, BR 5414, e UFLA 01-602) que após 72 horas de incubação, atingiu o máximo de 14,0 nmol de C_2H_4 . Para ORS 571 estirpe representante de *A. caulinodans* e estirpes tipo e rizóbios dos outros gêneros testados *Bradyrhizobium elkani* (USDA 76^T) e *Mesorhizobium loti* (NZP 2213^T) *Sinorhizobium meliloti* (NZP 4027^T), *Rhizobium tropici* (CIAT 899^T), não foi observado crescimento nem atividade da nitrogenase.

O teste em meio sólido em placa sem fonte de nitrogênio resultou no crescimento das *Azorhizobium* sp nov e *A. caulinodans* semelhante ao meio com fonte de nitrogênio (NH_4SO_4), comprovando a capacidade deste gênero de rizóbio de fixar N_2 não só em meio semi-sólido. Mas quando manitol foi utilizado como fonte de carbono, substituindo lactato de sódio, o crescimento das estirpes de *Azorhizobium* sp nov e *A. caulinodans* foi insignificante.

Todas as cinco estirpes de *Azorhizobium* sp nov. testadas (BR 5401, BR 5414, BR 5425, UFLA 01-51B e UFLA 01-606) cresceram em LO adicionado de 8% de KNO_3 e NaCl 1,0; 3,0 e 5,0%, assim como a estirpe de *A. caulinodans*. O mesmo foi observado para o meio LB. A desnitrificação não foi observada para as estirpes testadas das duas espécies (Tabela 3). Quanto à temperatura observou-se o crescimento a 12 e 35°C mas a 44°C as estirpes de *Azorhizobium* sp nov não cresceram (Tabela 3), somente *Azorhizobium caulinodans*.

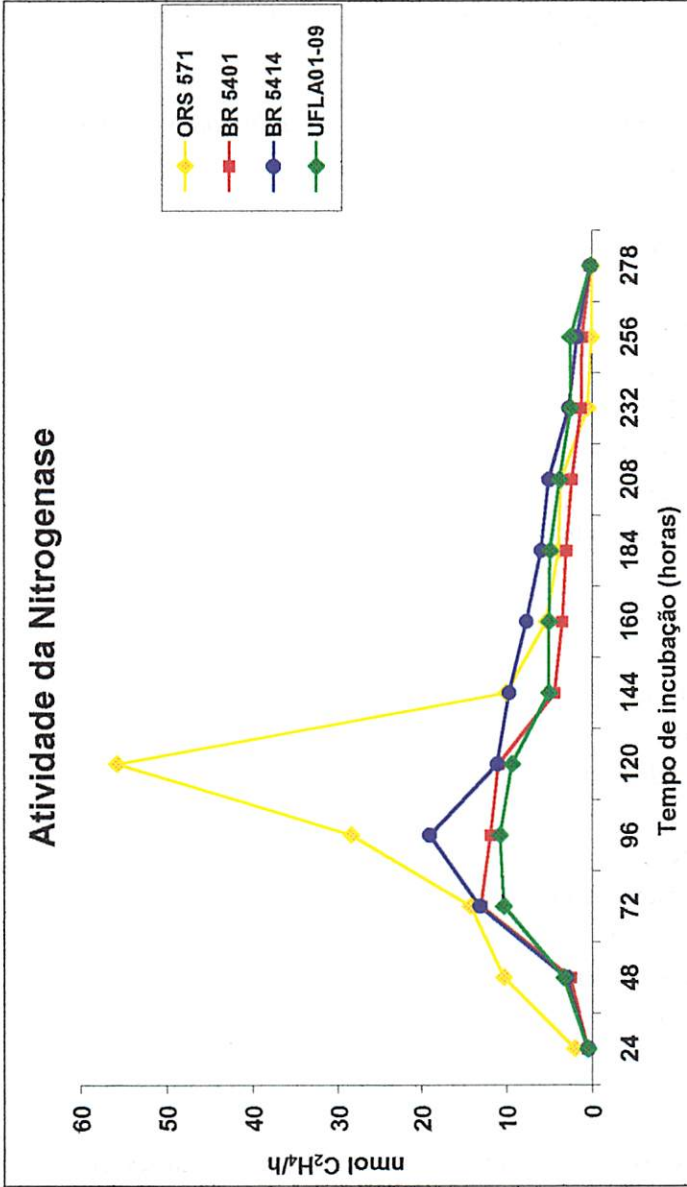


FIGURA 3. Atividade da nitrogenase em estirpes de *Azorhizobium caulinodans* (ORS 571) e *Azorhizobium* sp nov. (BR 5401, BR 5414 e UFLA 01-09)

concordando com Dreyfus et al., (1988) que relatou o crescimento de *A. caulinodans* na temperatura de 44° C.

TABELA 3. Características fenotípicas de *Azorhizobium* sp nov e *A. caulinodans*.

Característica	<i>A. caulinodans</i>	<i>Azorhizobium</i> sp nov
Crescimento em 12°C	+	+
em 44°C	+	-
Em pH 8,0	+	+
pH 5,0	+	+
5,0 % NaCl	+	+
8,0 % KNO ₃	+	+
Meio LB	+	+
Fonte de carbono:		
manitol	-	-
lactato de sódio	+	+
caseína	+	+
gluconato	+	+
lactose	-	-
arabinose	-	-
celulose	-	-
citrato de Sódio	+	+
frutose	+	+
sacarose	-	-
Alcalinização da Glucose	+	+
Denitrificação	-	-
Fixação de N ₂ em meio de cultura	+	+

Foi observado o crescimento de todas as estirpes em pH 5, 6, 8 e 9, sendo que para pH 6,0 e 8,0 a película se formou com antecedência e foi mais espessa que para os demais pH testados (Tabela 3).

Perfis de proteína

Os padrões de proteína total das 30 estirpes isoladas de *S. virgata* deste trabalho formaram 3 grupos (Figura 4) distintos entre si e dos padrões das outras espécies analisadas. As diferenças encontradas entre as estirpes restringiram-se a maior intensidade em uma banda do perfil do grupo 1 em relação ao grupo 2 e 3, e grupo 3 formado por uma única estirpe apresentou duas bandas mais fortes em relação ao grupo 1 e 2 (Figura 5).

Moreira et al. (1993) realizaram as primeiras comparações entre os padrões de proteína total das estirpes *Azorhizobium* sp. nov. BR 5401 e BR 5404, estirpe representante de *Azorhizobium caulinodans* e estirpes de outras espécies já descritas de rizóbio.

Mais tarde Dupuy et al. (1994) caracterizando estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de Acacia e De Lajudie et al (1994) descrevendo novas espécies de *Sinorhizobium* também utilizaram as estirpes de *Azorhizobium* sp. nov. BR 5401 e BR 5404, em suas comparações de perfis de proteína total.

Em todos estes trabalhos que no total somaram mais de 400 estirpes de rizóbio analisadas entre representantes dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e isolados ainda não identificados, os padrões de proteínas das estirpes de *Azorhizobium* sp. nov. diferiram dos demais constituindo em grupo único e distante de *Azorhizobium caulinodans*.

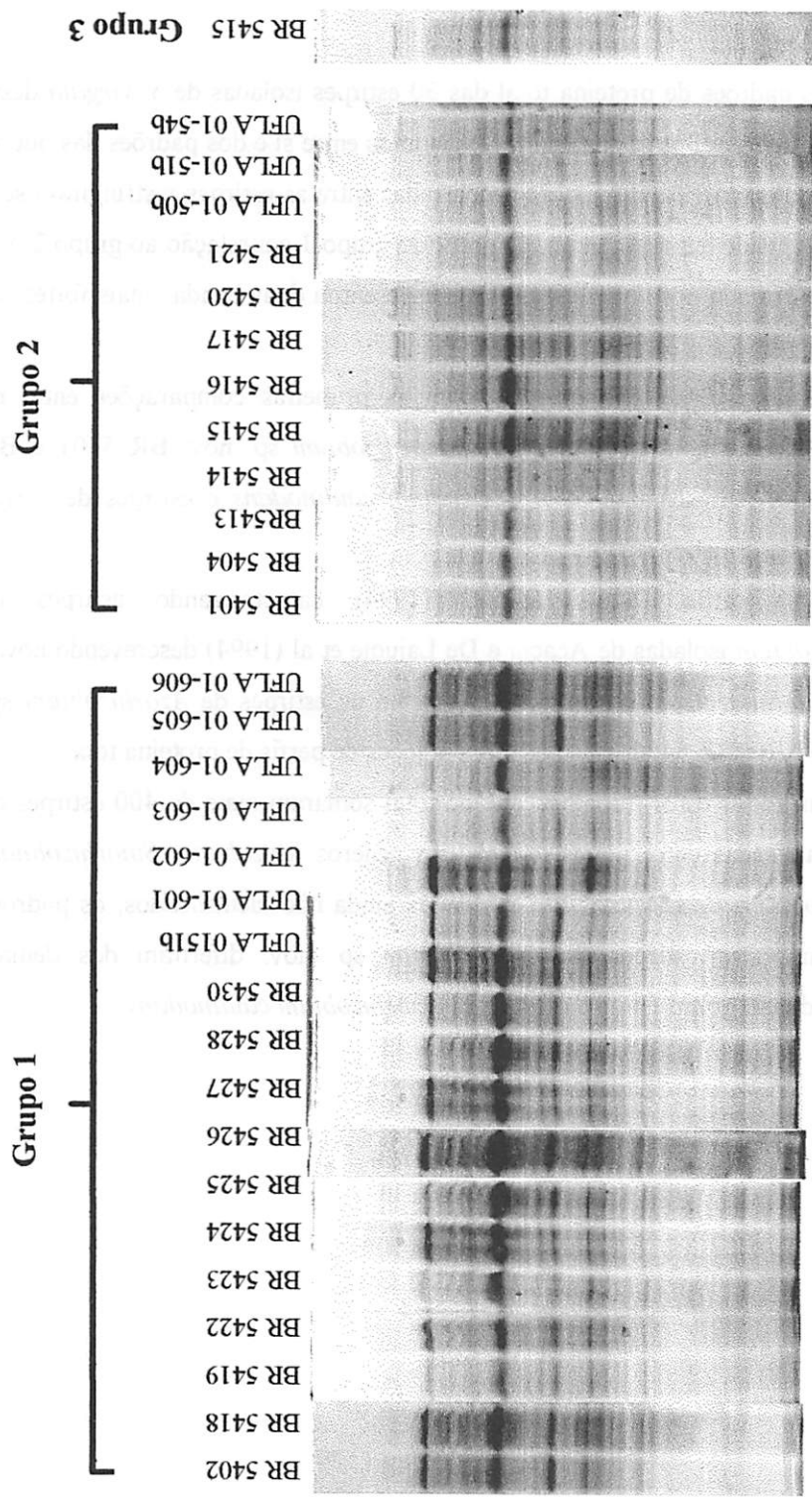


FIGURA 4. Grupos de perfis de proteína total das estirpes isoladas de *Sesbania virgata*

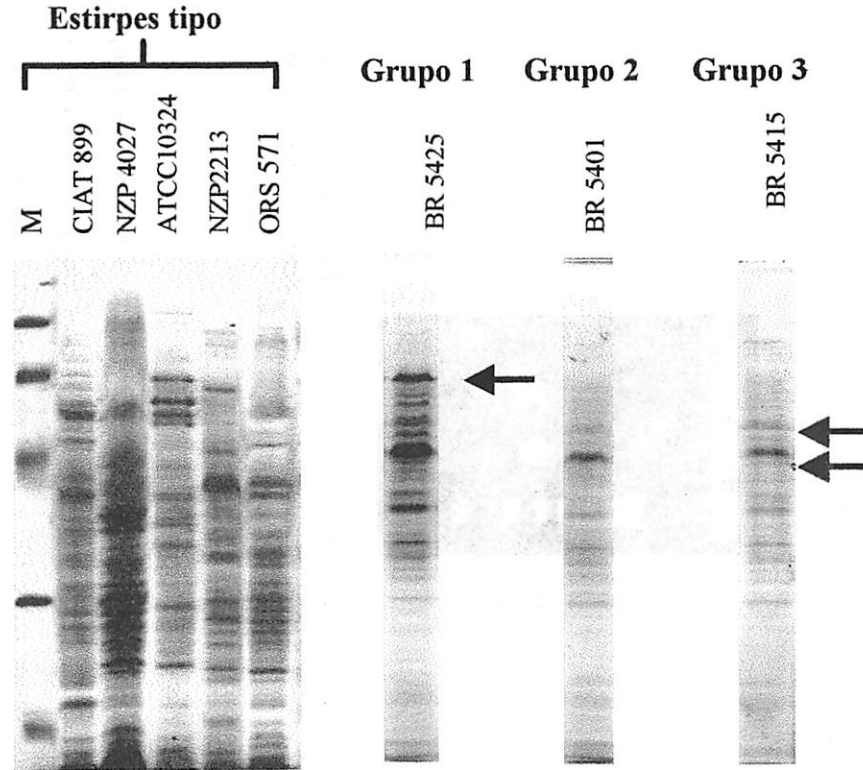


FIGURA 5 Grupos de perfis de proteína total das estirpes isoladas de *Sesbania virgata* M=Marcador,(Albumina- Pharmacia) CIAT 899: *Rhizobium tropici*,; ATCC10324 *Bradyrhizobium japonicum*, NZP 4027 *Sinorhizobium meliloti*, NZP 2213: *Mesorhizobium loti*, ORS 571 *Azorhizobium caulinodans* Grupos 1,2 e 3 *Azorhizobium* sp nov. as flechas indicam as bandas diferentes entre os três grupos.

3.2 Características genotípicas

Amplificação do gene rDNA 16S e da região 16S-23S rDNA

A amplificação do 16S rDNA, utilizando os iniciadores Y1 e Y3 dos 30 isolados produziu fragmento único de tamanho molecular aproximado de 1,4 kb, o mesmo tamanho obtido na amplificação da região intergênica com os iniciadores específicos (pHr e p23) (Figura 6).

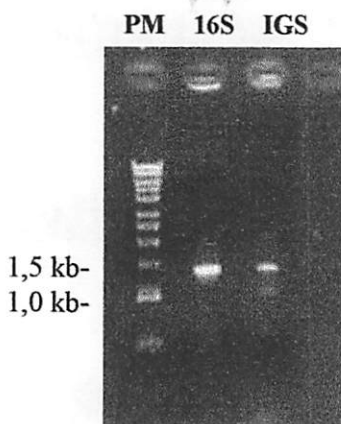


FIGURA 6. Produto da amplificação por PCR do gene 16S e Região intergênica da estirpe BR 5401 *Azorhizobium* sp nov.

Análise dos perfis de restrição

A restrição dos produtos de amplificação do 16S rDNA das estirpes com as endonucleases produziu, de 3 a 6 fragmentos visíveis, separados por peso molecular que variou entre 100 e 1400 pb, conforme a endonuclease e a estirpe analisada. Os fragmentos produzidos por uma endonuclease específica apresentam um padrão de bandas, denominado perfil de restrição representado por letras minúsculas nas Tabela 4 e 5. Os perfis de restrição foram comparados visualmente para o agrupamento dos isolados de *S. virgata* e estirpes de referência.

Os padrões das 30 estirpes de *Azorhizobium* sp. nov. foram idênticos e situaram-se ente 100 e 1000 pb. Os padrões de restrição do rDNA 16S de *A. caulinodans* e *Azorhizobium* sp nov diferiram para as enzimas *Alu I* e *Rsa I* (Figuras 7) e foram idênticos para as enzimas *Msp I*, *Hinf I* e *Hae III* (Figura 8). Para as estirpes tipo incluídas foram detectadas diferenças dos padrões em todas as enzimas testadas. Já para a região intergênica as diferenças foram detectadas por três enzimas de restrição *Alu I*, *Msp I*, *Hae III* (Figura 9), enquanto que para as demais enzimas utilizadas os padrões foram idênticos (*Rsa I* e *Hinf I*) (Figura 10). Os fragmentos da região intergênica obtidos, em número de 3 a 5, variaram de 100 a 900 pb de extensão de acordo com a enzima e estirpe analisada.

TABELA 4. Análise dos perfis restrição 16S rDNA estirpes de *Azorhizobium* sp nov e *A. caulinodans*.

Estirpes	Perfis de Restrição				
	<i>Alu I</i>	<i>Rsa I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Msp I</i>	<i>Hae III</i>
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	a	a	a	a	a
<i>Mesorhizobium loti</i> . NZP 2213	b	b	b	b	b
<i>Sinorhizobium meliloti</i> NZP 4027	c	c	c	c	c
<i>Bradyrhizobium.elkani</i> USDA 76	d	d	d	d	d
<i>A. caulinodans</i> ORS 571	e	e	e	e	e
<i>Azorhizobium. sp nov.</i>	f	f	e	e	e

TABELA 5. Análise dos perfis de da Região Intergênica (16S-23S rRNA) das estirpes de *Azorhizobium* sp nov e *A. caulinodans*.

Estirpes	Perfis de Restrição				
	<i>Alu I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Msp I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Rsa I</i>
<i>A. caulinodans</i> ORS 571	a	a	a	a	a
<i>Azorhizobium sp nov.</i>	b	b	b	a	a

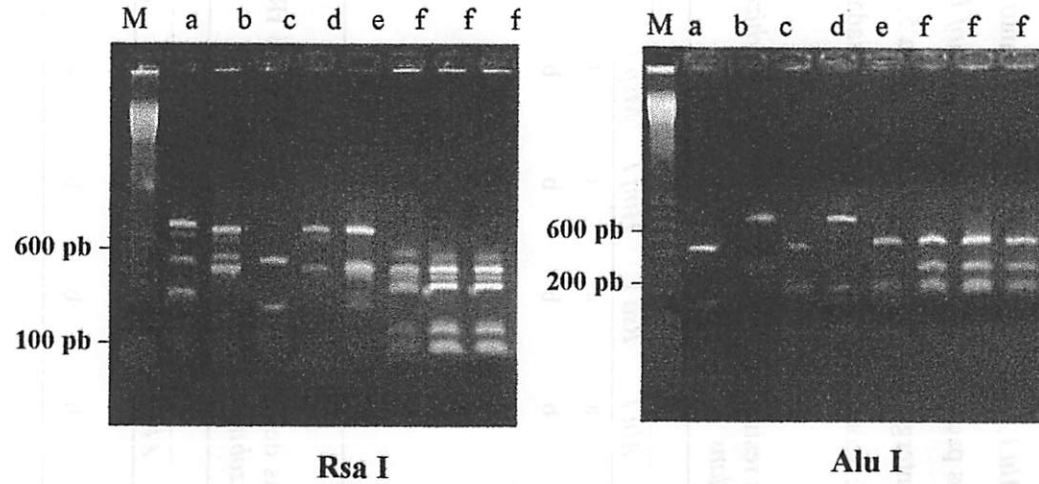


FIGURA 7- 16S rDNA digerido com endonucleases de restrição Rsa I e Alu I. M=marcador (100 Base-Pair Ladder -Pharmacia).a= *Rhizobium tropici* , b= *Mesorhizobium loti*, c= *Sinorhizobium meliloti*, d= *Bradyrhizobium.elkani*, e= *A. caulinodans*, f= *Azorhizobium. sp nov.*

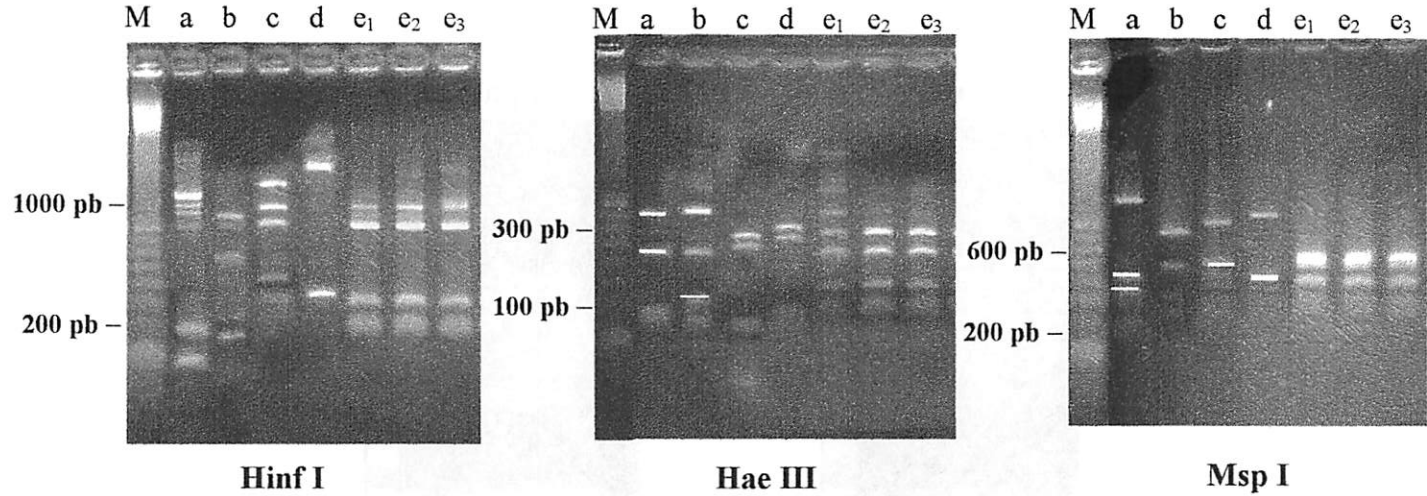


FIGURA 8- 16S rDNA digerido com endonucleases de restrição *Hinf I*, *Hae III* e *Msp I*. M=marcador (100 Base-Pair Ladder -Pharmacia). a= *Rhizobium tropici*, b= *Mesorhizobium loti*, c= *Sinorhizobium meliloti*, d= *Bradyrhizobium. elkani*, e= *A. caulinodans*, e₁, e₂, e₃= *Azorhizobium. sp nov.*

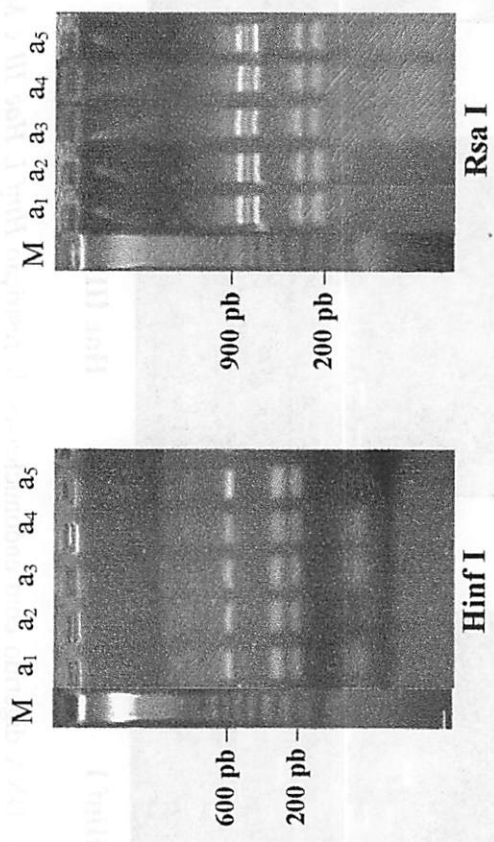


FIGURA 9 -Região Intergênica (rDNA 16S-23S) digerida com endonuclease de restrição *Hinf I* e *Rsa I*. M= marcador (100 Base Pair Leader Pharmacia). a₁= *A. caulimodans*, a₂, a₃, a₄, a₅=*Azorhizobium* sp. nov.

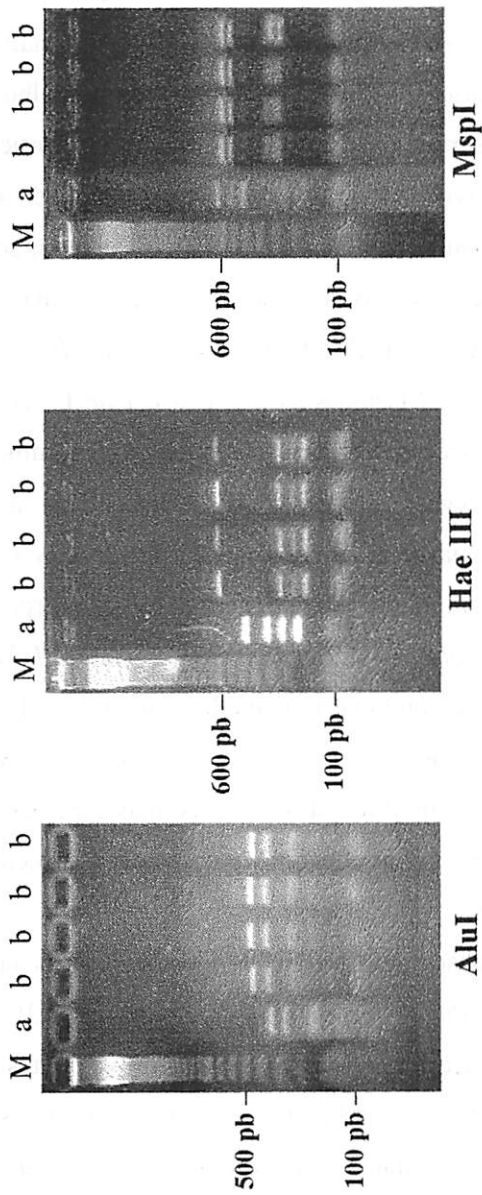


FIGURA 10- Região intergenica (rDNA 16S-23S) digerida com endonuclease de restrição *Alu I*, *Hae III* e *Msp I*. M= marcador (100 Base Pair Leader-Pharmacia). a= *A. cauliodans*, b=*Azorhizobium* sp. nov.

Os padrões de restrição do rDNA 16S de *A. caulinodans* e *Azorhizobium* sp nov diferiram para duas das enzimas cinco testadas, *Alu I* e *Rsa I*. Laguerre et al. (1994) necessitaram de no mínimo de 4 enzimas das 9 utilizadas, (combinações entre *Hinf I*, *Msp I*, *Rsa I*, *Cfo I* e *Nde II*) para identificar o taxon das estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* através de análise de RFLP do 16S rDNA, mas ao contrário destes pesquisadores, neste trabalho as enzimas, *Hinf I*, *Msp I*, não foram discriminatórias, produzindo perfis idênticos entre as estirpes de *Azorhizobium* sp nov e *A. caulinodans*. O maior poder de discriminação da região Intergênica (Gurter e Stanisch, 1996) foi confirmado pelas diferenças entre as duas espécies, quando detectadas por três enzimas de restrição, *Alu I*, *Msp I*, *Hae III*. Laguerre et al.(1996) elegeram *Hae III* como a enzima mais discriminatória entre as 7 testadas (*Alu I*, *Cfo I*, *Dde I*, *Msp I*, *Nde II*, *Taq I* e *Hae III*) na caracterização de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* baseada nos perfis de RFLP-da região intergênica. A utilização da análise de perfis de restrição combinada das regiões genômicas rDNA 16S e região intergênica (16S-23S) resultou em cinco perfis diferentes das estirpes de *Azorhizobium caulinodans* e *Azorhizobium* sp nov. para as enzimas *Alu I*, *Msp I*, *Hae III* e *Rsa I* comprovando ser esta combinação mais discriminatória (Laguerre et al., 1996, Vinuesa et al., 1998) que somente a análise do rDNA, 16S onde apenas duas enzimas produziram perfis diferentes entre as duas espécies (*Alu I*, *Hae III*). A enzima *Hinf I* produziu perfis idênticos para as duas espécies nas duas regiões genômicas analisadas.

Não foram observadas variações intraespecíficas entre as 30 estirpes analisadas de *Azorhizobium* sp nov. com o método de RFLP do gene rDNA 16S ou da região intergênica, mesmo entre estirpes provenientes de diversos locais. Neste aspecto, a análise de perfil de proteínas totais, foi mais discriminatória, já que analisa o fenótipo resultante do genótipo inteiro e não de regiões específicas como o gene rDNA 16S ou o espaço rDNA 16S-23S.

Sequenciamento do gene rDNA 16S

O sequenciamento da região rDNA 16S obteve 1387 pares de base.(Anexo) A sequência obtida foi comparada com sequências de estirpes tipo de rizóbios já descritos e outras bactérias filogeneticamente correlacionadas através do banco de dados do GeneBank.

A sequência de 16S r DNA da estirpe BR 5401 obtida foi comparada com outra sequências próximas depositadas do GeneBank via internet (www.ncbi, 2001) utilizando-se o programa Blast que permite a comparação entre sequências de nucleotídeos. Foram utilizados os parâmetros padrões de análise, pré-definidos no programa e o banco de dados de sequências não redundantes (nr), contendo 852.500 sequências no momento da pesquisa (Cruz, 2001).

No sequenciamento parcial (230 pares de bases) feito por Moreira et al., (1998) a estirpe BR 5401 de *Azorhizobium* sp nov obteve 8 pares de bases de diferença com *A. caulinodans*. Para as 1387 bases nitrogenadas pareadas, 29 bases diferiram.

A comparação de nucleotídeos revelou a relação próxima entre *Azorhizobium* sp nov e *A. caulinodans* com 97,9 % (Tabela em anexo) de similaridade (28 diferenças para as 1387 bases). Embora não existam valores de homologia entre sequências de rDNA 16S pré definidos na literatura para determinar o limite entre espécies ou qualquer grupo taxonômico (Cruz, 2001), Stackbrandt e Goebels, (1994) sugerem que quando a similaridade entre as sequências do 16S rDNA de duas espécies for maior ou igual a 97% a reassociação DNA-DNA deve ser usada para a determinação das espécies.

Alem da proximidade com *Azorhizobium caulinodans* a sequência da estirpe BR 5401 da nova espécie de *Azorhizobium* revelou alta homologia com bacterias do gênero *Xanthobacter* (entre 96% e 97,6) (Tabela em anexo) em especial *Xanthobacter flavus* de 97,4 % valor próximo a homologia com

Azorhizobium caulinodans Esta similaridade já tinha sido mencionada por Moreira et al (1998) no sequenciamento parcial de rizóbios isolado no Brasil.

Xanthobacter flavus (Malik e Claus, 1979) é uma espécie fixadora de nitrogênio, de vida livre. Análises de perfis de proteína total (Dreyfus et al., 1988), de sequenciamento do gene rDNA 16S e de hibridização DNA-rRNA demonstraram a íntima relação filogenética deste gênero com o gênero *Azorhizobium* (Young, 1992.)

4. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos nas análises fenotípicas e genotípicas realizadas pode-se inferir que os isolados dos nódulos de *S. virgata* formam um grupo fenotipicamente e genotipicamente distinto das espécies atualmente descritas de rizóbio. Possui algumas características semelhantes as de *Azorhizobium caulinodans*, mas diferenças foram encontradas nos perfis de proteínas totais, perfis de restrição com endonucleases para região do rDNA 16S e região intergênica e no sequenciamento do gene rDNA 16S.

A pesquisa de homologia e análise filogenética da sequência Y1-Y3 do rDNA 16S demonstrou que a estirpe representante do grupo pesquisado está localizada filogeneticamente na subdivisão alfa das Proteobacterias, próxima à *Azorhizobium caulinodans* e *Xanthobacter flavus*.

O grupo de estirpes aqui estudado pode ser descrito como nova espécie de rizóbio, porque vive em simbiose com leguminosa, fixando nitrogênio e é geneticamente relacionada com *Azorhizobium caulinodans*, nodulando eficientemente o mesmo gênero de leguminosa, porém em espécie diferente.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D.; BRUIJIN, F.J. **Molecular Microbial Ecology Manual**. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 1995.
- BARBERI, A.; CARNEIRO, M.A.C; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O .
Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas gerais.
Cerne, Lavras v.4, p. 145-153, 1998.
- CAMPELO, A.B. **Caracterização e especificidade de Rhizobium spp de leguminosas florestais**. Tese de Mestrado, Rio de Janeiro, UFPR, 1976. 122p.
- CRUZ, L. **Caracterização e análise filogenética molecular de novos isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio**. Curitiba, UFPR 2001, Departamento de Bioquímica. 168p. (Tese de Doutorado).
- DANGEARD, P.A. **Recherches sur les tubercles radicaux dees légumineuses**. Paris, 1926. 270p. (Le Botaniste, Séries 16).
- DE BRUIJIN, F.J.; DAVEY, M.E.; McSAPADDEN-GARDENER, B.; MILLCAMPS, A.; RADEMAKER, J.L.W.; RAGATZ, M.L.; SCHULTZ, P.; STOLTZFUZ, J. Molecular approaches in microbial ecology to assess genomic diversity and stress-induced gene expression in plant-associated diazotrophs. In ELMERICH, et al.,(eds). **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Netherlands: Kluwer, 1998. p. 571-576.
- De LAJUDIE, P de; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of Rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp nov., and *Sinorhizobium teranga* sp nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington v.44, p. 715-733, 1994.
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasterianum*. **Biochem. Biophys. Acta**, v.127, p.285-294, 1966.

- DREYFUS, B.L.; ELMERICH, C.; DOMMARGUES, Y.R. Free-living rhizobium strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.45, p 711-713, 1983.
- DREYFUS, B. La symbiose entre *Rhizobium* et *Sesbania rostrata* légumineuse à nodules caulinares. Paris, Université du Paris. 1982. (Tese de Doctorat.).
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; 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*, Washington, v. 38., p. 89-98. 1988.
- DUPUY, N.; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDERBRUAENE, I.; MAESTROJUAN, G.; DREYFUS, B.; KERSTER, K.; COLLINS, M.D.; GILLIS, M. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.44, p. 461-473, 1994.
- FARIA, S.M. Isolamento de estirpes de rizóbio de nódulos de *S. virgata* no estado do Rio de Janeiro, 1996
- FARIA, S.M.; LIMA, H.C.; OLIVARES, F.L.; MELO, R.B.; XAVIER, R.P. Nodulação em espécies florestais especificidade hospedeira e implicações na sistemática de Leguminosae. In: *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. eds: SIQUEIRA, J.O. MOREIRA, F.M.S., LOPES, A.S. GUILHERME, L.R.G. FAQUIN, V. FURTINI NETO, A.E. CARVALHO J.G. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Universidade Federal de Lavras- Departamento de Ciência do Solo Lavras- MG 1999, p.667-686.
- GONÇALVES, M. Especificidade de estirpes de *Azorhizobium* sp nov. na simbiose com *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2000.
- GURTLER, V.; STANISCH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, v.142, p. 3-16, 1996.
- JACKMAN, P.J.H. Microbial systematics based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: COLWEL, R.R.; GRIGORAVA, R. (eds). *Methods in soil microbiology e biochemistry*. London, Academic Press, 1987.

- JARVIS, B.D.W.; PANKHURST, C.E.; PATEL, J.J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 32, p. 378-380, 1992.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae, In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G.(eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore, Williams e Wilkins, 1984, p.234-244.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan, 1982 and proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 501-505, 1992.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v227, p.680-685, 1970.
- LAGUERRE, G.; BARDIN, M.; AMARGUER, N. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hybridization. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, p.1142-1149, 1993.
- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P. ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprint and PCR-Restriction fragment polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p 2029-2036, 1996.
- MALIK, K.A.; CLAUS, D. *Xanthobacter flavus* a new species of nitrogen-fixing hydrogen bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington , v. 29, p.283-287, 1979.
- MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.B.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a new species nodulating *Phaseolus vulgaris* L Beans and *Leucena* trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington ,v. 41, p. 417-426, 1991.
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K. FRANCO, A. Characterization of Rhizobia Isolated from Different Divergence Groups of Tropical Leguminosae by Comparative Polyacrylamide Gel

Electrophoresis of their Total Proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, 16: 135-146, 1993.

MOREIRA, F.M.S.; MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; FRANCO, A.A. Genetic diversity of rhizobia and bradyrhizobia from native tropical species characterized by multilocus enzyme electrophoresis, p 88. In 7th **International Symposium of Microbial Ecology Abstracts**, Santos SP Brazil, 1995.

MOREIRA, F.M.S.; HAUKKA, K.; YOUNG, P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brasil. **Molecular Ecology**, 7, 04-11, 1998.

STACKBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and rDNA 16S sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington , v. 44, p. 846-849, 1994.

VICENT, J.M. **A Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. IBP Handbook No. 15. Blackwell Scientific, Oxford, UK, 1970.

YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L. EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain Btail by polymerase chain reaction-based sequencing of 16S rRNA gene segment. **Journal Bacteriology**, Oxford, v.173, p. 2271-2277, 1991.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R.M.; EVANS, H.S. **Biological Nitrogen Fixation**. Chapman e Hall, New York, 1992, 943p.

ANEXO

ANEXOS

	Página
	Sequenciamento das bases da estirpe BR 5401T e alinhamento com outras espécies de bactérias..... 65
TABELA 1	Matriz de identidade das seqüências de rDNA 16S 71

Alinhamento entre seqüências de 16S rDNA do isolado BR5401 e algumas espécies da subdivisão alfa das Proteobactérias. As seqüências foram alinhadas no programa ClustalW, entre as regiões dos "primers" Y1 e Y3 (os "primers" foram excluídos). Os pontos indicam a ocorrência de uma base idêntica a da seqüência do BR5401; traços indicam "gaps"*

```

                20                40                60                80
BR5401          :AGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGCCAGC---AATGGGA--GCGGCAGACGGGTGAGTAACCGCGTGGGGATCTGCCCA.
Xanthobacter_agilis          :.....A.....
Xanthobacter_autotrophicus   :.....A.....A...
Xanthobacter_flavus          :.....A.....A...
Xanthobacter_tagetidis       :.....T
Rhizobium_leguminosarum      :...T.....C....G.....A.CG.A..T
Mesorhizobium_loti           :...T.....TC....GA....A...A...
Sinorhizobium_fredii         :...T.....C....G....A...A..T
Azorhizobium_caulinodans     :.....
Bradyrhizobium_japonicum     :...T.....GG-C.TAGC..AC.TCA.....A CG.A..TT

```

```

                100                120                140                160
BR5401          :ATGGTACGGGAATAACCCAGGGAACTTGGATTAATACCGTATGTGCCCTT-CGGGGGAAAGATTTATCGCCATTGGATGA
Xanthobacter_agilis          :T.....C.....AA.....A.....
Xanthobacter_autotrophicus   :.....C.....-.....
Xanthobacter_flavus          :.....-.....
Xanthobacter_tagetidis       :T.....C.....-.....AA
Rhizobium_leguminosarum      :T.AC.....G.....TGC.....-T.....GT.AA...CG
Mesorhizobium_loti           :TCTC.....C...T.C.....G.AGC.....AC.T...-.....GAGA.....
Sinorhizobium_fredii         :T TC.....G.....TGC.....A.....-.....GG.AA.....
Azorhizobium_caulinodans     :...G.....-.....C.....-.....C.
Bradyrhizobium_japonicum     :T...T...C...A.....TGC.....G.AA...A...A...-.....GAAA...CG

```

```

                180                200                220                240
BR5401          :ACCCGCGTCGGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
Xanthobacter_agilis          :.....G.....T.....
Xanthobacter_autotrophicus   :.....A.....T.....
Xanthobacter_flavus          :.....A.....T.....
Xanthobacter_tagetidis       :.....T.....G.....T...C.....A.....
Rhizobium_leguminosarum      :G.....T.....G.....CT.....A.....
Mesorhizobium_loti           :G.....T.....G.....T...CT.....A.....
Sinorhizobium_fredii         :G.....T.....G.....CT.....A.....
Azorhizobium_caulinodans     :.....T.....A.....T.....A.....
Bradyrhizobium_japonicum     :G.....T.....AG.....T...CT.....A.....

```

	260	280	300	320
BR5401	:CACACTGGGACTGAGACACGGCCGACTCCTACGGGAGGCAGTCAGTGGGGAAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATT			
Xanthobacter_agilis	:.....			C
Xanthobacter_autotrophicus	:.....			C
Xanthobacter_flavus	:.....			C
Xanthobacter_tagetidis	:.....		A	C
Rhizobium_leguminosarum	:...T.....A.....			C
Mesorhizobium_lotii	:.....			C
Sinorhizobium_fredii	:...T.....A.....			C
Azorhizobium_caulinodans	:.....			C
Bradyrhizobium_japonicum	:...T.....A.....		G...C	C

	340	360	380	400
BR5401	:CAGCCATGCCCGTGTGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCGGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAG			
Xanthobacter_agilis	:.....A.....	T		
Xanthobacter_autotrophicus	:.....			
Xanthobacter_flavus	:.....A.....	T		
Xanthobacter_tagetidis	:.....A.....	T		
Rhizobium_leguminosarum	:.....A.....C.....	T	A..A	T
Mesorhizobium_lotii	:.....A.....C.....	T	AA	T
Sinorhizobium_fredii	:.....A.....C.....	T	A	
Azorhizobium_caulinodans	:.....A.....	T		
Bradyrhizobium_japonicum	:.....A.....C.....	T	T.TGC.G	C.GCA...T

	420	440	460	480
BR5401	:AAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCG			
Xanthobacter_agilis	:.....		T	
Xanthobacter_autotrophicus	:.....		T	
Xanthobacter_flavus	:.....		T	
Xanthobacter_tagetidis	:.....		T	
Rhizobium_leguminosarum	:.....		T	T
Mesorhizobium_lotii	:.....		T	T
Sinorhizobium_fredii	:.....		T	T
Azorhizobium_caulinodans	:.....		T	T
Bradyrhizobium_japonicum	:.....		T	G

```

                    500                520                540                560
BR5401              :TACGTAGCGGGTCTTAAGTCA-GGGGTGAAATCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCCTTGATACTGGCGATCTTGAG
Xanthobacter_agilis :C.....A.....-.....G.....CT.....C...
Xanthobacter_autotrophicus :C.....T.....-A.....T.....C...
Xanthobacter_flavus :C.....A.....-.....C...
Xanthobacter_tagetidis :C.....A.....-.....C...
Rhizobium_leguminosarum :C.....A..A.C...-.....CA.G.....C.TG...T.....T.....G...
Mesorhizobium_loti :C.....A.AC.....-.....C..G.....C..G.....T.....GT...C...
Sinorhizobium_fredii :C.....ACAT.....-.....C..G.....C..G.....T.....GTG...A...
Azorhizobium_caulinodans :C.....A.....A.....G...-.....T.....
Bradyrhizobium_japonicum :.G.....T.....-.....T.....AA.....

```

```

                    580                600                620                640
BR5401              :TTCGAGAGAGGTTGGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGCAAGAACCACAGTGGCGAAGGCGGGC
Xanthobacter_agilis :.....C.....G.....
Xanthobacter_autotrophicus :.....
Xanthobacter_flavus :.....C.....G.....
Xanthobacter_tagetidis :.....C.....G.....
Rhizobium_leguminosarum :.AT.GA.....GA.....T.C.....G.G.....T
Mesorhizobium_loti :.C..GA.....GA.....T.C.....G.G.....T
Sinorhizobium_fredii :.C..GA.....GA.....T.C.....G.G.....T
Azorhizobium_caulinodans :.....C.....G.....
Bradyrhizobium_japonicum :...G.....GA.....T

```

```

                    660                680                700                720
BR5401              :AACTGGCTCTGATACGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
Xanthobacter_agilis :.....G.....
Xanthobacter_autotrophicus :.....G.....
Xanthobacter_flavus :.....G.....
Xanthobacter_tagetidis :.....G.....
Rhizobium_leguminosarum :C....TC.AT.....G.....
Mesorhizobium_loti :C....TC..G.....G.....
Sinorhizobium_fredii :C....TC..G.....G.....
Azorhizobium_caulinodans :.....G.....
Bradyrhizobium_japonicum :C.....C.....C.....

```

```

                                740                                760                                780                                800
BR5401 :CGATGGATGCTAGCCCTTAGGCAGCTTGCTGCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGTC
Xanthobacter_agilis :.....G..AG.....CTT.C.....C.....
Xanthobacter_autotrophicus :.....
Xanthobacter_flavus :.....G..GG.T..A.CT..C.....C.....
Xanthobacter_tagetidis :.....G..GG.T..A.CTT.C.....C.....
Rhizobium_leguminosarum :.....A..T.....CG.....TA.A..T.CG.....NN.....A..T.....
Mesorhizobium_loti :.....A.....G.CA..T..A..TG.CG.....T.....
Sinorhizobium_fredii :.....A..T.....CG.....T..A..T.CG.....NN.....A..T.....
Azorhizobium_caulinodans :.....A.....G..G.....CT.C.....CG.....C.....
Bradyrhizobium_japonicum :.....A...C.....TGG.T..A..CAC.....T.....T.....

```

```

                                820                                840                                860                                880
BR5401 :GCAAGATTAAACTCAAAGGAATTTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCRACGGCGCAG
Xanthobacter_agilis :.....
Xanthobacter_autotrophicus :.....
Xanthobacter_flavus :.....
Xanthobacter_tagetidis :.....
Rhizobium_leguminosarum :.....
Mesorhizobium_loti :.....
Sinorhizobium_fredii :.....
Azorhizobium_caulinodans :.....
Bradyrhizobium_japonicum :.....C.....

```

```

                                900                                920                                940                                960
BR5401 :AACCTTACCAGCCTTTGACATGGCA--GGACGACTCCGGAGACGGATTTCTTCCAGCAATG--GACCTGCACACAGGTGC
Xanthobacter_agilis :.....-.....T...A...T...C.....--.....
Xanthobacter_autotrophicus :.....-.....T...A...T...C.....--.....
Xanthobacter_flavus :.....-.....-.....-.....-.....
Xanthobacter_tagetidis :.....-.....-.....-.....-.....
Rhizobium_leguminosarum :.....C.....C.CG.CT--...G.A...T.C.AGG--..CCTTCG.-G...G.G.....
Mesorhizobium_loti :.....C.....CC.GGTCG..GT...A...T...AC...-..TTCG.CT.GA.C.GTG.....
Sinorhizobium_fredii :.....C.....CC.GATGG..GA.A.GA...TC.TA.C...-..TTCG.CT.GATC.G.G.....
Azorhizobium_caulinodans :.....-.....-.....-.....-.....
Bradyrhizobium_japonicum :.....C.....T.CA...CGG.CG.A...TGACC--..TCTTCG.A-.C.TG.A.....

```

	980	1000	1020	1040
BR5401	:ATGGCTGTCGTCAGCTC	CGTGC	GATGTTGGGTTAAGT	CCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCTTTAGTTGCCATCAT
Xanthobacter_agilis	:	:	:	C.....
Xanthobacter_autotrophicus	:	:	:	C.....G...
Xanthobacter_flavus	:	:	:	C.....
Xanthobacter_tagetidis	:	:	:	C.....G..
Rhizobium_leguminosarum	:	:	:	C.....G..
Mesorhizobium_lotii	:	:	:	C.....G..
Sinorhizobium_fredii	:	:	:	C.....G..
Azorhizobium_caulinodans	:	:	:T...
Bradyrhizobium_japonicum	:	:	:	C..T.C.....T.C..

	1060	1080	1100	1120
BR5401	:TCAGTTGGGGCACTCTAAAGGG	ACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTTGCAAGT	CCTCATGCCCTTAC	
Xanthobacter_agilis	:	G.....A.....		
Xanthobacter_autotrophicus	:	G.....		
Xanthobacter_flavus	:	G.....A.....		
Xanthobacter_tagetidis	:	A.....G.....A.....		
Rhizobium_leguminosarum	:	G.....A.....		
Mesorhizobium_lotii	:	G.....A.....		
Sinorhizobium_fredii	:	T.....G.....A.....		
Azorhizobium_caulinodans	:		
Bradyrhizobium_japonicum	:	T...A.....G.A.....		

	1140	1160	1180	1200
BR5401	:GGGCTGGGGCTACACAGCTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGATGCGAGCCTGCGAGGGT	GAGCAAATCTCCAAAAGCCGT.		
Xanthobacter_agilis	:	:	:	:
Xanthobacter_autotrophicus	:	:	A.AGGG...CCCCT	:
Xanthobacter_flavus	:	:	A.C...A	:
Xanthobacter_tagetidis	:	T.....A.AAGG...CCTCT	:	A.
Rhizobium_leguminosarum	:	T.....CA...AC...TN.N...T	:	A.
Mesorhizobium_lotii	:	T.....CA...A.C...TC...T	:	A.
Sinorhizobium_fredii	:	T.....CA...A.C...TC.NNT	:	A.
Azorhizobium_caulinodans	:A.....	:	:
Bradyrhizobium_japonicum	:A.....AGGG..A.CCCCT	:	A.

	1220	1240	1260	1280
BR5401	:CTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAA			
Xanthobacter_agilis	:.....			
Xanthobacter_autotrophicus	:.....			
Xanthobacter_flavus	:.....			
Xanthobacter_tagetidis	:.....			
Rhizobium_leguminosarum	:.....	N.....	C.....	G.....
Mesorhizobium_lotii	:.....		C.....	G.....
Sinorhizobium_fredii	:N.....	N.....	CA.....	TG.....
Azorhizobium_caulinodans	:.....			
Bradyrhizobium_japonicum	:.....	GG.....	CC.....	C.....

	1300	1320	1340	1360
BR5401	:ACGTTCCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGCGTTGCGCTAACCTAGCA			
Xanthobacter_agilis	:.....		C.....	C.....TC...
Xanthobacter_autotrophicus	:.....		C.....	C-.....C-...
Xanthobacter_flavus	:.....		C.....	C-.....C-...
Xanthobacter_tagetidis	:.....		C.....	C-.....C-...
Rhizobium_leguminosarum	:.....			TAG.N.....--..
Mesorhizobium_lotii	:.....		C.....	C.T.....--..
Sinorhizobium_fredii	:.....		C.....	TAG.A.....--..
Azorhizobium_caulinodans	:.....		C.....--..
Bradyrhizobium_japonicum	:.....			T...A.G.....C-..

	1380
BR5401	:ATAGGAGGCAGGCGACCAGGTAGGGTCAGC-
Xanthobacter_agilis	:.GA.....-
Xanthobacter_autotrophicus	:-G.....-
Xanthobacter_flavus	:-G.....-
Xanthobacter_tagetidis	:-G.....-
Rhizobium_leguminosarum	:-G.A-....CTA.....-
Mesorhizobium_lotii	:-G.A-.....-
Sinorhizobium_fredii	:-G.A-....CTA.....-
Azorhizobium_caulinodans	:-.....T-
Bradyrhizobium_japonicum	:.GG.A-....C.G.....-

TABELA 1. Matriz de identidade das seqüências de rDNA 16S construída a partir do alinhamento entre as espécies de rizóbio, *Xanthobacter* e a estirpe BR 5401 de *Azorhizobium* sp nov.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
01. <i>Mesorhizobium loti</i>	1,000	0,953	0,931	0,903	0,922	0,908	0,914	0,915	0,880	0,905
02. <i>Sinorhizobium fredii</i>		1,000	0,950	0,895	0,907	0,897	0,902	0,906	0,879	0,896
03. <i>Rhizobium leguminosarum</i>			1,000	0,900	0,908	0,898	0,905	0,906	0,885	0,898
04. <i>Azorhizobium caulinodans</i>				1,000	0,968	0,961	0,976	0,965	0,884	0,976
05. <i>Xanthobacter agilis</i>					1,000	0,966	0,979	0,969	0,887	0,969
06. <i>Xanthobacter autotrophicus</i>						1,000	0,974	0,969	0,892	0,973
07. <i>Xanthobacter flavus</i>							1,000	0,980	0,886	0,974
08. <i>Xanthobacter tagetidis</i>								1,000	0,894	0,960
09. <i>Bradyrhizobium japonicum</i>									1,000	0,887
10. BR5401										1,000

*Observação: "Gaps" são falhas provocadas no alinhamento das seqüências devido a deleção ou inserção de bases.

CAPÍTULO 3

ESPECIFICIDADE DOS SIMBIONTES *Sesbania virgata* (Caz.)

Pers. *Azorhizobium* sp. nov.¹

RESUMO

CARVALHO, Y. Especificidade dos simbiossitos *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. e *Azorhizobium* sp. nov. Lavras: UFLA, 2002. Cap.3. 18p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)*

Com objetivo de estudar as relações simbióticas entre *Azorhizobium* sp. nov. BR 5401^T e *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. com outros parceiros foram realizados dois experimentos em vasos de Leonard em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras. No experimento em que foi testada a nodulação de várias espécies de leguminosas pela estirpe BR 5401^T não foi verificada nodulação em *Albizia lebbbeck*, *Cicer arietinum*, *Lathirus sativus*, *Lotus corniculatus*, *Pisum sativum*, *Vicia villosa* e *Trifolium repens*. *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum*, *Erythrina speciosa* e as quatro espécies de *Sesbania* testadas (*S. punicea*, *S. exasperata*, *S. rostrata* e *S. sesban*) nodularam com esta estirpe, porém ineficientemente. Somente na sua hospedeira de origem a nodulação foi eficiente. No experimento em que se testou a nodulação da *Sesbania virgata* por estirpes tipo ou referência de espécies descritas dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium* e *Azorhizobium*, só houve nodulação com a inoculação estirpe homóloga BR 5401^T. Estes resultados corroboram resultados anteriores de que há uma relação altamente específica, principalmente com relação à eficiência da fixação biológica de nitrogênio, entre *Azorhizobium* sp. nov. BR 5401^T e *Sesbania virgata* (Caz.) Pers.

*Comitê Orientador : Prof^ª Fátima M.S. Moreira – UFLA (Orientadora).

**SPECIFICITY OF SIMBIANTS *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and
Azorhizobium sp nov.¹**

ABSTRACT

CARVALHO, Y. Specificity of simbiants *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and *Azorhizobium* sp nov. Lavras: UFLA, 2002. Chap. 3. 18 p. (Thesis - Doctorate in Soil and Plant Nutrition)*

Aiming to study the symbiotic relationships among *Azorhizobium* sp. nov BR 5401^T and *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. with other partners, two experiments were carried out in Leonard jars, at the greenhouse of Soil Science Department, Federal University of Lavras. When diverse legume species were inoculated with BR 5401^T, *Albizia lebeck*, *Cicer arietinum*, *Lathirus sativus*, *Lotus corniculatus*, *Pisum sativum* *Vicia villosa*, and *Trifolium repens* did not nodulate. *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum*, *Erythrina speciosa* and four species of *Sesbania* (*S. punicea*, *S. exasperata*, *S. rostrata* and *S. sesban*) nodulated inefficiently. Only *S. virgata* nodulated efficiently with BR 5401^T. When *Sesbania virgata* was inoculated with type or reference strains of species belonging to the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium* and *Azorhizobium*, nodulation occurred only with the inoculation of the homolog strain BR 5401^T. These results corroborate previous results indicating a high specific relationship, mainly concerning to nitrogen fixation, between *Azorhizobium* sp. nov BR 5401^T e *Sesbania virgata* (Caz.). Pers.

*Guidance Committe : Prof^a Fátima M.S. Moreira – UFLA (Major Professor).

1 INTRODUÇÃO

A relação entre estirpes de bactérias fixadoras de N_2 , denominadas coletivamente de rizóbios, com espécies de leguminosas pode resultar em presença ou ausência de nodulação. Quando a nodulação ocorre, esta pode ser eficiente, pouco eficiente ou não eficiente. Nodulação eficiente significa nodulação que resulta em suficiente fixação de N_2 para detectar resposta em crescimento pela planta (Turk e Keyser, 1992). Ineficiência é definida como a fixação de pouco ou nenhum N_2 sem qualquer outro efeito adverso na planta (Johnson e Allen, 1952). Tanto estirpes de rizóbio como espécies de leguminosas têm alta variabilidade com relação às suas propriedades simbióticas podendo variar de altamente específicas, se estabelecem simbiose com poucos parceiros a altamente promíscuas, quando estabelecem simbiose com vários parceiros taxonomicamente distintos. A especificidade também se expressa no passo seguinte da simbiose, ou seja, eficiência da fixação biológica de nitrogênio. Espécies de leguminosas como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), o siratro (*Macroptilium atropurpureum*) e o caupi (*Vigna unguiculata*), por exemplo, são promíscuas pois, nodulam com rizóbios de espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium*, além de outras espécies isoladas que ainda não foram identificadas filogeneticamente (Moreira e Siqueira, 2002; Lewin et al., 1987). Já *Rhizobium hainanense* é uma espécie de bactéria promíscua, pois nodula pelo menos 12 espécies de leguminosas (Chen et al., 1997).

Sesbania virgata (syn. *Sesbania marginata*) é uma espécie arbustiva adaptada a condições de alagamento que ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste do Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai (Pott e Pott, 1994). Esta espécie apresenta rápido crescimento o que a torna potencialmente utilizável

para diversos usos como adubação verde, cercas vivas, lenha, entre outros, além do reflorestamento de margens de cursos de água. Os primeiros rizóbios nodulando esta espécie foram isolados por Campelo (1976). Posteriormente, estes rizóbios foram identificados como pertencentes ao gênero *Azorhizobium*, porém com diferenças significativas entre a única espécie atualmente descrita do gênero - *A. caulinodans* (Dreyfus et al., 1988) que indicavam tratar-se de uma nova espécie do gênero (Moreira et al., 1998). A estirpe BR 5401(=Sm1), isolada por Campelo, foi indicada como a estirpe tipo desta nova espécie (Moreira et al., 2000).

Campelo (1976) realizou também o primeiro estudo sobre a capacidade de nodulação de *Sesbania virgata*. Esta foi testada, junto com outras espécies de diferentes tribos de *Papilionoideae* e *Mimosoideae* em estudo de inoculação cruzada com as estirpes homólogas de cada espécie. Somente o rizóbio homólogo foi capaz de nodular a *S. virgata*, enquanto este mesmo rizóbio nodulou plantas de *Acacia mollissima* e *Erythrina velutina* (syn. *E. speciosa*), mas, produzindo nódulos ineficientes. Estudos posteriores indicam haver uma relação de especificidade entre estes dois simbiossistemas (Veasey et al, 1997; Gonçalves, 2000).

O objetivo deste trabalho foi verificar as relações simbióticas de *Azorhizobium* sp. nov. BR 5401^T com espécies de leguminosas, em sua maioria, hospedeiros de origem de espécies de rizóbio descritas, e de *Sesbania virgata* com estirpes tipo ou referência de espécies de rizóbio descritas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras de fevereiro a julho de 2001. No primeiro experimento pesquisou-se a capacidade de nodular e fixar N₂ da estirpe BR 5401^T de *Azorhizobium* sp. nov.,

recomendada pela Embrapa-Agrobiologia como inoculante para *Sesbania virgata* (Faria e Guedes, 1999), em espécies de leguminosas hospedeiras de origem de espécies descritas de rizóbio, conforme recomendado por Graham et al. (1991) (*Macropodium atropurpureum*, *Phaseolus vulgaris* *Trifolium repens*, *Lotus corniculatus*, *Pisum sativum*, *Vicia villosa*, *Cicer arietinum*, *Lathyrus sativus*, *Albizia lebbbeck*, *Erythrina speciosa*) e espécies de *Sesbania* (*S. punicea*, *S. rostrata*, *S. exasperata*, *S. sesban*). Além deste tratamento, para cada espécie foram acrescentados mais três tratamentos controle: sem inoculação, sem inoculação adubado com nitrogênio mineral e inoculação com estirpe compatível e/ou recomendada como inoculante (Tabela 1).

No segundo experimento estudou-se a capacidade e eficiência da nodulação de estirpes tipo ou referência de espécies de rizóbio atualmente descritas, na nodulação de *Sesbania virgata* (Tabela 2). Foram usados dois tratamentos controle sem inoculação, sendo um sem, e o outro com nitrogênio mineral.

Os experimentos foram conduzidos em vasos de Leonard. (Vincent, 1970) contendo na parte superior mistura de areia e de vermiculita (1:1, V/V) e na parte inferior solução nutritiva com a seguinte composição em g L⁻¹: CaCl₂.H₂O 0,147; KH₂PO₄ 0,68; MgSO₄.7H₂O 0,61; K₂SO₄ 0,43; FeCl₃ 6H₂O 0,037 e micronutrientes (H₃BO₃ 0,715; MnSO₄.H₂O 0,507; ZnSO₄.H₂O 0,055; CuSO₄.H₂O 0,02; NaMoO₄.H₂O 0,022; e CoCl₂ 0,0075 mg L⁻¹) e pH ajustado para 6,8. Antes da aplicação da solução nutritiva os vasos com o substrato na parte superior foram autoclavados por 30 min a 127°C. A solução nutritiva foi autoclavada por 20 min a 127°C.

Para o plantio, a dormência das sementes de algumas espécies (*A. lebbbeck*, *E. speciosa* e as espécies de *Sesbania*), foi quebrada com imersão durante 30 minutos em H₂SO₄ concentrado. As sementes foram desinfetadas

superficialmente, com etanol 75% seguido de Hipoclorito de Sódio 1% e lavadas com água esterilizada até a completa remoção do desinfetante.

TABELA 1. Estirpes tipo utilizadas como inoculantes para as espécies de leguminosas testadas.

Espécies de leguminosas	Estirpe inoculante*
<i>Albizia lebbek</i>	BR 5610
<i>Cicer arietinum</i>	<i>Mesorhizobium ciceri</i> UPM-Ca7 ^T
<i>Erythrina speciosa</i>	BR 4101
<i>Lotus corniculatus</i>	<i>Mesorhizobium. loti</i> NZP 2213 ^T
<i>Lathyrus sativus</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv phaseoli ATCC 14422 ^T
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp BR 1010
<i>Pisum sativum</i>	<i>R leguminosarum</i> bv phaseoli ATCC 14422 ^T
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T
<i>Trifolium repens</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv trifolii ATCC 14480 ^T
<i>Vicia villosa</i>	<i>R. leguminosarum</i> bv phaseoli ATCC 14422 ^T
<i>Sesbania virgata</i>	<i>Azorhizobium</i> sp nov. BR 5401
<i>Sesbania exasperata</i>	<i>Sinorhizobium saheli</i> ORS 609 ^T
<i>Sesbania sesbam</i>	<i>Sinorhizobium saheli</i> ORS 609 ^T
<i>Sesbania rostrata</i>	<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571 ^T
<i>Sesbania punicea</i>	<i>Sinorhizobium saheli</i> ORS 609 ^T

As estirpes de rizóbio testadas (Tabelas 1 e 2) foram cultivadas em meios de cultivo semi-sólido, sendo LN (Dreyfus et al., 1983) para o gênero *Azorhizobium* e YMA (Vincent, 1970) para demais gêneros. Três mL destas culturas na fase *log* foram inoculadas por vaso. Cada tratamento testado consistiu de três vasos com duas plantas/vaso, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 17 tratamentos em cada um dos experimentos e 3

repetições para cada tratamento. Para a comparação das médias utilizou-se o teste de Duncan.

O tratamento controle com nitrogênio recebeu 15 mL de solução 0,5M NH_4NO_3 /vaso (divididos em 3 doses aos 15, 30 e 45 dias após a germinação).

TABELA 2. Estirpes tipo ^T e/ou referência de espécies de rizóbio descritas:

ESTIRPES	GÊNERO/ESPÉCIE
BR 5401	<i>Azorhizobium sp nov.</i>
ORS 571 ^T	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
USDA 76 ^T	<i>Bradyrhizobium. elkani</i>
UPM-Ca 7 ^T	<i>Mesorhizobium ciceri</i>
BR 3804	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>
CCBAU 2609 ^T	<i>Mesorhizobium huakuii</i>
A-1BS ^T	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>
UPM-Ca 36 ^T	<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>
CIAT 899 ^T	<i>Rhizobium tropici</i>
ATCC 14482 ^T	<i>R. leguminosarum bv phaseoli</i>
ATCC 14480 ^T	<i>R. leguminosarum bv trifolii</i>
Hambi 540 ^T	<i>R. galegae bv orientalis</i>
NZP 4027 ^T	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
A 321 ^T	<i>Sinorhizobium medicae</i>
ORS 609 ^T	<i>Sinorhizobium saheli</i>
ORS 1009 ^T	<i>Sinorhizobium terangaie</i>

Para os dois experimentos as plantas foram colhidas 60 dias após a semeadura para avaliação dos pesos de matéria seca da parte aérea, número e peso de nódulos secos, e coloração das folhas para verificação do grau de eficiência das estirpes

A identidade dos rizóbios nos nódulos foi confirmada através do seu isolamento em meio YMA, pelo tempo de aparecimento das primeiras colônias, produção de goma, coloração e tamanho das colônias, e alteração do pH do meio, conforme descrito em Moreira (1991).

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, com comparação das médias utilizando-se o teste de Duncan a 5% de significância. Para isto utilizou-se o programa estatístico SANEST (Zonta et al., 1984).

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento que envolveu a estirpe representante de *Azorhizobium* sp nov BR 5401 e algumas leguminosas a nodulação efetiva com esta estirpe foi observada somente em *Sesbania virgata* (Tabela 3). A nodulação de *S. virgata* com seu rizóbio homólogo produziu nódulos grandes de crescimento indeterminado, e o peso fresco da matéria seca da parte aérea próximo ao da testemunha nitrogenada (Tabela 4).



FIGURA 1. Leguminosas inoculadas com *Azorhizobium* sp nov

TABELA 3. Número de nódulos nas leguminosas inoculadas com a estirpe de *Azorhizobium* sp. nov., BR 5401 e com estirpes homólogas em vasos de Leonard com solução nutritiva.

Especies leguminosas (Estirpe homóloga)	Numero de nódulos/planta	
	Estirpe homologa	BR 5401
<i>Albizia lebbek</i> (BR 5610)	9 A	0
<i>Cicer arietinum</i> (UPM-Ca7 ^T)	14 A	0
<i>Erytrina speciosa</i> (BR 4101)	18 A	7 B
<i>Lathyrus sativus</i> (ATCC 14422 ^T)	17 A	0
<i>Lotus corniculatus</i> (NZZ 2213 ^T)	36 A	0
<i>Macroptilum atropurpureum</i> (BR 1010)	35 A	13 B
<i>Phaseolus vulgaris</i> (CIAT 899 ^T)	405 A	132 B
<i>Pisum sativum</i> (ATCC 14422 ^T)	19 A	0
<i>Trifolium repens</i> (ATCC 14480 ^T)	33 A	0
<i>Vicia villosa</i> (ATCC 14422 ^T)	28 A	0
<i>Sesbania exasperata</i> (ORS 609 ^T)	33 A	12 B
<i>S. punicea</i> (ORS 609 ^T)	46 A	18 B
<i>S. rostrata</i> (ORS 571)	27 A ^T	15 B
<i>S. sesban</i> (ORS 609 ^T)	24 A	10 B
<i>S. virgata</i> (BR 5401 ^T)	(108)	108

*Médias apresentando letras iguais nas linhas dentro de cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%

TABELA 4. Matéria seca da parte aérea das nas leguminosas inoculadas com a estirpe de *Azorhizobium* sp. nov., BR 5401 e com estirpes homólogas em vasos de Leonard com solução nutritiva.

Especies leguminosas (Estirpe homóloga)	Matéria seca das espécies testadas em g planta ⁻¹			
	Estirpe Homóloga	BR 5401	Testemunha	Testemunha nitrogenada
<i>Albizia lebbek</i> (BR 5610)	1,80 B	0,38 C	0,40 C	2,00 A
<i>Cicer arietinum</i> (UPM-Ca7 ^T)	1,14 B	0,6 C	0,57 C	1,63 A
<i>Erythrina speciosa</i> (BR 4101)	1,78 B	0,45 C	0,39 C	1,97 A
<i>Lathyrus sativus</i> (ATCC 14422 ^T)	1,20 B	0,15 C	0,17 C	1,58 A
<i>Lotus corniculatus</i> (NZP 2213 ^T)	0,72 B	0,09 C	0,10 C	1,05 A
<i>M. atropurpureum</i> (BR1010)	1,08 B	0,11 C	0,09 C	2,03 A
<i>Phaseolus vulgaris</i> (CIAT 899 ^T)	1,80 A	0,54 C	0,30 C	2,10 A
<i>Pisum sativum</i> (ATCC 14422 ^T)	1,56 A	0,44 C	0,48 C	1,72 A
<i>Trifolium repens</i> (ATCC 14480 ^T)	0,5 A	0,04 C	0,04 C	0,7 A
<i>Vicia villosa</i> (ATCC 14422 ^T)	1,12 A	0,33 C	0,45 C	1,15 A
<i>Sesbania exasperata</i> (ORS 609)	1,15 A	0,12 C	0,14 C	1,40 A
<i>S. punicea</i> (ORS 609)	1,37A	0,14 C	0,13 C	1,78 A
<i>S. rostrata</i> (ORS 571)	5,2 A	0,19 C	0,16 C	4,64 B
<i>S. sesban</i> (ORS 609)	1,23 B	0,12 C	0,10 C	1,35 A
<i>S. virgata</i> (BR 5401 ^T)	(1,44B)	1,44 B	0,16 C	2,35 A

*Médias apresentando letras iguais nas colunas dentro de cada parâmetro não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%

Sesbania exasperata, *S. punicea*, *S. rostrata* e *S. sesban*, quando inoculadas com estirpes compatíveis, tiveram peso da matéria seca da parte aérea semelhante ou próximo ao do tratamento com nitrogênio. Porém, quando inoculadas com a BR 5401^T, apresentaram poucos nódulos, pequenos e arredondados (Tabela 3) e matéria seca da parte aérea semelhante ao tratamento controle sem inoculação e sem nitrogênio (Tabela 4), mostrando sinais definidos

de deficiência de N, como pequeno porte, amarelecimento e queda de folhas, sendo portanto considerada uma nodulação ineficiente Gonçalves (2000) também observou a nodulação ineficiente de *S. rostrata* por BR 5401^T. *Phaseolus vulgaris* e *Macroptilium atropurpureum* nodularam de forma ineficiente com a estirpe BR 5401^T, com produção de matéria seca semelhante ao tratamento controle sem inoculação e sem nitrogênio.

Gonçalves (2000) também observou a nodulação ineficiente de *S. rostrata* por BR 5401^T. A nodulação ineficiente entre *Sesbanias* de varias espécies com rizóbios provenientes das mesmas já foi relatada por diversos autores (Turk e Keyser 1992, Boivin et al 1997, Franco et al., 1989 e Faria et al., 1999) sugerindo que que as substancias químicas envolvidas no processo de nodulação como

A observação de nodulação inefetiva por *Azorhizobium* sp nov (BR 5401) no gênero *Sesbania* deve produzir um flavonóide comum ao gênero que é reconhecido pelo *Azorhizobium* sp nov levando a planta a produzir nódulos, mas a interação genética necessária á fixação de nitrogênio deve ser particular a espécie *S. virgata*.

Phaseolus vulgaris e *Macroptilium atropurpureum* nodularam de forma ineficiente com a estirpe BR 5401^T, com produção de matéria seca semelhante ao tratamento controle sem inoculação e sem nitrogênio. Gonçalves (2000) também encontrou nodulação nestas leguminosas, porém, pouco eficiente. Foi verificada também a nodulação ineficiente de *Azorhizobium* sp. nov (BR 5401^T) em *Erytrina speciosa*, concordando com Campelo (1976). As demais espécies de leguminosas não nodularam com a estirpe BR 5401^T. Estas nodularam apenas com suas estirpes homólogas ou recomendadas como inoculantes. A nodulação das três espécies da Tribo Phaseoleae (*M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *E. speciosa*) confirma a promiscuidade de hospedeiros desta Tribo.

No segundo experimento, onde a relação especificidade hospedeira e a eficiência das estirpes foi testada para *Sesbania virgata*, (Figura 3) foi observado que somente a estirpe BR 5401^T de *Azorhizobium sp* nov nodulou sua hospedeira e eficientemente.



FIGURA 2. Nódulos de *S.virgata* inoculada com BR 5401^T

A inoculação produziu em média 114 nódulos por planta que variaram de tamanho, sendo os nódulos do terço superior da raiz, próximo a esta maiores (em média 9,0 mm), lobados ou alongados e os nódulos mais novos, ou seja da parte inferior da raiz e mais distantes desta, arredondados pouco alongados e de tamanho menor (0,5 mm) em média com 0,58 g/nódulo de matéria seca (Figura 2). A produção de matéria seca pela parte aérea (2,75 g/planta) foi próxima a da testemunha nitrogenada (2,99 g/planta), não diferindo estatisticamente desta (Figura 4).



FIGURA 3 . *Sesbania virgata* inoculadas com diversos rizóbios

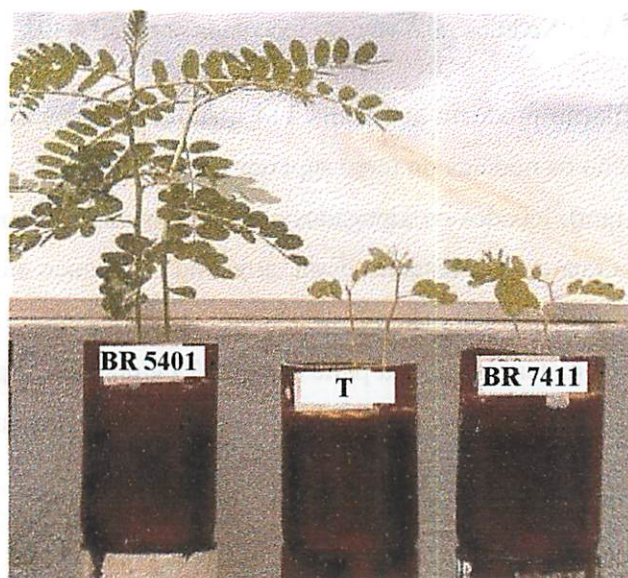


FIGURA 4. *Sesbania virgata* inoculada com estirpe BR 5401 testemunha sem inoculação e inoculada com estirpe de *S. meliloti* BR 7411

As espécies testadas dos gêneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* não produziram nódulos em *Sesbania virgata* e a produção de matéria seca da planta igualou-se a produzida pela testemunha não inoculada (em média 0,16 g/planta). A inoculação da estirpe ORS 571^T de *Azorhizobium caulinodans* e a USDA 76^T de *Bradyrhizobium elkani* não produziu nódulos na *Sesbania virgata* discordando dos resultados obtidos por Gonçalves (2000) que observou a produção de nódulos ineficientes. Faria (comunicação pessoal) também não encontrou nodulação em *S. virgata* por ORS 571^T.

Nos estudos de nodulação que incluíram o gênero *Sesbania* relatados até hoje, com exceção de Dreifus et al., (1988) e Rinaudo et al., (1991) os rizóbios observados possuíam média a alta produção de goma em YMA, e tempo de crescimento rápido como espécies de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Chen et al., 1991; De Lajudie et al., 1994; Boivin et al., 1997; Wang et al., 1998; Nick et al., 1998) e outras ainda não identificadas (Trinick, 1980; Haukka, 1997; Souza et al., 2000).

Estes resultados indicam que as substâncias químicas envolvidas no processo de nodulação como flavonóides e exopolissacarídeos devem ser comuns aos gêneros, mas no passo seguinte da simbiose mutualista, outros fatores estão envolvidos.

A nodulação de *Sesbania* pelo gênero *Azorhizobium* inicialmente relatada por Dreifus et al. (1988) que descreveu a espécie *Azorhizobium caulinodans* nodulando o caule de *Sesbania rostrata*. Em estudos posteriores de inoculação cruzada que incluíram espécies do gênero *Sesbania* foi observada nodulação por rizóbios de rápido crescimento e média a alta produção de goma em YMA, como espécies de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Chen et al., 1991; De Lajudie et al., 1994; Boivin et al., 1997; Wang et al., 1998) e outras ainda não identificadas (Trinick, 1980; Dreifus et al., 1988;

Rinaudo et al., 1991; Souza et al., 2000). Por outro lado, *Azorhizobium caulinodans* quando inoculado em 12 espécies de *Sesbania* (*S. pubescens*, *S. grandiflora*, *S. aculeata*, *S. cannabina*, *S. pachycarpa*, *S. formosa*, *S. aegyptiaca*, *S. sesban*, *S. sericea*, *S. emerus*, *S. tetraptera* e *S. alba*), produziu nódulos inefetivos, mas a nodulação destas mesmas espécies foi efetiva para *Sinorhizobium saheli* e *Sinorhizobium teranga* biovar *sesbaniae*, indicando que a especificidade é maior para o *Azorhizobium* (Boivin et al., 1997). Turk e Keiser,(1992) observaram que a ORS 571 estirpe tipo de *A. caulinodans* nodulou inefetivamente *Sesbania aculeata*, pouco efetivamente *S. cannabina* e efetivamente para *S. pachycarpa*. Veasey et al. (1997) testando a nodulação de 13 espécies de leguminosas em solo do Estado de São Paulo com população nativa de rizóbio não encontraram nodulação em *Sesbania punicea* e *S. virgata*.

4 CONCLUSÕES

Entre as leguminosas e rizóbios testados *Sesbania virgata* nodulou somente e efetivamente com a estirpe BR 5401^T de *Azorhizobium* sp. nov., indicando ser altamente específica em sua relação simbiótica com rizóbio.

A estirpe BR 5401^T *Azorhizobium* sp. nov. nodulou outras espécies de leguminosas, incluindo *Sesbania* spp. No entanto, nodulação efetiva com relação à fixação biológica de N₂ só ocorreu com *Sesbania virgata*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOIVIN C.; NDOYE, J.; LORTET, G.; NDIAYE, A.; LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli*, and *S. teranga* bv. *Sesbaniae* can form stem nodules on *Sesbania rostrata* although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, p. 1040-1047, 1997.
- CAMPELLO, A.B. Caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp de leguminosas florestais. Rio de Janeiro UFRJ, 1976. 122p. Dissertação de Mestrado
- CHEN, W.E.; LI, G.S.; QI, Y.L.; WANG, E.T.; YUAN, H.L.; LI, J.L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.275-280, 1991.
- CHEN, W.X.; TAN, Z.Y.; GAO, J.L.; LI, Y.; WANG, E.T. *Rhizobium hainanense* sp. nov. isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.870-873, 1997.
- De LAJUDIE P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomic of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* e description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.715-733, 1994.
- DREYFUS, B.L.; ELMERICH, C.; DOMMARGUES, Y.R. Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.711-713, 1983.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; 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.

- FARIA, S.M.; GUEDES, R.E. Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais (aproximação 1999). Embrapa-Agrobiologia: Recomendação técnica n° 5, dez/99, p.1-4.
- GONÇALVES, M. Especificidade de estirpes de *Azorhizobium* sp. nov. na simbiose com *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2000. 56p. Dissertação de Mestrado.
- GRAHAM, P. H.; SADOWSKY, M.J.; KEYSER, H.H.; BARNET, Y.M.; BRADLEY, R.S.; COOPER, J.E.; DE LEY, D.J.; JARVIS, B.D.W.; ROSLYCKY, E.B.; STRIJDOM, B. W.; YOUNG, J.P.W. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem nodulating bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.41, p.582-587, 1991.
- JOHNSON, M.D.; ALLEN, O.N. Nodulation studies with special reference to strains isolated from *Sesbania* species Antoine van Leeuwenhoek *Journal of Microbiology and Serology* v.18, p.13-22, 1952.
- LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, H.; WONG, C.H.; NELSON, L.; MANEN, J.F.; STANLEY; DOWLING, D.N.; DENÁRIE, J.; BROUGHTON, W.J. Multiple host-specificity loci of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR 234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant Molecular Biology* v.8, p.447-459, 1987.
- MOREIRA, F.M.S. Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de leguminosas introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. Rio de Janeiro UFRJ - Instituto de Agronomia, 1991. Tese de Doutorado.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: Editora UFLA, 620 p., 2002.
- MOREIRA, F.M.S.; HAUKKA, K.; YOUNG, P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology*, v.7, p.04-11, 1998.
- POTT, A.; POTT, V.J. *Plantas do Pantanal*. Corumbá: EMBRAPA/CPAP/SPI, 1994, 320p.
- RINAUDO, G.; ORENGA, S.; FERBNANDEZ, M.P.; MEUGNIER, H.; BARDIN, R. DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium*

and other stem-and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.114-120, 1991.

SOUZA L. A. G., RIBAS T. T. M.; ALFAIA S. S. Efeito da inoculação com rizóbios e da adubação nitrogenada de mudas de *Sesbania exasperata* (Leg. Pap.) em dois solos ácidos da Amazônia. GIOTTO E.; BECKER A.B.; MATIUZZI, F.R.(ed) **Anais da FERTBIO 2000**, (CD Room),-UFSM-Santa Maria, RS, 2000.

TRINICK, M.J. Relationships amongst the fast growing rhizobia of *Lablab purpureum*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* sp, *Acacia farnesiana* e *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. **Journal of Applied Bacteriology**. v.49, p.39-53, 1980.

TURK, D; KEYSER H.H. Rhizobia that nodulate tree legumes specificity of the host for nodulation and effectiveness. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38 p.451-460, 1992.

VEASEY, E.A.; GHISI, O.A.A.; VALARINI, M.J.; OTSUK, J.P.; CARDELLI, M.A.; SANCHEZ, M.J.F.; BEISMAN, D.F. Early growth and native nodulation of leguminous shrub and tree species in Brazil. **Tropical Grasslands**, v.31, p.40-48, 1997.

VICENT, J.M. **A Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. IBP Handbook No. 15. Oxford, UK, Blackwell Scientific, 1970.

WANG, E.T; VAN BERKUM, P; BEYENE, D; SUI, H.X; CHEN, W.N; MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.51 - 65, 1998.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A.; SILVEIRA JÚNIOR, P. **Sistemas de análise estatística para microcomputadores (SANEST)**. Pelotas: UFPel. Departamento de Matemática e Estatística, 1984, 151 p.