



Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental

Editoras
Adriana Parada Dias da Silveira
Sueli dos Santos Freitas

Instituto Agronômico
Campinas (SP), 2007



Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Agricultura e Abastecimento
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Agronômico

Governador do Estado de São Paulo
José Serra

Secretário de Agricultura e Abastecimento
João de Almeida Sampaio Filho

Secretário-Adjunto
Antônio Júlio Junqueira de Queiroz

Chefe de Gabinete
Antonio Vagner Pereira

Coordenador da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
João Paulo Feijão Teixeira

Diretor Técnico de Departamento do Instituto Agronômico
Orlando Melo de Castro



Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Agricultura e Abastecimento
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Agronômico

Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental

Editoras

Adriana Parada Dias da **SILVEIRA**
Sueli dos Santos **FREITAS**

Instituto Agronômico
Campinas (SP), 2007

Ficha elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agrônomico

M415 Microbiota do solo e qualidade ambiental/editoras Adriana Parada Dias da Silveira; Sueli dos Santos Freitas. Campinas: Instituto Agrônomico, 2007.
312 p.: il.

ISBN: 978-85-85564-14-8

Publicação online

1. Microbiota do Solo 2. Qualidade Ambiental. I. Silveira, Adriana Parada Dias da II. Freitas, Sueli dos Santos III. Campinas. Instituto Agrônomico IV. Título

CDD 631.4

A eventual citação de produtos e marcas comerciais não expressa, necessariamente, recomendações do seu uso pela Instituição.
É permitida a reprodução, desde que citada a fonte.

Comitê Editorial do Instituto Agrônomico

Oliveiro Guerreiro Filho

Ricardo Marques Coelho

Cecília Alzira Ferreira Pinto Maglio

Equipe participante desta publicação

Coordenação da editoração: Marilza Ribeiro Alves de Souza

Revisão de vernáculo: Maria Angela Manzi da Silva

Projeto gráfico: Adriano Reducino

Editoração eletrônica e criação da capa: Adriano Reducino

**O conteúdo do texto é de inteira
responsabilidade dos autores.**

Instituto Agrônomico

Centro de Comunicação e Transferência do Conhecimento

Caixa Postal 28

13012-970 Campinas (SP) - Brasil

Fone: (19) 3231-5422 (PABX)

Fax: (19) 3231-4943

www.iac.sp.gov.br

Apresentação

Falar da relevância da biota do solo para o ecossistema é redundância. As funções da biota envolvem desde a preservação de água até o seqüestro de substâncias tóxicas, com reflexos para o ambiente, as culturas, os negócios, enfim, para a sociedade. A relação entre a microbiota e a qualidade ambiental é extremamente estreita, com especial atenção para as contaminações de diversas origens, dentre elas as causadas por metais pesados. Utilizar a Microbiologia como ferramenta para avaliar a qualidade de solo é fundamental no caminho da sustentabilidade ambiental agrícola. Há muito, estudos vêm sendo desenvolvidos por renomados pesquisadores de diversas instituições de pesquisa, na reunião de excelências e competências nesse sentido. Esta obra, que se consuma pelo esforço de “discípulos” da Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, que acaba sendo uma justa homenagem dos formados a sua formadora, traz conhecimentos valiosos, que sob a batuta da ilustre professora da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq-USP) certamente trarão grandes contribuições a estudiosos e profissionais da área de solos.

As pesquisadoras do Instituto Agronômico (IAC-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Dra Adriana Parada Dias da Silveira e Dra Sueli dos Santos Freitas, coordenaram e uniram-se a outros especialistas de solos para, com apoio do IAC, transferir informações aos demais elos que compõem a cadeia do agronegócio. Com essa obra, a transferência de tecnologia ganha reforço por disponibilizar na internet conteúdo da maior relevância, na área essencial que envolve os principais tópicos da Microbiologia do solo.

Diante das necessidades de poupar recursos naturais, reduzir custos econômicos e minimizar impactos ambientais, informações que abordem soluções para amenizar as fontes finitas usadas na agricultura são indispensáveis. Que esse e-book seja um estímulo para profissionais de outras áreas de conhecimentos debruçarem-se em torno das demandas do agronegócio não apenas para gerar informações, mas sobretudo para torná-las acessíveis aos que delas precisam para trabalhar.

Pioneiro em pesquisas com solos, o IAC sente-se honrado em participar dessa obra que se destaca pela excelência do conteúdo e por democratizar o saber. No ano em completa seu 120º aniversário, o IAC segue se modernizando, apoiando a chegada da ciência aos usuários e parabenizando a todos que contribuíram para a concretização do e-book “Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental”.

Orlando Melo de Castro
Diretor-Geral do Instituto Agronômico

Prefácio

Os microrganismos têm sido cada vez mais associados à qualidade ambiental, tanto por seu papel fundamental na manutenção dos ecossistemas como por sua sensibilidade a variações nos muitos fatores que compõem os ambientes. Por isso as editoras orgulham-se em trazer a lume este livro, composto por temas dedicados à correlação da microbiota com a qualidade dos sistemas que habita. Em que pese sua importância, ainda há necessidade de textos em língua portuguesa que tornem o assunto acessível a estudantes e profissionais da área.

Dentro dessa proposta - e em consonância com os novos tempos da comunicação - está publicado inteiramente por meio eletrônico, totalmente disponível ao público interessado. Para isso, contamos com o incondicional apoio do Instituto Agrônomo, que nos deu todas as facilidades para que o projeto chegasse a bom termo. Vale lembrar que, neste ano de 2007, o IAC completou 120 anos de fundação: é uma instituição mais que centenária que abraça diariamente a modernidade, com o alvo principal centrado na qualidade agrícola e ambiental!

Talvez não seja do conhecimento dos leitores, mas todos os autores foram orientados da Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, professora titular da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da USP, em Piracicaba, onde leciona desde 1972. Nesse período a Professora Elke criou escola em Microbiologia Agrícola, formando inúmeros profissionais que a ela devem os primeiros passos no mundo da Ciência. É a ela que queremos homenagear dedicando este livro.

Adriana Parada Dias da Silveira (IAC)
Sueli dos Santos Freitas (IAC)



Sumário

página

Parte I

Aspectos Biotecnológicos

Capítulo 1

Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas

Sueli dos Santos Freitas 1

Capítulo 2

A Microbiota do Solo na Agricultura Orgânica e no Manejo das Culturas

Faustino Andreola e Silvana Aparecida Pavan Fernandes 21

Capítulo 3

Micorrizas Arbusculares em Plantas Tropicais: Café, Mandioca e Cana-de-Açúcar

Arnaldo Colozzi Filho e Marco Antonio Nogueira 39

Capítulo 4

Micorrizas Arbusculares em Plantas Frutíferas Tropicais

Adriana Parada Dias Da Silveira e Vânia Felipe Freire Gomes 57

Capítulo 5

A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas

Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso e Marco Antonio Nogueira 79

Capítulo 6

Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas Não-Leguminosas

Valéria Marino Rodrigues Sala, Adriana Parada Dias da Silveira e Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso 97

Parte II

Contribuição dos Métodos Moleculares aos Estudos da Microbiota do Solo

Capítulo 7

Biologia Molecular do Desenvolvimento de Micorrizas Arbusculares

Marcio Rodrigues Lambais 117

Capítulo 8

Emprego de Técnicas Moleculares na Taxonomia e em Estudos Sobre Ecologia e Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares

Milene Moreira da Silva e Arnaldo Colozzi Filho 127

Capítulo 9

Biologia Molecular da Fixação Biológica do Nitrogênio

Lucia Vieira Hoffmann 153

Capítulo 10

Diversidade e Taxonomia de Rizóbio

Rosana Faria Vieira 165

Parte III

Atuação da Microbiota do Solo em Situações de Estresse

Capítulo 11

Quantificação Microbiana da Qualidade do Solo

Rogério Melloni 193

Capítulo 12

Micorrizas Arbusculares e Metais Pesados

Marco Antonio Nogueira 219

Capítulo 13

Interações Microbianas e Controle de Fitopatógenos na Rizosfera

Júlio Alves Cardoso Filho e Marli Teixeira de Almeida Minhoni 239

Capítulo 14

Microbiota do Solo como Indicadora da Poluição do Solo e do Ambiente

Paulo Fortes Neto, Silvana Aparecida Pavan Fernandes
e Marcelo Cabral Jahnel 259

Capítulo 15

Uso de Resíduos na Agricultura e Qualidade Ambiental

Wanderley José de Melo 275

Parte IV

Qualidade Da Água

Capítulo 16

Indicadores Microbiológicos e Padrões de Qualidade da Água

Suely Martinelli 299

Capítulo 10

Diversidade e Taxonomia de Rizóbio

Rosana Faria **VIEIRA** ⁽¹⁾

1. Introdução

Rizóbios são bactérias do solo que possuem habilidade para induzir a formação de nódulos nas raízes e, em alguns casos no caule, de plantas leguminosas, onde convertem o nitrogênio atmosférico em formas utilizáveis pela planta hospedeira. A família Leguminosae compreende cerca de 650 gêneros e 18000 espécies distribuídas mundialmente nas mais diferentes condições ecológicas. Entretanto, poucas espécies têm sido estudadas com relação ao seu potencial em formar simbiose com rizóbio, visando a fixação do N₂ atmosférico.

Com o advento e aplicação de novas técnicas moleculares e em decorrência da importância econômica e ecológica dos rizóbios, extensivos estudos foram realizados nas últimas décadas com essas bactérias. Como resultado, novas estirpes têm sido descobertas e novos gêneros e espécies estão sendo criados, causando profundas mudanças na taxonomia desses microrganismos. Neste capítulo pretende-se ilustrar o histórico da taxonomia dos rizóbios e a ampla diversidade destas bactérias nos mais diferentes tipos de solo e planta.

2. Histórico da Taxonomia de Rizóbios

No século XIX, os estudos clássicos de Hellriegel e Wilfarth (1888) foram os primeiros a estabelecer que eram os micróbios nos nódulos das raízes que permitiam às leguminosas obter o nitrogênio do ar. Esses microrganismos foram isolados ainda em 1888 por Beijerinck, que os nomeou de *Bacillus radicola*. Posteriormente, foram denominados *Rhizobium leguminosarum* por Frank (1889). Inicialmente, os pesquisadores consideraram o rizóbio como espécie única, capaz de nodular todas as leguminosas. Löhnis e Hansen (1921) sugeriram a divisão do rizóbio em dois grupos de acordo com a taxa de crescimento em meio de cultura.

⁽¹⁾ Pesquisadora, Embrapa - Centro Nacional de Pesquisas em Meio Ambiente, Caixa Postal- 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP. Email: rosana@cnpma.embrapa.br

O termo rizóbio de crescimento rápido passou a referir-se às bactérias associadas com alfafa, trevo, feijão e ervilha. As bactérias de crescimento lento foram exemplificadas pelas bactérias de soja e caupi. Fred et al. (1932) basearam-se nos hospedeiros e em algumas diferenças morfológicas e fisiológicas para o reconhecimento de seis espécies de *Rhizobium*: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* e *R. lupini*. Nenhuma mudança nessa nomenclatura foi feita até 1982.

Por muitas décadas, a caracterização de espécies de rizóbio foi baseada na habilidade específica da bactéria em nodular a planta hospedeira. Estudos iniciais mostraram que cada estirpe ou isolado de rizóbio tinha um determinado grupo de hospedeiros, ou seja, nodulava certas leguminosas, mas não outras. Isso levou ao conceito de inoculação cruzada, com as leguminosas sendo agrupadas de acordo com o rizóbio com o qual elas formavam nódulos. Mais de 20 grupos de inoculação cruzada foram identificados, com as bactérias do grupo do trevo, alfafa, feijão, tremoço, ervilha e soja sendo denominadas como espécies separadas de um único gênero, *Rhizobium* (ex: *R. trifolii* para trevo).

Embora a especificidade ainda seja um ponto importante na identificação do rizóbio, recentemente, outras características têm assumido maior importância na sua classificação, por diferentes razões. Os estudos iniciais envolveram, principalmente, leguminosas de importância agrícola; estudos com leguminosas menos tradicionais tornaram obscuros os limites da inoculação cruzada. A estirpe bacteriana NGR234, por exemplo, originalmente isolada de *Lablab purpureus*, o feijão-lablabe, nodula com 34 diferentes espécies de leguminosas e com uma espécie não-leguminosa (*Parasponia andersonii*) (Stanley e Cervantes, 1991). Além disso, os genes da nodulação de alguns rizóbios estão no plasmídeo. A perda desse plasmídeo por algumas estirpes, em decorrência da exposição a altas temperaturas, faz com que a bactéria perca sua habilidade para formar nódulos e, portanto, não possa ser identificada. No solo, rizóbios não infectivos, sem o plasmídeo simbiótico, excedem em número aqueles capazes de formar nódulo, na proporção de 40 para 1 (Graham, 1998). Os novos métodos taxonômicos desenvolvidos para comparar estirpes, com base em diferentes características, resultaram em agrupamentos cada vez mais distantes daqueles baseados na capacidade específica da bactéria para nodular a planta hospedeira.

Reconhecendo-se as limitações da infecção da planta como o maior determinante taxonômico, outros caminhos começaram a ser trilhados para melhor catalogar os rizóbios. A taxonomia numérica reforçou as diferenças entre os grupos de rizóbio de crescimento rápido e lento (Tabela 1) e levou à consolidação de algumas espécies dentro de cada grupo. Em 1984, dois gêneros foram descritos, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Três espécies foram nomeadas para o gênero *Rhizobium*: *R. loti*, *R. meliloti* e *R. leguminosarum* com três biovars, *viceae*, *phaseoli* e *trifolii*. O gênero *Bradyrhizobium* ("bradus", grego, significando lento) compreendeu todas as estirpes de crescimento lento e somente uma espécie foi nomeada: *B. japonicum*, o microssimbionte de soja. Todas as outras estirpes de crescimento lento foram descritas como *Bradyrhizobium* spp., ou seja, o chamado grupo caupi ou bradirrizóbios tropicais.

Hennecke et al. (1985) analisaram o gene *16S rRNA* dos rizóbios de crescimento rápido e lento e concluíram que esses dois grupos apresentavam, de fato, diferenças

filogenéticas, uma vez que o coeficiente de similaridade do RNA era somente 0,53. Jarvis et al. (1986) estudaram a relação intergenérica entre *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* e também confirmaram a disparidade filogenética entre esses dois grupos. Ademais, eles notaram separações distintas de grupos dentro desses gêneros, predizendo a necessidade de reclassificar e reorganizar o esquema até então utilizado.

Tabela 1. Sumário das diferenças entre rizóbios de rápido e lento crescimento.

Características	Crescimento rápido	Crescimento lento
Tempo de geração	< 6 h	> 6 h
Utilização de carboidratos	Pentoses, hexoses e mono-, di-, e trissacarídeos	Pentoses e hexoses
Vias metabólicas ⁽¹⁾	EMP baixa atividade Específica da estirpe ED via principal TCA completamente ativo PP	EMP baixa atividade ED via principal TCA completamente ativo Ciclo da hexose
Flagelos	Peritríquios	Subpolar
Localização do gene simbiótico	Plasmídeo e cromossomo	Cromossomo
Localização do gene de fixação do nitrogênio	nifH, nifD, nifK no mesmo operon	NifD, nifK, e nif H em operons separados
Resistência intrínseca a antibióticos	Baixa	Alta

⁽¹⁾ ED, via Entner-Doudoroff; EMP, via Embden-Meyerhof-Parnas; PP, via Fosfato Pentose; TCA, Ciclo do Ácido Tricarboxílico. (Elkan, 1992)

3. Taxonomia Recente de Rizóbios

Apesar da grande diversidade de plantas leguminosas hospedeiras disponíveis para os microssimbiontes, somente dois gêneros de rizóbio (*Rhizobium* e *Bradyrhizobium*) e quatro espécies eram descritas na primeira edição do manual de Bergey. O notável progresso na taxonomia rizobiana levou à descrição de mais de 40 novas espécies e de quatro gêneros adicionais, ou seja, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*. O gênero *Allorhizobium*, inicialmente proposto por Lajudie et al. (1998b) com uma única espécie, *A. undicola*, foi posteriormente incorporado ao gênero *Rhizobium* (Young et al., 2001).

Os gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*, que tradicionalmente tinham sido incluídos na família *Rhizobiaceae*, passaram a pertencer às novas famílias *Azorhizobiaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Phyllobacteriaceae*, respectivamente (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001). A família *Rhizobiaceae* compreende os gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium* e é genotipicamente relacionada à família *Phyllobacteriaceae*. As famílias *Azorhizobiaceae* e *Bradyrhizobiaceae* são muito próximas filogeneticamente, mas estão distantes das demais famílias.

Embora todos os gêneros de rizóbio pertençam à subclasse Alphaproteobacteria, recentemente, bactérias pertencentes à subclasse Betaproteobacteria têm sido identificadas em nódulos de leguminosas. Isolados bacterianos obtidos de nódulos de *Aspalathus carnosus* e *Machaerium lunatum* foram identificados como *Burkholderia* (Moulin et al., 2001) e *Ralstonia taiwanensis* e *Ralstonia eutropha* foram identificados em nódulos de *Mimosa*, na China (Chen et al., 2001) e na Índia (Tripathi, 2002), respectivamente.

Gênero *Rhizobium*

Dentro do grupo que foi classificado como *Rhizobium*, três gêneros são agora reconhecidos: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988) e *Mesorhizobium* (Jarvis et al. 1997).

A taxonomia de rizóbios que nodulam *Phaseolus vulgaris* foi a que passou por maiores alterações taxonômicas, nos últimos anos, desde a descrição de *Rhizobium phaseoli*, baseada unicamente na habilidade da bactéria em nodular seu hospedeiro. Com o surgimento de técnicas moleculares adequadas, tornou-se evidente a grande diversidade de estirpes capazes de nodular essa leguminosa. Atualmente, elas são classificadas em cinco espécies. *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* foi primeiro dividido em tipos I e II (Martínez et al., 1988). *Rhizobium tropici* tipos A e B foram propostos para as estirpes do tipo II, carregando uma única cópia do gene *nifH*.

Os tipos A e B diferem entre si pelos valores de hibridização DNA-DNA, por características fenotípicas e pela presença de megaplasmídeos específicos (Martínez-Romero et al., 1991; Geniaux et al., 1995). *R. etli* foi então proposto para as estirpes *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* tipo I (Segovia et al. 1993). Elas possuem cópias múltiplas do gene estrutural da nitrogenase em seus plasmídeos simbióticos. Trabalhos posteriores realizados com isolados obtidos de nódulos de raízes de *Mimosa affinis* levaram à proposição de um novo biovar, bv. *mimosae*, dentro da espécie *R. etli* (Wang et al., 1999a). Embora ambos os biovars, *phaseoli* e *mimosae*, possam nodular *P. vulgaris*, somente o biovar *mimosae* pode formar nódulos fixadores de nitrogênio em *Leucaena leucocephala*.

Dois espécies adicionais de rizóbio capazes de estabelecer simbiose com o feijoeiro foram caracterizadas na França. Os nomes propostos foram *R. gallicum* e *R. giardinii* (Laguerre et al., 1993; Amarger et al., 1997). Essas espécies foram subdivididas em dois biovars; *R. gallicum* bv. *phaseoli* e *R. giardinii* bv. *phaseoli* mostraram a mesma variação relativa ao hospedeiro do *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, o mesmo número de cópias do gene *nifH* e homologia em termos do gene *nodB* de *R. etli*. *R. gallicum* bv. *gallicum* e *R. giardinii* bv. *giardini* nodulam *L. leucocephala* e não são homólogos ao *R. etli* com relação ao gene *nodB*, como o são com *R. tropici*. Eles possuem cópias únicas do gene *nifH* e não foi detectada homologia em relação aos genes estruturais *nifK*, *D* e *H*, que são altamente conservados entre os fixadores de N₂.

Lindström (1989), por meio de estudos com bactérias que nodulam as espécies *Galega orientalis* e *Galega officinalis*, mostrou que o rizóbio de crescimento rápido

encontrado nessas espécies não era claramente relacionado às espécies de rizóbio até então conhecidas. Uma nova espécie de rizóbio foi então proposta e denominada *Rhizobium galegae*. Estirpes dessa espécie de rizóbio são, porém, muito específicas quanto às plantas hospedeiras e à fixação de nitrogênio. Radeva et al. (2001) mostraram características genéticas diferentes relacionadas à simbiose em *R. galegae* e propuseram as denominações de *R. galega* bv. *orientalis* e *R. galega* bv. *officinalis* para as estirpes que formam simbiose eficiente com *G. orientalis* e *G. officinalis*, respectivamente. Uma nova espécie de *Rhizobium* isolada de *Sesbania herbacea*, no México, foi filogeneticamente relacionada ao *R. galegae* e nomeada *Rhizobium huautlense* (Wang et al., 1998).

Mais recentemente outras espécies de *Rhizobium* foram propostas:

➤ Tan et al. (2001) propuseram o nome de *R. yanglingense* à espécie nova de rizóbio obtida de leguminosas selvagens, em regiões áridas e semi-áridas no noroeste da China. Esta espécie não forma nódulos em *Galega orientalis* e *Leucaena leucocephala*, enquanto que em *Phaseolus vulgaris* os nódulos formados são ineficientes.

➤ Wei et al. (2002), utilizando uma abordagem polifásica, caracterizaram estirpes de rizóbio isoladas de *Indigofera* e propuseram uma nova espécie que foi nomeada *Rhizobium indigoferae*.

➤ Squartini et al. (2002) descreveram e propuseram o nome de *Rhizobium sullae* (inicialmente denominado *Rhizobium hedysari*) ao microssimbionte isolado de *Hedysarum coronarium* L..

➤ Wei et al. (2003) isolaram rizóbios de leguminosas do gênero *Astragalus* e propuseram uma nova espécie: *Rhizobium loessense* (inicialmente denominado *Rhizobium huanglingense*). Estirpes dessa espécie foram isoladas de *A. scobwerimus*, *A. complanatus* e *A. chrysopterus* e foram capazes de nodular *A. adsurgens* sob condições de laboratório.

Gênero *Bradyrhizobium*

As estirpes de *Bradyrhizobium*, que nodulam soja efetivamente, eram todas conhecidas como *B. japonicum* (Jordan, 1982). Na década de 1980 vários trabalhos constataram grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum* e, como consequência, Kuykendall et al. (1992) sugeriram a subdivisão de *Bradyrhizobium* em duas espécies, *B. japonicum* e *B. elkanii*. Esta espécie é mais competitiva e mostra alta resistência a alguns antibióticos, enquanto *B. japonicum* é mais eficiente e fixa mais N₂. Outra espécie, com a taxa de crescimento excepcionalmente lenta, foi proposta e denominada *B. liaoningense* (Xu et al., 1995). Rizóbios isolados de nódulos de *Lеспеzeа* sp., proveniente da China, levaram à descrição de uma nova espécie que foi nomeada *B. yuanningense* (Yao et al., 2002); esta espécie não forma nódulos em soja. Existem muitas outras estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* que não nodulam soja; elas são simplesmente conhecidas como *Bradyrhizobium* sp., seguido pelo nome do gênero da leguminosa hospedeira entre parênteses (Young e Haukka, 1996), por exemplo, *Bradyrhizobium* sp. (*Acacia*), *Bradyrhizobium* sp. (*Aeschynomene* sp.) e *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*).

Mais recentemente, Rivas et al. (2004) isolaram estirpes bacterianas endofíticas de crescimento lento de estruturas semelhantes a tumores em raízes de *Beta vulgaris*, no norte da Espanha. Estudos dessas bactérias, por meio de abordagens taxonômicas moleculares e fenotípicas, mostraram que elas representavam nova espécie de *Bradyrhizobium* filogeneticamente similar ao *B. japonicum*. A esses isolados foi proposto o nome de *Bradyrhizobium betae*.

O nome *B. canariense* foi proposto para designar estirpes de rizóbio isoladas de leguminosas arbustivas, nas ilhas Canárias. Essa espécie difere das outras cinco espécies de *Bradyrhizobium* em várias características genotípicas, fisiológicas e ecológicas (Vinueza et al., 2005). Estirpes de *B. canariense* são altamente tolerantes a acidez, nodulam diversas leguminosas nas tribos Genisteeae e Loteae, mas não espécies de *Glycine*.

Gênero *Sinorhizobium*

Este gênero foi originalmente proposto por Chen et al. (1988) para incluir *Rhizobium fredii* e a nova espécie *S. xinjiangense*; a primeira proposta foi rejeitada, porque as seqüências do gene 16S rRNA indicaram que *Rhizobium fredii* era filogeneticamente relacionado a *Rhizobium meliloti*. Após um período de controvérsia essas duas espécies foram consideradas como pertencentes ao novo gênero *Sinorhizobium*. Esse gênero inclui hoje, além das já citadas, as espécies *S. sahelense* e *S. teranga*, que foram descritas após realizações de pesquisas com rizóbios indígenas, de crescimento rápido, no Senegal, oeste da África (de Lajudie et al., 1994). Essas últimas espécies foram divididas em dois biovars *sesbaniae* e *acaciae*, que compreendem as estirpes que nodulam *Sesbania* e *Acacia* respectivamente (de Lajudie et al., 1994).

Sinorhizobium arboris e *S. kostiense* foram propostas como espécies novas por Nick et al. (1999) e *S. morelense* foi descrita para designar um grupo de bactérias isoladas de nódulos de raízes de *Leucaena leucocephala* (Wang et al., 2002a). Estirpes dessa última espécie são altamente resistentes a alguns antibióticos, tais como, carbenicilina, canamicina e eritromicina. Bactérias isoladas de nódulos de *Kummerowia stipulacea* levaram à identificação de uma nova espécie de rizóbio, que recebeu a denominação de *S. kummerowiae* (Wei et al., 2002).

Sinorhizobium americanus, *S. indiaense* e *S. abri* foram recentemente descritas como espécies novas, nodulando, respectivamente, *Acacia* spp., no México (Toledo et al. 2003), *Sesbania rostrata* e *Abrus precatorius*, na Índia (Ogasawara et al. 2003).

Gênero *Mesorhizobium*

Rhizobium loti e outras espécies de *Rhizobium* apresentavam diferenças nas similaridades das seqüências 16S rDNA, nas taxas de crescimento e nos perfis de ácidos graxos, que as descaracterizavam de outras espécies dos gêneros *Rhizobium* ou *Sinorhizobium* (Jarvis et al., 1996). Para estas espécies Jarvis et al. (1997) propuseram um gênero novo, *Mesorhizobium*, que na época incluiu as seguintes espécies: *M. loti*, *M. ciceri* (Nour et al., 1994), *M. huakuii* (Chen et al., 1991), *M. mediterraneum* (Nour

et al., 1995), *M. tianshanense* (Chen et al., 1995) e *M. plurifarum* (de Lajudie et al., 1998a). Posteriormente, Wang et al. (1999), após extensivos estudos com rizóbios isolados de *Amorpha fruticosa*, na China, descreveram e propuseram a espécie nova, *M. amorphae*. Essa espécie de rizóbio contém plasmídeo simbiótico de 930 kb, ao contrário da maioria das outras espécies de *Mesorhizobium*, que, com exceção do *M. huakuii* (Zou et al., 1997), carregam os genes simbióticos em seus cromossomos. Isolados obtidos de *Prosopis alba*, na Argentina, levaram à proposição da espécie *M. chacoense* (Velásquez et al., 2001).

Mais recentemente, outras duas espécies pertencentes ao gênero *Mesorhizobium* foram descritas: *Mesorhizobium septentrionale* e *M. temperatum*. Essas espécies foram isoladas na região norte da China em plantas de *Astragalus adsurgens* (Gao et al., 2004).

Gênero *Azorhizobium*

Esse gênero foi descrito por Dreyfus et al. (1988). A única espécie nomeada no gênero é *A. caulidonans*, que nodula caule e raízes de *Sesbania rostrata*. As estirpes que nodulam o caule de *Sesbania* diferem dos rizóbios de crescimento rápido por terem um único flagelo lateral e por serem incapazes de utilizar muitos dos carboidratos comumente metabolizados pelos rizóbios. As tabelas 2 e 3 apresentam de forma resumida os gêneros de rizóbio e as espécies descritas até o momento.

4. Diversidade de rizóbios

Devido à importância ecológica e econômica dos rizóbios e com o surgimento e aplicação de novas técnicas moleculares, esses microrganismos têm sido intensivamente estudados durante a última década. Entretanto, a nodulação somente tem sido avaliada numa pequena parte das leguminosas (8% num total de 18000 espécies conhecidas) (Sprent, 1995), enquanto que a maioria dos solos do mundo ainda não foi explorada para a presença ou não de rizóbios. Não existem dúvidas, portanto, sobre a ocorrência de grande diversidade dessas bactérias ainda por ser explorada, com possibilidades de surgimento de novas espécies no futuro. Os estudos publicados, até o momento, sobre diversidade e filogenia de rizóbios consideram mais os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, do que o gênero *Bradyrhizobium*. A tabela 4 mostra, em termos mundiais, os locais onde os diferentes gêneros de rizóbio têm sido encontrados.

Nos estudos sobre diversidade de rizóbio são utilizadas tanto as técnicas baseadas no fenótipo quanto aquelas baseadas no genótipo. As técnicas fenotípicas incluem sorologia, resistência intrínseca a antibióticos, conteúdo de plasmídeos, tipo de fago e eletroforese da proteína total da célula.

As técnicas sorológicas, embora amplamente utilizadas para a caracterização de rizóbios (Irisarri et al., 1996; Olsen et al., 1994), não fornecem informações sobre os isolados que não reagem com os anticorpos. A sorologia seria útil para a identificação de estirpes homólogas em co-inoculação ou em experimentos de competição em que ocorra co-reação com outras estirpes.

Tabela 2. Gêneros e espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* que nodulam raízes de leguminosas. Gêneros em parênteses referem-se às leguminosas hospedeiras.

Rhizobium (Rhizobiaceae)	
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii (<i>Trifolium</i>), bv. viciae (<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i>), bv. phaseoli (<i>Phaseolus</i>)	(Jordan, 1982)
<i>R. tropici</i> (<i>Phaseolus</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Macroptilium</i>)	(Martinez et al., 1991)
<i>R. etli</i> (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	(Segovia et al., 1993)
<i>R. galegae</i> (<i>Galega</i> , <i>Leucaena</i>)	(Lindstrom, 1989)
<i>R. gallicum</i> (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	(Amarger et al., 1997)
<i>R. giardini</i> (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	(Amarger et al., 1997)
<i>R. huautlense</i> (<i>Sesbania</i>)	(Wang et al., 1998)
<i>R. mongolense</i> (<i>Medicago</i>)	(van Berkum et al., 1998)
<i>R. hainanense</i> (<i>Desmodium sinuatum</i>)	(Chen et al., 1997)
<i>R. indigoferae</i> (<i>Indigofera</i>)	(Wei et al., 2002)
<i>R. loessense</i> (<i>Astragalus</i> , <i>Lespedeza</i>)	(Wei et al., 2003)
<i>R. sullae</i> (<i>Hedysarum coronarium</i>)	(Squartini et al., 2002)
<i>R. yanglingense</i> (<i>Amphicarpaea trisperma</i> ; <i>Coronilla varia</i> ; <i>Gueldenstaedtia multiflora</i>)	(Tan et al., 2001)
<i>R. undicola</i> (<i>Neptunia natans</i>)	(Young et al., 2001)
Bradyrhizobium (Bradyrhizobiaceae)	
<i>B. japonicum</i> (<i>Glycine max</i>)	(Jordan, 1982)
<i>B. elkanii</i> (<i>Glycine max</i>)	(Kuykendall et al., 1992)
<i>B. liaoningense</i> (<i>Glycine max</i>)	(Xu et al., 1995)
<i>B. yuanmingense</i> (<i>Lesperezia</i> sp.)	(Yao et al., 2002)
<i>B. canariense</i>	(Vinuesa et al., 2005)
<i>B. betae</i> (<i>Beta vulgaris</i>)	(Rivas et al., 2004)

A utilização da técnica de perfis de plasmídeos é hoje uma poderosa ferramenta no estudo da diversidade genética de rizóbios. Variações nos perfis de plasmídeos de estirpes de espécies individuais de *Rhizobium* têm sido amplamente relatadas (Cadahia et al., 1986; Young e Wexler, 1988; Bromfield et al., 1987). Em solo do Egito, por exemplo, grande diversidade entre as estirpes de *Rhizobium* de trevo, lentilha e feijão foi constatada com a utilização dessa técnica (Moawad et al., 1998). No caso de determinadas espécies de rizóbio, como, por exemplo, *R. leguminosarum* biovar viceae, num mesmo sorogrupo, consideráveis variações nos perfis de plasmídeos foram encontradas entre isolados de campo (Brockman e Bezdicek, 1989).

Os métodos eletroforéticos são facilmente adaptados para a comparação de muitas amostras. A verificação de grande variação na estrutura dos lipopolissacarídeos e no seu comportamento eletroforético tornou possível o uso de perfis desses compostos como um critério para diferenciação entre isolados (de Maagd et al., 1988). Esse método é, algumas vezes, o mais adequado e discriminatório para a identificação de

estirpes de *Bradyrhizobium* do que os perfis eletroforéticos de plasmídeos e proteínas. Nas ilhas Canárias, Santamaria et al. (1997) caracterizaram 27 isolados de *Bradyrhizobium* e um de *Rhizobium* capazes de nodular leguminosas arbustivas indígenas. Esses isolados apresentaram grande diversidade antigênica, que pareceu estar associada à grande diversidade estrutural dos seus lipopolissacarídeos (os principais determinantes antigênicos). Os 28 isolados estudados produziram 22 perfis eletroforéticos facilmente distinguíveis. Não foi observada nenhuma correlação entre os perfis de lipopolissacarídeos dos isolados e a planta da qual eles foram obtidos, ou sua origem geográfica.

Tabela 3. Gêneros e espécies de *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* e *Mesorhizobium* que nodulam raízes de leguminosas. Gêneros e espécies em parênteses referem-se às leguminosas hospedeiras.

<i>Sinorhizobium</i> (<i>Rhizobiaceae</i>)	(Chen et al., 1988)
<i>S. meliloti</i> (<i>Melilotus</i> , <i>Medicago</i> , <i>Trigonella</i>)	(de Lajudie et al., 1994)
<i>S. fredii</i> (<i>Glycine</i>)	(Jarvis et al., 1992)
<i>S. sahelense</i> (<i>Sesbania</i>)	(de Lajudie et al., 1994)
<i>S. teranga</i> (<i>Sesbania</i> , <i>Acacia</i>)	(de Lajudie et al., 1994)
<i>S. xinjiangensis</i> (<i>Glycine max</i>)	(Chen et al., 1988)
<i>S. arboris</i> (<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>)	(Nick et al., 1999)
<i>S. medicae</i> (<i>Medicago</i>)	(Rome et al., 1996)
<i>S. kostiense</i> (<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>)	(Nick et al., 1999)
<i>S. morelense</i> (<i>Leucaena leucocephala</i>)	(Wang et al. 2002b)
<i>S. kummerowiae</i> (<i>kummerowia stipulacea</i>)	(Wei et al., 2002)
<i>S. americanus</i> (<i>Acacia spp.</i>)	(Toledo et al., 2003)
<i>S. indiaense</i> (<i>Sesbania rostrata</i>)	(Ogasawara et al., 2003)
<i>S. abri</i> (<i>Abrus precatorius</i>)	(Ogasawara et al., 2003)
<i>Azorhizobium</i> (<i>Hyphomicrobiaceae</i>)	(Dreyfus et al., 1988)
<i>A. caulinodans</i> (<i>Sesbania</i>)	(Dreyfus et al., 1988)
<i>Mesorhizobium</i> (<i>Phyllobacteriaceae</i>)	(Jarvis et al., 1997)
<i>M. loti</i> (<i>Lotus</i>)	(Jordan, 1982; Jarvis et al., 1997)
<i>M. ciceri</i> (<i>Cicer arietinum</i>)	(Nour et al., 1994; Jarvis et al., 1997)
<i>M. tianshanense</i> (<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> , <i>Swansonia</i> , <i>Glycine</i> , <i>Caragana</i> , <i>Sophora</i>)	(Chen et al., 1995; Jarvis et al., 1997)
<i>M. mediterraneum</i> (<i>Cicer arietinum</i>)	(Nour et al., 1995; Jarvis et al., 1997)
<i>M. huakuii</i> (<i>Astragalus</i>)	(Chen et al., 1991; Jarvis et al., 1997)
<i>M. amorphae</i> (<i>Amorpha fruticosa</i>)	(Wang et al., 2002b)
<i>M. plurifarium</i> (<i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i> , <i>Leucaena</i>)	(de Lajudie et al., 1998a)
<i>M. chacoense</i> (<i>Prosopis alba</i>)	(Velazquez et al., 2001)
<i>M. septentrionale</i> (<i>Astragalus adsurgens</i>)	(Gao et al., 2004)
<i>M. temperatum</i> (<i>Astragalus adsurgens</i>)	(Gao et al., 2004)

Tabela 4. Gêneros de rizóbio e os locais onde já foram isolados ⁽¹⁾

Gêneros	Locais de isolamento
<i>Rhizobium</i>	Disseminado mundialmente
<i>Bradyrhizobium</i>	África, Ásia, Austrália, Europa, América do Sul e do Norte, Região Ártica
<i>Mesorhizobium</i>	África, Ásia, América do Sul e do Norte, Europa, Austrália
<i>Sinorhizobium</i> ⁽²⁾	Ásia, África, Europa, América do Sul e do Norte
<i>Azorhizobium</i>	África e Ásia

⁽¹⁾ Adaptada de Sessitch et al. (2002). ⁽²⁾ Existe *S. meliloti* na Austrália que pode ter co-evoluído com o *Trigonella* indígena.

As similaridades de resultados, algumas vezes obtidos, entre diferentes técnicas, parece depender, em parte, do hospedeiro do qual as estirpes foram obtidas. Moawad et al. (1998) mostraram similaridades entre os sorotipos de isolados de lentilha e seus padrões de resistência intrínseca a antibióticos (RIA). Entretanto, essas similaridades não foram encontradas entre os sorogrupos de isolados de feijão e trevo e seus grupos RIA. Isso demonstra que os resultados da sorologia são menos variáveis do que a RIA em estirpes de *R. leguminosarum* e que essa técnica pode ser usada como ferramenta complementar, associada a métodos sorológicos, para identificar e discriminar estirpes de *R. leguminosarum*.

Dentre as técnicas genotípicas pode ser citada a eletroforese de enzima multiloco que é amplamente utilizada para fornecer informações sobre variação genética dentro da espécie e para avaliar a estrutura genética de populações naturais (Martinez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). Métodos baseados na PCR, como RAPD, são também empregados para análise da variação genética dentro de espécies de rizóbio. O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA (RFLP) usado em conjunto com uma variedade de sondas de DNA tem sido comumente utilizado para avaliar a diversidade genética, a variação genética dentro de espécie e para inferir sobre a estrutura das populações de rizóbio no solo (Bromfield et al., 1998). Análises dos padrões de bandas produzidas pelo PCR-RFLP do gene *16S rRNA* ou genes simbióticos (*nod* e *nif*) são utilizadas para distinguir rizóbios em nível de espécie e para inferir sobre relacionamentos filogenéticos (Laguerre et al., 1994). Análise PCR-RFLP da região espaçadora intergênica (IGS) entre os genes *16S* e *23S rRNA* é empregada com sucesso para detectar variação genética dentro de uma espécie particular de rizóbio (Laguerre et al., 1996). O seqüenciamento do DNA dos genes *16S* ou *23S rRNA* é útil para estimar as relações evolucionárias entre rizóbios (Prévost e Bromfield, 2003).

A troca de sinais moleculares entre a planta e o rizóbio é essencial para que a nodulação ocorra; pouco, porém, é conhecido sobre os aspectos da interação que favorecem uma estirpe em relação à outra, quando as plantas são expostas a diferentes populações de rizóbios (Demezas et al., 1995). Nesse sentido, estudos para avaliar a diversidade destas bactérias deveriam utilizar grande número de plantas armadilhas.

O isolamento do rizóbio deveria ser feito de poucos nódulos retirados da porção mais velha da raiz, para evitar tendências de se isolar aquelas estirpes com maior capacidade de se multiplicar em meio artificial (Handley et al., 1998). O guandu (*Cajanus cajan* L.) é considerada uma eficiente planta hospedeira armadilha para o estudo da diversidade de rizóbios (Coutinho et al., 1999). Apresenta baixa especificidade hospedeira, sendo nodulado por isolados de crescimento rápido e lento. Outros trabalhos demonstram a importância da planta hospedeira no estudo da diversidade de rizóbios no solo (Rodríguez-Navarro et al., 2000; Bala et al., 2003). Interações entre planta hospedeira e populações indígenas de rizóbios são encontradas até mesmo em nível de cultivares (Rodríguez-Navarro et al., 2000).

Em alguns locais, como, por exemplo, nos solos do continente africano, a grande diversidade de populações de rizóbios somente recentemente foi descrita (Mpeperekí et al., 1997). Rizóbios nativos de caupi, em solos da Nigéria, são provavelmente o único grupo que tem sido estudado com algum detalhe (Eaglesham et al., 1987; Sinclair e Eaglesham, 1984). No Zimbábue, a grande diversidade de rizóbios nativos de caupi aponta para a possível existência de várias espécies ainda não identificadas, embora elas compartilhem suas características fisiológicas e culturais com estirpes de espécies definidas (Mpeperekí et al., 1997). Evidências encontradas em solos africanos demonstram que os rizóbios de caupi não são, possivelmente, todos de crescimento lento.

No Senegal, oeste da África, isolados de rizóbios obtidos de *Crotalaria* spp. têm revelado a presença de estirpes de rápido e lento crescimento (Samba et al., 1999). Análises moleculares demonstraram que as estirpes de crescimento lento são relacionadas a *Bradyrhizobium japonicum*, enquanto as de crescimento rápido não são relacionadas a qualquer estirpe de referência e constituem um grupo novo de rizóbios.

Rizóbios indígenas de crescimento lento, que nodulam soja, foram encontrados em solos do Zimbábue (Davis e Mpeperekí, 1995 citados por Mpeperekí et al. 1997), onde os isolados mostraram similaridades culturais e sorológicas com a espécie *Bradyrhizobium elkanii*.

Na China e no Vietnã, considerável diversidade genética foi também encontrada entre rizóbios de crescimento rápido que nodulam a soja (Saldaña et al., 2003). Os isolados provenientes da China mostraram maiores níveis de diversidade do que as estirpes oriundas do Vietnã. Ainda na China, Chen et al. (2005) demonstraram que 29 estirpes de rizóbio de crescimento lento foram todas agrupadas com *S. fredii* USDA205 e *S. xinjiangensis* CCBAU110, enquanto que 23 estirpes de rizóbio de crescimento lento foram altamente relacionadas com *B. japonicum* e *B. liaoningensis*. Na província de Hubei, na China, foi encontrada alta diversidade de *S. fredii* capaz de nodular a soja. A análise fisiológica e os perfis de plasmídeos e de proteínas totais foram as técnicas que melhor refletiram esta biodiversidade (Camacho et al., 2002). No norte da Tailândia, Yokoyama et al. (1996) relataram a ocorrência de um grupo de bradirrizóbios em soja geneticamente distinto de *B. japonicum* e de *B. elkanii*. Nesse local, a distribuição e as características genéticas dos bradirrizóbios obtidos em áreas cultivadas com soja ainda são pouco documentadas.

No Paraguai, nos estados de Alto Paraná e Itapúa, alta diversidade foi encontrada entre os isolados de rizóbio de crescimento rápido ou lento, obtidos de plantas de soja, com a maioria deles representando estirpes únicas. Muitos isolados apresentaram características associadas tanto a *B. elkanii* quanto a *B. japonicum* (Chen et al., 2002). No Brasil, o isolamento de rizóbios de crescimento rápido de nódulos de soja foi descrito pela primeira vez por Hungria et al. (2001). As estirpes diferiram da espécie *S. fredii* em várias características. Os autores concluíram que embora a soja seja uma planta exótica no Brasil, várias estirpes indígenas de rizóbio podem também estabelecer uma simbiose eficiente com esta leguminosa.

Nos três centros de domesticação do feijoeiro (México, Equador-Peru e Argentina), *R. etli* ocorre predominantemente nos nódulos, enquanto *R. tropici* ainda não foi encontrado. Estirpes de *R. tropici* são mais adaptadas à nodulação em solos ácidos do que estirpes de *R. etli* (Graham et al., 1994), além de serem mais tolerantes a altas temperaturas (Pinto et al., 1998). Estirpes de *R. tropici* são também bem adaptadas a solos arenosos (Acosta-Durán e Martínez-Romero, 2002) e podem ser tolerantes a altas concentrações de sais (Priefer et al., 2001). Sugere-se que a árvore tropical, *Gliricidia sepium*, nativa das Américas é o hospedeiro natural de *Rhizobium tropici*.

Não existem relatos sobre a ocorrência de *R. gallicum* e *R. giardinii* em nódulos de feijão provenientes dos centros de origem nas Américas (Martínez-Romero, 2003). No Brasil, tanto *R. tropici* quanto *R. etli*, *R. giardinii* e *R. leguminosarum* são encontrados em nódulos de feijão (Hungria et al., 2000; Mostasso et al., 2002; Grange e Hungria, 2004). Adicionalmente, rizóbios dos gêneros *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* foram também isolados do feijoeiro no Brasil (Grange e Hungria, 2004), confirmando a natureza promíscua dessa leguminosa.

Rizóbios nativos que nodulam feijão, em solos africanos, são taxonomicamente relacionados a *R. tropici* no leste e sul da África (Anyango et al., 1995) e a *R. tropici* e *R. etli* na África Central (Tjahjoleksono, 1993). No oeste da África, Senegal e Gâmbia, limitada diversidade genética é encontrada entre isolados de feijão pertencentes a *R. tropici* tipo B e a *R. etli* (Diouf et al., 2000). Contrariamente a esses resultados, em solos da Etiópia, *R. leguminosarum* é, possivelmente, a espécie que predomina na simbiose com o feijoeiro (Beyene et al., 2004). Na Jordânia, isolados obtidos de nódulos de feijão foram identificados como *R. tropici* e *R. etli*, com predominância da última espécie (Tamimi e Young, 2004). Tipos distintos de rizóbios que nodulam *Phaseolus vulgaris* são encontrados em solos da Tunísia (Mhamdi et al., 1999). Nesse local, uma parte dos isolados mostrou alta similaridade com *Rhizobium gallicum*, isolado de feijão comum na França, enquanto a outra mostrou algumas características do grupo *R. etli*-*R. leguminosarum*. Um terço dos isolados não foi relacionado a qualquer das cinco espécies de *Rhizobium* que nodulam o feijão. A estrutura das populações de rizóbio, em solo da Tunísia, variou com a localização geográfica e com a presença ou não do hospedeiro. No Egito, Shamseldin et al. (2005) constataram alta diversidade genética entre isolados de rizóbio obtidos de nódulos do feijoeiro. As bactérias foram classificadas como *R. etli* e *R. gallicum*. Um terceiro grupo relacionou-se filogeneticamente a *R. radiobacter* (inicialmente *Agrobacteriu tumefaciens*). *Rhizobium etli* e *R. gallicum* exibiram eficiência simbiótica dependente da cultivar.

A estreita diversidade genética de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* encontrada na Inglaterra e França pode estar ligada ao fato de o feijão ser uma cultura introduzida na Europa (Laguerre et al., 1993). A co-ocorrência de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. tropici* tipo A foi observada em três solos arenosos e ácidos da França. Usando perfis de plasmídeos foram demonstradas diferentes predominâncias de espécies de rizóbio em cada local estudado. Ainda na França (Amarger et al., 1997), como também na Áustria e México (Sessitsch et al., 1997), alguns isolados obtidos de nódulos de feijão foram descritos como *R. gallicum*, apesar de mostrarem algumas diferenças nas hibridizações do DNA total.

Nos solos da Espanha pelo menos cinco espécies de rizóbio nodulam *Phaseolus vulgaris* (Herrera-Cervera et al., 1999), ou seja, *R. etli*, *R. leguminosarum*, *R. gallicum*, *R. giardinii* e estirpes que se assemelham a *S. fredii*, com predominância do *R. etli* bv. *phaseoli*. As estirpes de *Sinorhizobium* não nodulam soja, de modo que análises adicionais são requeridas para esclarecer suas posições taxonômicas. A tabela 5 mostra, de forma resumida, os locais onde foram isoladas espécies de *Rhizobium* associadas ao *Phaseolus vulgaris*.

Tabela 5. Espécies de *Rhizobium* isoladas de nódulos do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) ⁽¹⁾

	Locais de isolamento
<i>R. etli</i>	México, Colômbia, Equador-Peru, Argentina, Brasil, Senegal, Gâmbia, Tunísia, Espanha, Áustria, USA
<i>R. tropici</i>	Brasil (tipos A, B e outros), Colômbia (tipo B), França (tipo A), Marrocos, Quênia, Senegal, Gâmbia (tipo B)
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Inglaterra, França, Espanha, Colômbia, Brasil, Tunísia
<i>R. gallicum</i>	França, Áustria, México (bv. <i>gallicum</i> somente), Tunísia, Espanha, Egito
<i>R. giardinii</i>	França, Espanha, Brasil

⁽¹⁾ Adaptada de Martínez-Romero (2003).

Rizóbios isolados de *Leucaena leucocephala*, em solos mexicanos, onde essa planta é nativa, apontam para uma alta diversidade dessas bactérias (Wang et al., 1999b). Apesar de a leucena ser considerada uma planta hospedeira promíscua e nodular com bactérias de pelo menos três gêneros filogeneticamente relacionados, a comunidade de rizóbios naqueles locais varia entre as cultivares. *L. leucocephala* é também considerado o hospedeiro adequado para diferenciar estirpes de *R. tropici* e *R. etli* (Segovia et al., 1993) e *R. etli* bv. *mimosae* de *R. etli* bv. *etli* (Wang et al., 1999a). A existência de estirpes de *M. plurifarium*, em solos mexicanos, como microssimbiontes nativos de *L. leucocephala*, foi também relatada. Essas estirpes formaram populações geneticamente diversas no solo e foram capazes de formar nódulos em *P. vulgaris* e *S. herbacea* (Wang et al., 2003). Ainda em solos mexicanos foi constatada grande diversidade genética na comunidade de *Bradyrhizobium*, isolada de espécies de *Lupinus* (Barrera et al., 1997).

Em solos de Taiwan foi encontrada alta diversidade de populações de rizóbios indígenas associados com *Sesbania cannabina* (Chen e Lee, 2001). Os isolados obtidos foram mais filogeneticamente relacionados a estirpes de *Sinorhizobium* e *R. huautlense*. Embora seja relatado que os genes *nifH* em isolados de sinorizóbios de árvores leguminosas poderiam ser divididos em dois grupos filogeneticamente distintos, com base em suas localizações, i.e., África ou América Latina (Haukka et al., 1998), as relações filogenéticas dos isolados de *S. cannabina*, relacionados ao gênero *Sinorhizobium*, em Taiwan, são aparentemente diferentes. Na Índia, *S. saheli*, *S. meliloti* e *R. huautlense* foram isolados dos nódulos de raízes de *S. sesban*, *S. algyptica* e *S. rostrata* (Sharma et al., 2005). Embora a ocorrência desses diferentes gêneros de rizóbio tenha sido anteriormente descrita, o trabalho de Sharma et al. (2005) é o primeiro relato da ocorrência de gêneros diferentes de rizóbio em uma mesma planta hospedeira (*S. sesban*) e na mesma região geográfica. Estirpes de rizóbio isoladas de *Sesbania* e *Acacia* na África foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Ba et al., 2002; Odee et al., 2002). No Uruguai, leguminosas, tais como *S. sesban* ou *Acacia caven* podem ser noduladas por rizóbios de crescimento rápido ou lento, que não foram identificados em nível de espécie (Frioni et al., 2001). Resultados similares foram obtidos com *S. sesban* e *Acacia saligna* no Egito (Swelin et al., 1997). Em Porto Rico, *R. gallicum* e *R. tropici* nodulam espécies de *Sesbania*, *Caliandra*, *Poitea*, *Piptadenia*, *Neptunia* e *Mimosa*; estas leguminosas não haviam sido previamente consideradas como hospedeiras desses rizóbios (Zurdo-Piñeiro et al., 2004). No México, árvores leguminosas como *Gliricidia septium* é nodulada pelo *R. tropici* tipos A e B, *Sinorhizobium* spp. e *R. etli* bv. *phaseoli* (Acosta-Durán et al., 2002). Na África (norte e sul da região do Saara), a maioria das estirpes de rizóbio isolada de *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* pertence aos gêneros *Sinorhizobium* e *Mezorhizobium* (Ba et al., 2002).

O gênero *Astragalus* inclui cerca de 1500-2000 espécies, sendo um dos maiores gêneros dentro da família Leguminosae. Apesar disso, poucos trabalhos sobre taxonomia de rizóbio associados a esse gênero têm sido feito. Rizóbios isolados de *Astragalus sinicus* na China foram classificados como *Mesorhizobium huakuii* (Chen et al., 1991). Estudos sobre a diversidade genética de rizóbios de *Astragalus adsurgens* na China demonstraram que essa leguminosa pode ser nodulada por linhagens bacterianas pertencentes aos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Gao et al., 2001). Diferentes grupos de rizóbio foram também definidos entre isolados e outras espécies de *Astragalus* na China e em outros países (Laguerre et al., 1997; Wdowiak e Malek, 2000).

No Brasil as diferentes condições geoambientais exercem um forte efeito sobre a diversidade de rizóbios (Martins et al., 1997). Na região Nordeste, análises dos isolados de caupi de diferentes locais mostraram um aumento na proporção de rizóbios de crescimento rápido, no sentido da costa para a região semi-árida. Fenótipos *Hup*⁺ foram predominantes nessa parte do território brasileiro. Em solos de cerrado, verifica-se alto grau de diversidade genética nas populações indígenas de *Rhizobium* que nodulam *Phaseolus vulgaris* (Sá et al., 1997).

Tabela 6. Resumo de alguns trabalhos realizados nos últimos anos para avaliação da diversidade genética de rizóbios em leguminosas.

	Local	Hospedeiro	Resultados
Parker e Lunck, 2000	Panamá	<i>Platypodium elegans</i> <i>Machaerium milleflorum</i> <i>Machaerium arboreum</i>	Bactérias que nodulam as raízes constituem um grupo diverso de genótipos relacionados ao <i>B. japonicum</i>
Ulrich e Zaspel, 2000	Alemanha	<i>Rodinia pseudoacacia</i> L.	Alta diversidade fenotípica e filogenética entre as estirpes de rizóbio; A maioria dos isolados foi classificada no gênero <i>Mesorhizobium</i>
Aguilar et al., 2001	Argentina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium etli</i> foi a espécie predominante em nódulos de feijão
Jebara et al., 2001	Tunísia	Medicago	Alta diversidade genética entre estirpes de <i>Sinorhizobium</i> .
Seguin et al., 2001	USA e Rússia	<i>Trifolium ambiguum</i>	Baixa diversidade genética de rizóbios obtidos nos EUA comparativamente à Rússia, que é o centro de origem do <i>Trifolium ambiguum</i>
Yao et al., 2002	China e EUA	<i>Lespedeza</i> spp.	A maioria dos isolados dos EUA foi identificada como <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> ; Os isolados da China foram classificados, principalmente, como <i>Sinorhizobium saheli</i> e <i>B. yuanmingense</i>
You et al., 2002	Guam	<i>V. unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i> C. juncea	A maioria dos isolados obtidos foi similar ao <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Jarabo-Lorenzo et al., 2003	Vários países	<i>Lupinus</i> e <i>Ornithopus</i> sp	<i>Lupinus</i> é um hospedeiro promíscuo que é nodulado por rizóbios com diferentes genótipos que poderiam pertencer a várias espécies de <i>Bradyrhizobium</i>
Mutch et al., 2003	Jordânia	<i>Vicia faba</i>	Sete isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> foram obtidos

Continua

Tabela 6. Conclusão

	Local	Hospedeiro	Resultados
Ballard et al., 2004	Austrália	<i>Pisum sativum</i> L.	As estirpes de rizóbio naturalizadas nos solos ao sul da Austrália são geneticamente diversas e diferentes das estirpes que usadas em inoculantes comerciais.
Wolde-meskel et al., 2004	Etiópia	Leguminosas lenhosas exóticas e nativas	Considerável diversidade de rizóbios indígenas no solo; 29% das estirpes foram ligadas a membros de <i>Agrobacterium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> ou <i>Sinorhizobium</i> ; 71% das estirpes não se relacionaram às espécies de referência utilizadas no estudo; Espécies de leguminosas exóticas estabeleceram simbiose com estirpes de somente um grupo genômico específico; Espécies de leguminosas indígenas foram noduladas por grupos diversos, genômica e metabolicamente.
Liu et al., 2005	China	<i>Wisteria sinensis</i> <i>Cercis racemosa</i> <i>Amorpha fruticosa</i>	Foram encontradas 17 espécies possivelmente pertencentes aos gêneros <i>Agrobacterium</i> , <i>Mesorhizobium</i> e <i>Rhizobium</i> , além de linhagens não definidas, entre os 59 isolados obtidos.
Yang et al., 2005	China	<i>Arachis hypogaea</i>	Considerável diversidade nas características fenotípicas e genotípicas foi observada entre isolados de <i>Bradyrhizobium</i> obtidos de diferentes regiões geográficas na China
Wolde-Meskel et al., 2005	Etiópia	Espécies leguminosas agrofloretais	Encontrado vários grupos de rizóbios não relacionados aos gêneros conhecidos
Martyniuk et al., 2005	Polónia	Hospedeiro não definido Amostras de solo coletadas em diferentes regiões	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> = encontrado em 96% dos solos; <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> = encontrado em 95% dos solos; <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> = encontrado em 96% dos solos; <i>Bradyrhizobium</i> sp (<i>Lupinus</i>) = 42% dos solos possuíam de alta a moderada comunidade; <i>S. meliloti</i> = somente 7,5% dos solos possuíam de alta a moderada população

Embora a acidez do solo seja considerada, em muitas situações, um fator de estresse, a diversidade de rizóbios nem sempre é diminuída nessas condições. A diferença chave na comunidade de bactérias entre solos de baixo e alto pH estaria nos tipos predominantes de rizóbios (Anyango et al., 1995). A diversidade genética de populações de *Rhizobium* isoladas de grão de bico, oriundos de diferentes regiões de Portugal, foi baixa em solos ácidos e alta entre os isolados de solos neutros (Laranjo et al., 2001). Em solos da Índia, com diferentes valores de pH, foi constatada grande diversidade de estirpes de *Bradyrhizobium* de feijão mungo e de caupi (Saleena et al., 2001). Comparativamente aos solos ácidos a diversidade é menor em solos salinos. Locais de alta salinidade constituem exemplos de um ambiente extremo, onde relativamente pequena diversidade de espécies microbianas pode ser encontrada.

A presença de metais pesados no solo é descrita como um dos fatores responsáveis pela variação na diversidade de rizóbios. Alterações radicais são constatadas na população de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, em solos sem longo histórico de cultivo do trevo, contaminados por metais pesados em decorrência da aplicação de lodo de esgoto. Em solos onde essa leguminosa é cultivada com frequência, porém, a presença de metais pesados pode não influenciar a diversidade de rizóbios em consequência da adaptação das bactérias àqueles elementos.

Historicamente, a diversidade de rizóbios tem sido avaliada com bactérias isoladas de nódulos; recentes estudos indicam, porém, que existe uma diversidade maior de rizóbios no solo do que se pressupunha anteriormente. Os rizóbios estão sendo encontrados como endofíticos ou rizobactérias de plantas não-leguminosas e muitos deles têm mostrado efeitos benéficos sobre o crescimento das plantas. A contribuição desses rizóbios para a fixação biológica do nitrogênio é ainda obscura e mais pesquisas são necessárias para elucidar sua diversidade e mecanismos de interação com as plantas. A tabela 6 apresenta, de forma resumida, alguns trabalhos realizados nos últimos anos sobre a diversidade de rizóbios em leguminosas.

Referências

- ACOSTA-DURÁN, C.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v.178, p. 161-164, 2002.
- AGUILAR, O.M.; LÓPEZ, M.V.; RICCILLO, P.M. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 181-188, 2001.
- AMARGER, N., MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 996-1006, 1997.
- ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pH. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p.4016-4021, 1995.

BA, S.; WILLEMS, A.; de LAJUDIE, P.; ROCHE, P.; JEDER, H.; QUATRINI, P.; NEYRA, M.; PROMÉ, J.C.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; LORQUIN, J. Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. **Systematic and Applied Microbiology**, v.25, p. 130-146, 2002.

BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K.E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, v.12, p. 917-930, 2003.

BALLARD, R.A.; CHARMAN, N.; MCINNES, A.; DAVIDSON, J.A. Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of field pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) populations in South Australian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1347-1355, 2004.

BARRERA, L.L.; TRUJILLO, M.E.; GOODFELLOW, M.; GARCÍA, F.J.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; DÁVILA, G.; van BERKUM, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Biodiversity of Bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 1086-1091, 1997.

BEIJERINCK, M.W. Die Bacterien der Papilionaceen-knöllchen. **Botanische Zeitung**, v.46, p. 797-804, 1888.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (ED. GARRITY, GEORGE, M.), Springer-Verlag, New York, 2001.

van BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, T.A.; EARDLY, B.D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbiosis with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.13-22, 1998.

BEYENE, D.; KASSA, S.; AMPY, F.; ASSEFFA, A.; GEBREMEDHIN, T.; van BERKUM, P. Ethiopian soils harbor natural populations of rhizobia that form symbioses with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Archives of Microbiology**, v.181, p. 129-136, 2004.

BROCKMAN, F.J.; BEZDICEK, D.F. Diversity within serogroups of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in the Palouse region of eastern Washington as indicated by plasmid profiles, intrinsic antibiotic resistance and topography. **Applied Environmental Microbiology**, v. 55, p.109-115, 1989

BROMFIELD, E.S.P.; THURMAN, N.P.; WHITWILL S.T.; BARRAN, L.R. Plasmids and symbiotic effectiveness of representative phage types from indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. **Journal. General Microbiology**, v.133, p.3457-3466, 1987.

BROMFIELD, E.S.P.; BEHARA, A.M.P.; SINGH, R.S.; BARRAN, L.R. Genetic variation in local populations of *Sinorhizobium meliloti*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p. 1707-1716, 1998.

CADAHIA, E.; LEYVA, A.; RUIZ-ARGUESO, T. Indigenous plasmids and cultural characteristics of rhizobia nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) **Archive of Microbiology**, v.146, p. 239-244, 1986.

CAMACHO, M.; SANTAMARÍA, C.; TEMPRANO, F.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N.; DAZA, A.; ESPUNY, R.; BELLOGÍN, R.; OLLERO, F.J.; LYRA DE, M.C.C.P.; BUENDÍA-CLAVERÍA, A.; ZHOU, J.; LI, F.D.; MATEOS, C.; VELÁZQUEZ, E.; VINARDELL, J.M.; RUIZ-SAINZ, J.E. Soils of the Chinese Hubei Province show a very high diversity of *Sinorhizobium fredii* strains. **Systematic of Applied Microbiology**, v.25, p 592-602, 2002.

CHEN, M.; XIE, B.; HUANG, C.; XIE, F.; YANG, J.; ZHOU, Q.; ZHOU, J. Study on genetic diversity and phylogeny of soybean rhizobia in China. **Symbiosis**, v. 38, p. 123-144, 2005.

CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.392-397, 1988

CHEN, W.X.; LI, G.H.; QI, Y.L. WANG, E.T.; YUAN, H.L.; LI, J.L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.275-280,1991.

CHEN, W.; WANG, E.; WANG, S.; LI, Y.; CHEN, X.; LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, 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**, v.47, p. 870-873, 1997.

CHEN, W.; LEE, T. Genetic and phenotypic diversity of rhizobial isolates from sugarcane-*Sesbania cannabina*-rotation fields. **Biology and Fertility of Soils**, v.34, p.14-20, 2001.

CHEN, L.S.; FIGUEIREDO, A.; VILLANI, H.; MICHAJLUK, J.; HUNGRIA, M. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 448-457, 2002.

COUTINHO, H.L.C.; VALÉRIA, M.O.; ANDREA, L.; MAIA, A.H.N.; GILSON, P.M. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, v.13, p. 159-167, 1999.

DEMEZAS, D.H.; BEARDON, T.B.; STRAIN, S.R. WATSON, J.M. ; GIBSON, A.H. Diversity and genetic structure of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* isolated from *Trifolium subterraneum* L. **Molecular Ecology**, v.4, p.209-220, 1995.

DIOUF, A.; de LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; KERSTERS, K.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; GUEYE, M. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.50, p.159-170, 2000.

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.

EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M.D.; MAINA, M.L.; GOLDMAN, B.J.; SINCLAIR, M.J.; AYANABA, A. Physiological and biochemical aspects of diversity of *Bradyrhizobium* sp (*Vigna*) from three West African soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.575-581, 1987.

FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v.7, p. 332-346, 1889.

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; McCOY, E. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison, WI: University of Wisconsin, 1932.

FRIONI, L.; RODRÍGUEZ, A.; MEERHOFF, M. Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, v.16, p. 275-282, 2001.

GAO, J.L.; TEREFWORK, Z.; CHEN, W.; LINDSTRÖM, K. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. **Journal of Biotechnology**, v.91, p. 155-168, 2001.

GAO, J.; TURNER, S.L.; KAN, F.L.; WANG, E.T.; TAN, Z.Y.; QIU, Y.H.; GU, J.; TEREFWORK, Z.; YOUNG, J.P.W.; LINDSTRÖM, K.; CHEN, W.X. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, 2003-2012, 2004.

GENIAUX, E.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ, E. Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p. 392-394, 1995.

GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERREY, M.L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B.E.; MARTÍNEZ, E.; AARONS, S.R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 198-207, 1994.

GRAHAM, P.H. Biological dinitrogen fixation:symbiotic In SYLVIA, D.H.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. (eds) **Principles and application of soil microbiology**, Prentice Hall, Inc., New Jersey, p. 322-345, 1998.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p. 1389-1398, 2004.

HANDLEY, B.A.; HEDGES, A.J.; BERINGER, J. E. Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.241-249, 1998.

HAUKKA, K.; LINDSTRÖM, K.; YOUNG, J.P. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.419-426, 1998.

HELLRIEGEL, H., WILFARTH, H. Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. **Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins Rübenzucker-industrie deutschen Reiches**, p. 1- 234, 1888.

HENNECKE, H.; KALUZA, K.; THÖNYL, B.; FUHRMANN, M.; LUDWIG, W.; STACKEBRANDT, E. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen-fixing bacteria. **Archive of Microbiology**, v.142, p.342-348, 1985.

HERRERA-CERVERA, J.A.; CABALLERO-MELLADO, J.; LAGUERRE, G.; TICHY, H.V.; REQUENA, N.; AMARGER, N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; OLIVARES, J.; SANJUAN, J. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, p. 87-97, 1999.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.M.O.; ANDRADE, D. de S. The Brazilian experience with the soybean (*Glycine max*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbioses. In PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. (Eds). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 515, 2000.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M. DE O.; COCA, R.G.; MEGÍAS, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p. 1349-1361, 2001.

IRISARRI, P.; MILNITSKY F.; MONZA, J.; BEDMAR, E.J. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. **Plant Soil**, v.180, p.39-47, 1996.

JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; DONATE-CORREA, J.; RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; HERNÁNDEZ, M.; TEMPRANO, F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; RUIZ-ARGÜESO, T.; LEÓN-BARRIOS, M. Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p. 611-623, 2003.

JARVIS, B.D.W.; GILLIS, M.; DELEY, J. Intra- and inter-generic similarities between the ribosomal ribonucleic acid cistron of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species and some related bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.129-138, 1986.

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**, v.42, p. 93-96, 1992.

JARVIS, B.D.W.; SIVAKUMARAN, S.; TIGHE, S. W.; GILLIS, M. Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. **Plant Soil**, v.184, p. 143-158, 1996.

JARVIS, B.D.W.; van BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to a new genus: *Mesorhizobium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 895-898, 1997.

JEBARA, M.; MHAMDI, R.; AOUANI, M.E.; GHRIR, R.; MARS, M. Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p. 139-147, 2001.

JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum*, Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.136-139, 1982.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p.501-505, 1992.

LAGUERRE, G.; GENIAUX, E.; MAZURIER, S.I.; RODRÍGUEZ-CASARTELLI, R.; AMARGER, N. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 412-419, 1993.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied Environmental Microbiology**, 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 fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2019-2036, 1996.

LAGUERRE, G.; van BERKUM, P.; AMARGER, N.; PRÉVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p. 4748-4758, 1997.

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, 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* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.715-733, 1994

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; LINDSTRÖM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.369-382, 1998a.

DE LAJUDIE, P.; LAURENT-FUTELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, 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**, v.48, p.1277-1290, 1998b.

LARANJO, M.; RODRIGUES, R.; ALHO L.; OLIVEIRA, S. Rhizobia of chickpea from southern Portugal: symbiotic efficiency and genetic diversity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 662-667, 2001.

LINDSTRÖM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.39, p.365-367, 1989.

LIU, J.; WANG, E.T.; CHEN, W.X. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p. 465-477, 2005.

LÖHNIS, F.; HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **Journal of Agricultural Research**, v. 20, p.543-556, 1921.

de MAAGD, R.; van ROSSUM, C.; LUGTENBERG, B.J.J. Recognition of individual strains of fast-growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.3782-3785, 1988.

MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the North-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.1005-1010, 1997.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.417-426, 1991.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. **Critical Review of Plant Science**, v. 15, p. 113-140, 1996.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, p. 11-23, 2003.

MARTYNIUK, S.; ORÓN, J.; MARTYNIUK, M. Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in Polish soils. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v.74, p. 83-86, 2005.

MHAMDI, R.; JEBARA, M.; AOUANI, M.E.; GHRIR, R.; MARS, M. Genotypic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.313-320, 1999.

MOAWAD, H.; BADR EL-DIN, S.M.S.; ABDEL-AZIZ, R.A. Improvement of biological nitrogen fixation in Egyptian winter legumes through better management of *Rhizobium*. **Plant and Soil**, v.204, p.95-106, 1998.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L. DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crop Research**, v.73, p. 121-132, 2002.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta - subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 948-950, 2001.

MPEPEREKI, S.; MAKONESE, F.; WOLLUM, A.G. Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. **Symbiosis**, v.22, p.275-292, 1997.

MUTCH, L.A.; TAMIMI, S.M.; YOUNG, J.P.W. Genotypic characterisation of rhizobia nodulating *Vicia faba* from the soils of Jordan: a comparison with UK isolates. **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p. 709-714, 2003.

NICK, G.; RÄSÄNEN, L.A. DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; LINDSTRÖM, K. Genomic screening of rhizobia isolated from the root nodules of tropical leguminous trees using DNA-DNA dot-blot hybridization and rep-PCR. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, p. 287-299, 1999.

NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p. 511-522, 1994.

NOUR, S.M.; CLEYET-MAREL, J.C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M.P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.640-648, 1995.

ODEE, D.; HAUKKA, W.K.; MCINROY, S.G.; SPRENT, J.I.; SUTHERLAND, J.M.; YOUNG, J.P.W. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p. 801-811, 2002.

OGASAWARA, M.; SUZUKI, T.; MUTHOH, I.; ANNAPURNA, K.; ARORA, N.K.; NISHIMURA, Y.; MAHESWARI, D.K. *Sinorhizobium indiaense* sp. nov. and *Sinorhizobium abri* sp. nov. isolated from tropical legumes *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. **Symbiosis**, v.34, p. 53-68, 2003

OLSEN, P.; WRIGHT, S.; COLLINS, M. ; RICE, W. Patterns of reactivity between a panel of monoclonal antibodies and forage *Rhizobium* strains. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 60, p.654-661, 1994.

PARKER, M.A.; LUNK, A. Relationships of bradyrhizobia from *Platypodium* and *Machaerium* (Papilionoideae: tribe Dalbergieae) on Barro Colorado island, Panama. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1179-1186, 2000.

PINTO, P.P.; RAPOSEIRAS, R.; MACEDO, A. M.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; SÁ, N.M.H. Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating *Rhizobium* strains. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 295-300, 1998.

PRÉVOST, D.; BROMFIELD, E.S.P. Diversity of symbiotic rhizobia resident in Canadian soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 83, p. 311-319, 2003.

PRIEFER, U.B.; AURAG, J.; BOESTEN, B.; BOUHMOUCH, I.; DEFEZ, R.; FILALIMALTOUF, A.; MIKLIS, M.; MOAWAD, H.; MOUHSINE, B.; PRELL, J.; SCHLÜTER A.; SENATORE, B. Characterisation of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 223-236, 2001.

RADEVA, G.; JURGENS, G.; NIEMI, M.; NICK, G.; SUOMINEN, L.; LINDSTRÖM, K. Description of two biovars in the *Rhizobium galegae* species : biovar *orientalis* and biovar *officinalis*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 192-205, 2001

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PALOMO, J.L.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1271-1275, 2004.

RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; BUENDIA, A. M.; CAMACHO, M.; LUCAS, M.M.; SANTAMARIA, C. Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South-West Spain. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p. 1601-1613, 2000.

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**, v.46, p.972-980, 1996.

DE SÁ, N.M.H.; KATTAH, L.S.; SELDIN, L.; VASCONCELOS, M.J.V.; PAIVA, E. Genomic heterogeneity within bean nodulating *Rhizobium* strains isolated from cerrado soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5/6, p.1011-1014, 1997.

SALDAÑA, G.; MARTINEZ-ALCÁNTARA, V.; VINARDELL, J.M.; BELLOGÍN, R.; RUÍZ-SAINZ, J.E.; BALATTI, P.A. Genetic diversity of fast-growing rhizobia that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr). **Archives of Microbiology**, v. 180, p. 45-52, 2003.

SALEENA, L.M.; LOGANATHAN, P; RANGARAJAN, S.N. Genetic diversity and relationship between *Bradyrhizobium* strains isolated from blackgram and cowpea. **Biology and Fertility of Soils**, v.34, p.276-281, 2001.

- SAMBA, R.T.; de LAJUDIE, P.; GILLS, M.; NEYRA, M.; BARRETO, M.M.S.; DREYFUS, B. Diversity of rhizobia nodulating *Crotalaria* spp. from Senegal. **Symbiosis**, v.27, p.259-268, 1999.
- SANTAMARIA, M.; CORZO, J.; LEON-BARRIOS, M.; GUTIERREZ-NAVARRO, A.M. Characterization and differentiation of indigenous rhizobia isolated from Canarian shrub legumes of agricultural and ecological interest. **Plant and Soil**, v.190, p.143-152, 1997.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p.374-377, 1993.
- SEGUIN, P.; GRAHAM, P.H.; SHEAFFER, C.C.; EHLKE, N.J.; RUSSELLE, M.P. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Trifolium ambiguum* in North America. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p. 81-85, 2001.
- SESSITSCH, A.; RAMÍREZ-SAAD, H.; HARDARSON, G.; AKKERMANS, A.D.L.; VOS, W.M. Classification of Austrian rhizobia and the Mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium gallicum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p. 1097-1101, 1997.
- SHAMSELDIN, A.A.;Y.; VINUESA, P.; THIERFELDER, H.; WERNER, D. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate *Phaseolus vulgaris* in Egyptian soils and display cultivar-dependent symbiotic efficiency. **Symbiosis**, v. 38, p. 145-161, 2005.
- SHARMA, R.S.; MOHMMED, A.; MISHRA, V.; BABU, C.R. Diversity in a promiscuous group of rhizobia from three *Sesbania* spp. colonizing ecologically distinct habitats of the semi-arid Delhi region. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 57-67, 2005.
- SINCLAIR, M.J.; EAGLESHAM, A.R.J. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of West African cowpea rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, v.16, p.247-251, 1984.
- SPRENT, J.I. Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p. 401-405, 1995.
- SQUARTINI, A.; STRUFFI, P.; DÖRING, H.; SELENSKA-POBELL, S.; TOLA, E.; GIACOMINI, A.; VENDRAMIN, E.; VELÁZQUEZ, E.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; DAZZO, F.B.; CASELLA, S.; NUTI, M.P. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formely '*Rhizobium hedysarum*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1267-1276, 2002.
- STANLEY, J.; CERVANTES, E. Biology and genetics of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR234. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, p.9-19, 1991.
- SWELIM, D.M.; HASHEM, F.M.; KUYKENDALL, L.D.; HEGAZI, N.I.; ABDEL-WAHAB, S.M. Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, p. 224-232, 1997.
- TAMIMI, S.M.; YOUNG, J.P.W. *Rhizobium etli* is the dominant common bean nodulating rhizobia in cultivated soils from different locations in Jordan. **Applied Soil Ecology**, v. 26, p. 193-200, 2004.

TAN, Z.Y.; KAN, F.L.; PENG, G.X.; WANG, E.T.; REINHOLD-HUREK, B.; CHEN, W.X. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 909-914, 2001.

TJAHJOLEKSONO, A. Caractérisation et diversité des souches de *Rhizobium* nodulant le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) en trois sites tropicaux. PhD thesis. University of Lyon, Villeurbanne, 1993.

TOLEDO, I.; LLORET, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 54-64, 2003.

ULRICH, A.; ZASPEL, I. Phylogenetic diversity of rhizobial strains nodulating *Robinia pseudoacacia* L. **Microbiology**, v. 146, p. 2997-3005, 2000.

VELÁZQUEZ, E.; IGUAL, J.M.; WILLEMS, A.; FERNÁNDEZ, M.P.; UM^NOZ, E.; MATEOS, P.F.; ABRIL, A.; TORO, N.; NORAMND, P.; CERVANTES, E.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1011-1021, 2001.

VINUESA, P.; LEÓN-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., na acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae:Genisteae) from the Canary islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 569-575, 2005.

XU, L.M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J. FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.706-711, 1995.

WANG, E.T.; van BERKUM, P.; BEYENE, D.; SUI, X.H.; DORADO, O.; CHEN, W.X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.687-699, 1998.

WANG, E.T.; ROGEL, M.A.; SANTOS, G. LOS; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; CEVALLOS, M.A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1479-1491, 1999a.

WANG, E.T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in mexican soils. **Molecular Ecology**, v.8, p.711-724, 1999b.

WANG, E.T.; TAN, Z.Y.; WILLEMS, A.; FERNANDEZ-LÓPEZ, M.; REINHOLD-HUREK, B.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1687-1693, 2002a.

WANG, E.T.; ROGEL, M.A.; SUI, X.H.; CHEN, W.X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; van BERKUM, P. *Mesorhizobium amorphae*, a rhizobial species that nodulates *Amorpha fruticosa*, is native to American soils. **Archive of Microbiology**, v. 178, p. 301-305, 2002b.

WANG, E.T.; KAN, F.L.; TAN, Z.Y.; TOLEDO, I.; CHEN, W.X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diverse *Mesorhizobium plurifarum* populations native to Mexican soils. **Archives of Microbiology**, v. 180, p. 444-454, 2003.

WDOWIAK, S.; MALEK, W. numerical analysis of *Astragalus cicer* microsymbionts. **Current Microbiology**, v.41, p. 142-148, 2000.

WEI, G.H.; WANG, E.T.; TAN, Z.Y.; ZHU, M.E.; CHEN, W.X. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2231-2239, 2002.

WEI, G.H.; TAN, Z.Y.; ZHU, M.E.; WANG, E.T.; HAN, S.Z.; CHEN, W.X. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p. 1575-1583, 2003.

WOLDE-MESKEL, E.; TEREFWORK, Z.; LINDSTRÖM, K.; FROSTEGARD, A. Metabolic and genomic diversity of rhizobia isolated from field standing native and exotic woody legumes in Southern Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p. 603-611, 2004.

WOLDE-MESKEL, E.; TEREFWORK, Z.; FROSTEGARD, A.; LINDSTRÖM, K. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p. 1439-1452, 2005.

YAO, Z.Y.; KAN, F.L.; WANG, E.T.; WEI, G.H.; CHEN, W.X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p. 2219-2230, 2002.

YANG, J. K.; XIE, F.L.; ZOU, Q.; ZHOU, J.C. Polyphasic characteristics of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in China. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p. 141-153, 2005.

YOKOYAMA, T.; ANDO, S.; MURAKAMI, T.; IMAI, H. Genetic variability of the common nod gene in soybean bradyrhizobia isolated in Thailand and Japan. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p. 1209-1218, 1996.

YOU, Z.; MARUTANI, M.; BORTHAKUR, D. Diversity among *Bradyrhizobium* isolates nodulating yardlong bean and sunnhemp in Guam. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p. 577-584, 2002.

YOUNG, J.P.W.; WEXLER, W. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.134, p.2731-2739, 1988.

YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, v.133, p.87-94, 1996.

YOUNG, J.M.; KUYKENDALL, L.D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 89-103, 2001.

ZOU, X.H.; LI, F.D.; CHEN, H.K. Characteristics of plasmids in *Rhizobium huakuii*. **Current Microbiology**, v. 35, p. 215-220, 1997.

ZURDO-PIÑEIRO, J.L.; VELÁZQUEZ, E.; LORITE, M.J.; BRELLES-MARIÑO, G.; SCHRÖDER, E.C.; BEDMAR, E.J.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. **Systematic Applied Microbiology**, v. 27, p. 469-477, 2004.