

Caracterização da região espaçadora 16-23S rDNA para diferenciação de estirpes de rizóbios utilizadas na produção de inoculantes comerciais no Brasil

Characterization of the spacer region 16-23S rDNA for differentiation of strains of rhizobia used in the production of commercial inoculants in Brazil

Andréia Mara Rotta Oliveira^{1*} Eliane Villamil Bangel¹ Mariangela Hungria¹
José Ricardo Pfeifer Silveira¹ Luciano Kayser Vargas¹ Bruno Brito Lisboa¹

RESUMO

A identificação de estirpes de rizóbio tem sido feita pela especificidade por hospedeiros e ensaios microbiológicos tradicionais. Por constituírem um grupo filogeneticamente heterogêneo, diferentes técnicas moleculares têm sido empregadas para auxiliar na caracterização genética e na identificação de estirpes eficientes e competitivas para a produção de inoculantes. Este trabalho teve por objetivos caracterizar a região espaçadora 16S-23S rDNA das estirpes de rizóbios utilizadas nos inoculantes comercializados no Brasil para espécies leguminosas, utilizando a técnica da PCR em combinação com a de RFLP, e avaliar a possibilidade do uso desse marcador molecular como método auxiliar para identificação das estirpes. A amplificação da região espaçadora 16-23 S rDNA das estirpes de rizóbios gerou fragmentos com tamanhos que variaram entre 700pb e 1350pb. Os produtos resultantes da amplificação foram submetidos à digestão com as endonucleases. Mps I, Dde I e Hae III. Os resultados obtidos neste estudo indicam a possibilidade do uso da técnica de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S rDNA como marcador molecular para a diferenciar as estirpes de rizóbios, em complemento às técnicas microbiológicas tradicionais. Contudo, este marcador não é suficientemente discriminatório para ser usado na identificação das estirpes recomendadas para a produção de inoculantes comerciais.

Palavras-chave: qualidade de inoculantes, PCR-RFLP, marcadores moleculares.

ABSTRACT

The identification of strains of rhizobia has been made by host specificity and regular microbiological tests. By forming a phylogenetically heterogeneous group, different molecular techniques have been employed to assist in the

genetic characterization and identification of efficient and competitive strains for production of inoculants. This study aimed to characterize the spacer region 16S-23S rDNA of the strains of rhizobia used in commercial inoculants in Brazil for legume species, using PCR combined with RFLP, and assess the possibility of using this molecular marker as an auxiliary method for identification of strains. The amplification of the 16-23 S rDNA spacer region of rhizobium strains generated fragments with sizes ranging between 700 and 1350bp. Products from the amplification were subjected to digestion with Mps I, Dde I and Hae III endonucleases. The results indicated the possibility of using the technique of PCR-RFLP of 16S-23S spacer region rDNA as molecular marker to differentiate most strains tested and recommended for production of inoculants, in addition to the traditional microbiological techniques. However, this marker is not sufficiently discriminatory to be used in the identification of the strains recommended for the production of commercial inoculants.

Key words: quality of inoculants, PCR-RFLP, molecular markers.

INTRODUÇÃO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo importante na agricultura brasileira, que tem uma tradição de décadas no uso de inoculantes a base de rizóbios, sendo que, em termos agrícolas, a maior contribuição ocorre pela associação simbiótica com leguminosas (HUNGRIA, 2011). Além dos benefícios econômicos com a redução nos custos de produção, a redução nas aplicações de fertilizantes leva

¹Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), 90130-060, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: andreiafrito@yahoo.com.br.

*Autor para correspondência.

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa da Soja (EMBRAPA-CNPSo), Londrina, PR, Brasil.

a uma melhoria da qualidade ambiental - com menor aporte de nitratos para as águas superficiais e subterrâneas - e à sustentabilidade dos agroecossistemas.

Embora o exemplo mais bem sucedido da aplicação dessa tecnologia seja a cultura da soja (*Glycine max*), com mais de 95% do mercado de inoculantes destinados a esta cultura (HUNGRIA, 2011), estirpes de rizóbio de diferentes gêneros têm sido selecionadas para mais de 90 espécies de leguminosas e incluem o feijão, a lentilha e o amendoim; leguminosas utilizadas para a adubação verde, forrageiras e espécies arbóreas (HUNGRIA, 2007). Além da associação com leguminosas, outras espécies de rizóbios tanto de vida livre (eg. *Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia fluminensis*, *Azotobacter paspali*, *Derxia* spp., *Paenebacillus azotofixans*) como associativos (*Azospirillum* spp. e *Burkholderia* spp.) e endofíticos (*Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp.), têm sido descobertas com capacidade de fixar nitrogênio em gramíneas (HUNGRIA, 2011).

A legislação brasileira prevê que somente podem ser comercializados aqueles inoculantes produzidos com as estirpes recomendadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (MAPA). A Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), através da Coleção de Culturas de Rizóbios SEMIA, fornece às indústrias brasileiras produtoras de inoculantes as estirpes autorizadas. Dessa forma, é imprescindível que esse material genético seja constantemente monitorado, para garantir a qualidade das cepas fornecidas. Além disso, a FEPAGRO presta serviços de análise da qualidade de inoculantes produzidos no Brasil e aqueles vindos de outros países, principalmente do Uruguai e da Argentina, que são comercializados no país, avaliando o número de células viáveis e a determinação da presença da estirpe recomendada no produto.

Atualmente, existem seis gêneros de rizóbios: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium* e *Azorhizobium* classificados através da análise do gene 16 S rDNA (GARRITY et al., 2007) e o relato de uma única espécie de *Methylobacterium* (da família Methylobacteriaceae), *Methylobacterium nodulans*, que faz simbiose com espécies de *Crotalaria* (SY et al., 2001).

A identificação e a caracterização de estirpes de rizóbio têm sido feitas, tradicionalmente, baseadas nos resultados de especificidade por hospedeiros, análises em meios de cultura da morfologia de colônias, fisiologia do crescimento e reação de pH (ácido/alcalino), resistência intrínseca a antibióticos,

características bioquímicas, suscetibilidade a bacteriófagos e reações sorológicas (PITARD, 2000).

Marcadores moleculares de diferentes classes, como aqueles baseados na PCR (reação em cadeia da polimerase) como o RAPD (random amplification of polymorphic DNA) (BANGEL 2000,), rep-PCR (repetitive extragenic palindromic-PCR) (GRANGE, 2004; STOCCO, et al., 2008), AFLP (amplified fragment length polymorphism) (GIONGO et al., 2008), entre outras, têm contribuído para a determinação da variabilidade de rizóbios, tanto entre estirpes de uma mesma espécie, quanto de estirpes de diferentes espécies.

A filogenia de estirpes de rizóbios recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil para 33 espécies leguminosas foi determinada através do sequenciamento da região do gene que codifica o 16 S rRNA (MENNA, et al., 2006; BINDE et al., 2009). Os estudos revelaram a existência de cinco, dos seis gêneros de rizóbios já descritos na literatura (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium*), uma estirpe pertencente ao gênero *Methylobacterium*, duas do gênero *Burkholderia* e uma do gênero *Pseudomonas*, demonstrando a grande diversidade existente entre as estirpes de elite.

O custo elevado da técnica de sequenciamento dificulta o uso em análises de rotina para a certificação de estirpes, necessária para o controle de qualidade de inoculantes comercializados no Brasil. Dessa forma, outros métodos que apresentam correlação com os dados do sequenciamento do 16S rRNA estão sendo avaliados para auxiliarem na identificação das estirpes, em complemento às técnicas microbiológicas tradicionalmente utilizadas. Entre esses métodos, a técnica de PCR em combinação com a de RFLP tem sido utilizada para a análise do 16S rRNA e 23S rRNA (ARDRA-Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) e da região espaçadora (ITS - internal transcribed spacer) entre estes genes (STRALIOTTO, et al., 2005; GIONGO et al., 2007).

Dados de sequências da região espaçadora entre os genes 16S-23S rDNA têm se acumulado nos últimos anos, e o alinhamento de sequências disponíveis em bancos de dados mostra que pode ocorrer variação considerável intra e infra-específica, tanto no tamanho como na sequência de bases (LAGUERRE, et al., 1996; CHUEIRE, et al., 2003; GERMANO, et al., 2006), evidenciando que esta região pode ser útil na diferenciação de estirpes de rizóbios recomendadas para produção de inoculantes.

Considerando a necessidade do uso de métodos mais precisos que auxiliem no controle da qualidade de inoculantes, este trabalho teve por

objetivos caracterizar a região espaçadora 16S-23S rDNA das estirpes de rizóbios utilizadas nos inoculantes comercializados no Brasil para espécies leguminosas, utilizando a técnica da PCR em combinação com a de RFLP, e avaliar a possibilidade do uso desse marcador molecular como método auxiliar para identificação das estirpes.

MATERIAL E MÉTODOS

Estirpes de Rizóbio

Fizeram parte deste estudo 41 estirpes da coleção de culturas SEMIA (Seção de Microbiologia Agrícola) da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Porto Alegre, RS), das quais 36 são recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a produção de inoculantes comercializados no Brasil, duas de *Burkholderia* sp. e uma de *Pseudomonas* sp. Além dessas, 20 estirpes de rizóbios da Coleção de Culturas USDA - ARS (*United States Department of Agriculture - Agriculture Research Service, Beltsville, MD*), foram usadas como referência.

Extração de DNA

As estirpes foram crescidas em meio líquido composto de extrato de levedura e manitol (LM) (VINCENT, 1970). Posteriormente, efetuou-se a extração e purificação do DNA total das culturas bacterianas, conforme descrito por BOUCHER et al. (1987).

Amplificação do 16-23S rDNA e análise dos fragmentos de restrição

O DNA genômico foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores FGPS 5' - TGCGGCTGGATCACCTCCT-3' e FGPS 132 5' - CCGGGTTTCCCCATTCGG-3' (LAGUERRE et al., 1996). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo: 30 ng de DNA, 0,1 mM dNTPs (Amersham Pharmacia), 1,5 mM MgCl₂, 1,0 µM de cada oligonucleotídeo iniciador tampão de reação (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl), 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram desenvolvidas em um termociclador (Uvitech) com a seguinte programação: uma etapa de 3 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 2 min a 72°C; uma etapa final de 5 min a 72°C.

Do produto gerado da amplificação por PCR, 5 µL⁻¹ foram digeridos individualmente com as enzimas de restrição *Mps* I, *Dde* I e *Hae* III (Invitrogen), previamente selecionadas neste trabalho, por gerarem maior número de fragmentos discriminatórios para os gêneros de rizóbios analisados. O perfil de restrição foi

analisado por eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo e documentados através do sistema de foto-documentação computadorizada EDAS 120 (Kodak).

Análise de Agrupamento

O padrão de bandas dos isolados foi convertido em uma matriz binária e os resultados analisados por meio do programa NTSYS-pc v.1.7 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*). A matriz de similaridade foi estimada utilizando o coeficiente de Jaccard e construídos os agrupamentos de acordo com o método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method, arithmetic averages*) (CRISCI & ARMENGOL, 1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação da região espaçadora 16-23 S rDNA das estirpes de rizóbios gerou fragmentos com tamanhos que variaram entre 700 pb e 1350 pb. Os produtos resultantes da amplificação foram submetidos à digestão com as endonucleases. Cada uma das enzimas utilizadas gerou de dois a seis fragmentos e a maioria das estirpes analisadas apresentou polimorfismos nessa região. Apresentaram perfis de restrição idênticos entre si as estirpes SEMIAs 134 e 116; 2050 e 2002; 6390 e 6384; 6439 e 6175; 6319 e 6144; USDAs 3383 e 4779 com a endonuclease *Mps* I; SEMIAs 222 e 235; 6162 e 6395; 6164 e 6099; USDAs 3383 e 4779; 9032 e 1844, com *Dde* I e SEMIAs 6415 e 6159; 6390 e 6403; 6162 e 6395; USDAs 4779 e 3592; 9032 e 3588; 3622 e 76, com *Hae* III. Perfil de RFLP idênticos entre estirpes de rizóbios estreitamente relacionadas tem sido documentado com o uso de até duas enzimas de restrição, devido à presença de domínios altamente conservados nas sequências dos genes que codificam as regiões 16S rDNA (EARDLY, et al., 2005; RASHID et al., 2009). Pela análise do perfil de restrição individual com cada enzima de restrição, existe um indicativo de que o maior poder discriminatório poderia ser atribuído à *Dde* I. Contudo, conforme também salientado em outros estudos (GERMANO et al., 2006), o posicionamento taxonômico correto só é possível com a análise de várias enzimas de restrição. Recomenda-se, portanto, o uso de mais de uma endonuclease de restrição para a caracterização das estirpes de rizóbios.

O índice de similaridade genética determinado pelo coeficiente de Jaccard ficou entre 0 e 0,45%, indicando uma grande variabilidade genética entre os isolados. A análise de agrupamento, realizada a partir do resultado gerado com as três enzimas de

restrição, apresentou a formação de cinco grandes grupos, com índices de similaridade menores ou iguais a 0,05% e 40 subgrupos com índices de similaridades entre 0,08% e 0,45%, formados por diferentes gêneros de rizóbios (Figura 1). A variabilidade genética elevada entre as estirpes de rizóbios, resultando em diversos agrupamentos, com baixa similaridade entre os grupos, também foi observada por GERMANO et al. (2003) em estudo para a caracterização da diversidade de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos de leguminosas tropicais, através de uma abordagem polifásica, pela análise conjunta de três regiões ribossomais. Os autores constataram variabilidade genética elevada entre as estirpes analisadas, em todas as regiões ribossomais avaliadas, resultando em diversos agrupamentos, com baixa similaridade entre os grupos. Os dendrogramas obtidos para as regiões dos genes 16S rRNA, 23S rRNA e IGS resultaram em agrupamentos com níveis finais de similaridade extremamente baixos, 28%, 16% e 27%, respectivamente.

A estirpe SEMIA 6412 do gênero *Burkholderia* sp foi a estirpe que apresentou a menor similaridade genética com as estirpes analisadas, formando um grupo isolado, distante da estirpe SEMIA 6390, classificada como *Burkholderia cepacia*. Os resultados da caracterização da região espaçadora do 16-23S rDNA por PCR-RFLP, encontrados nesse estudo, se assemelham aos já obtidos por outros autores que utilizaram este marcador molecular com o propósito de detectar heterogeneidade entre e dentro de espécies, possibilitando a caracterização e identificação de bactérias estreitamente relacionadas (LAGUERRE, et al., 1996; CHUEIRE, et al., 2003). A grande dissimilaridade da estirpe SEMIA 6412 em relação às demais se deve ao fato de que, embora essa estirpe tenha sido inicialmente classificada como uma alfa-Proteobacteria, na verdade, ela pertence a um gênero distinto e à beta-Proteobacteria, sendo bastante distinta das demais, o que a posiciona em um agrupamento distante, o que também foi constatado tanto em estudo com RFLP de regiões ribossomais (GERMANO et al., 2006), como na análise do gene 16S rRNA (MENNA et al., 2006).

De acordo com a legislação vigente, os inoculantes comercializados no Brasil devem conter somente a(s) estirpe(s) recomendada(s) pelo MAPA. Os resultados obtidos neste estudo indicam a possibilidade do uso da técnica de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S rDNA como marcador molecular para a diferenciação da maioria das estirpes analisadas

e recomendadas para a produção de inoculantes. As SEMIAs 134 e 116, classificadas como *Sinorhizobium meliloti* e indicadas para a produção de inoculantes comerciais para alfafa, (*Medicago sativa*) e SEMIAs 222 e 235, classificadas como *Rhizobium leguminosarum* e indicadas para a produção de inoculantes comerciais para trevo branco (*Trifolium repens*), apresentaram perfis de restrição idênticos entre si com as enzimas *Mps* I e *Dde* I, respectivamente, porém distintos das demais estirpes analisadas com essas enzimas. A ocorrência de recombinação intragênica localizada e a transferência lateral parcial, ou total, dos operons RNAr têm sido relatada em muitos gêneros de bactérias, incluindo os rizóbios (SHAMSELDIN et al., 2008). A ocorrência de sequências mosaicas, resultantes de transferência ou recombinação gênica entre essas estirpes, pode ser uma explicação para os resultados encontrados. No entanto, essa inferência precisa ser investigada. Para fins de taxonomia e filogenia, são usados os genes ribossomais ou outros genes *housekeeping*, na metodologia MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) (MARTENS, et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008). Contudo, as estirpes podem apresentar comportamento distinto em relação ao hospedeiro, porque os genes responsáveis pela nodulação de fixação do nitrogênio estão, no caso dessas estirpes, localizados em plasmídeos simbióticos. Desse modo, estirpes idênticas no cromossomo podem ter plasmídeos e propriedades simbióticas distintas.

CONCLUSÃO

A variabilidade genética existente na região espaçadora do 16-23S rDNA das estirpes determinada através da técnica da PCR combinada com a de RFLP permite diferenciar a maioria das estirpes de rizóbio, indicando a possibilidade do uso desse marcador molecular para a caracterização das estirpes de rizóbios, em complemento às técnicas microbiológicas tradicionais. Contudo, esse marcador não é suficientemente discriminatório para ser usado na identificação das estirpes recomendadas para a produção de inoculantes comerciais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo apoio financeiro, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa RD concedida à primeira autora.

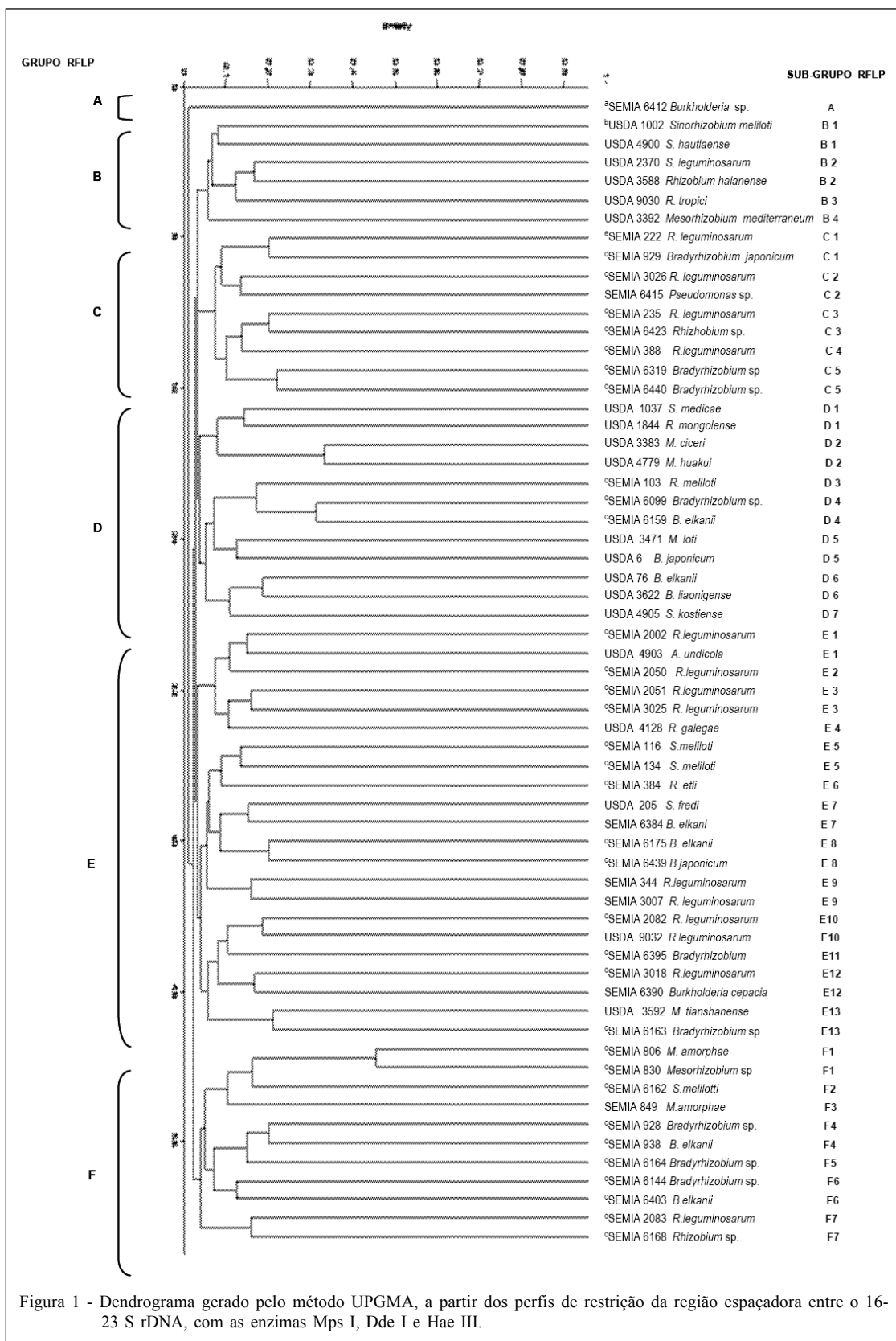


Figura 1 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA, a partir dos perfis de restrição da região espaçadora entre o 16-23 S rDNA, com as enzimas Mps I, Dde I e Hae III.

REFERÊNCIAS

- BANGEL, E.V. **Caracterização de estirpes SEMIA de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. 2000. 115f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.
- BINDE, D.R. et al. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.83 n.5, p.897-908, 2009.
- CHUEIRE, L.M.O. et al. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v.27, p.833-840, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832003000500007&Ing=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 20 fev. 2009. doi: 10.1590/S0100-06832003000500007.
- CRISCI, J.V.; ARMENGOL, M.F.L. **Introduction a la teoria practica de la taxonomia numerica**. Washington: Secretaria General de la Organización de los Estado Americanos, 1983. 131p.
- EARDLY, et al. Rhizobial 16S rRNA and *dnak* genes: mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, n.3, p.1328-1335, 2005. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/71/3/1328.full>>. Acesso em: 16 nov. 2011. doi: 10.1128/AEM.71.3.1328-1335.
- GARRITY, G.M. et al. **Taxonomic outline of bacteria and archaea**: TOBA release 7.7. Michigan: Michigan State University, 2007. Disponível em: <<http://www.taxonomicoutline.org>>. Acesso em: 15 fev. 2012.
- GERMANO, M.G. et al. Abordagem polifásica de análise dos genes ribossômicos de *Bradyrhizobium* para avaliação da biodiversidade. In: LOPES, M.A.; ZAMBALDE, A.L. (Eds.). CONGRESSO BRASILEIRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFORMÁTICA APLICADA À AGROPECUÁRIA E À AGROINDÚSTRIA (SBIAGRO), 4., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Lavras: SBIAGRO, 2003. p.424-427. Disponível em: http://www.sbiagro.org.br/pdf/iv_congresso/art191.pdf. Acesso em: 19 nov. 2011
- GERMANO, M.G. et al. RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of *Bradyrhizobium* strains from thirty-three legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.217-229, 2006.
- GIONGO, A. et al. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. **Applied Soil Ecology**, v.38, p.261-269, 2008. Disponível em: <<https://springerlink3.metapress.com/content/x714120242670441/resource-secured/?target=fulltext.html&sid=d4dahon4y3n5ftaeju0fwmai&sh=www.springerlink.com>>. Acesso em: 10 jan. 2009. doi:10.1016/j.apsoil.2007.10.016.
- GIONGO, A. et al. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p.593-598, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com.w10048.dotlib.com.br/content/x7714120242670441/fulltext.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2009. doi: 10.1007/s00374-006-0128-z.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1389-1398, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TC7-4CBVKP8-1&_user=687304&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000037798&_version=1&_urlVersion=0&_userid=687304&md5=e7d965d585ca5448b62cf4756bf6050>. Acesso em: 20 fev. 2009. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.03.005.
- HUNGRIA, M. Desafios e perspectivas para a fixação biológica do nitrogênio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 31., 2007, Gramado, RS. **Resumos...** Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/cbcs/trabalhos/simposios/simp_013.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2009.
- HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo / Mariângela Hungria**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. (Documentos n.395. Embrapa Soja, ISSN 1516-781X). Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/download/doc325.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2011.
- LAGUERRE, G. et al. 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.2029-2036, 1996. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/62/6/2029?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=laguerre&searchid=1&FIRSTINDEX=0&resourcetype=HWCIT>>. Acesso em: 18 fev. 2009.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Instrução Normativa n.10**, de 21 de março de 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16735>>. Acesso em: 15 fev. 2009.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Instrução Normativa n.13**, de 24 de março de 2011. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/>. Acesso em: 20 nov. 2011.
- MARTENS, M. et al. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.489-503, 2007. Disponível em: <<http://ijs.sgmjournals.org/content/57/3/489.full.pdf+html>>. Acesso em: 20 nov. 2011. doi: 10.1099/ijs.0.64344-0.
- MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?ob=ArticleURL&_udi=B7GVX-4J44044-1&_user=687304&_coverDate=06%2F06%2F2006&_rdoc=8&_fmt=high&_orig=browse&_srch=doc-

info(%23toc%2320442%232006%23999709995%23622326%23FLA%23display%23Volume)&_cdi=20442&_sort=d&_docanchor=&_ct=9&_acct=C000037798&_version=1&_urlVersion=0&_u serid=687304&md5=59a3c794af1d54534d90b38e24f26246>. Acesso em: 20 fev. 2009. doi: 10.1016/j.syapm.2005.12.002.

PITARD, R.M. **Organização e manutenção da coleção de bactérias diazotróficas do CNPAB – I. Dados referentes ao período de janeiro de 1994 a dezembro de 1999.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 13p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 121). Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc121.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2011.

RADISH, et al. Molecular characterization of symbiotic root nodulating rhizobia isolated from lentil (*Lens culinaris Medik.*). **Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry**, v.8, p.602-612, 2009. Disponível em: <http://ejeafche.uvigo.es/component/option,com_docman/task,doc_view/gid,512>. Acesso em: 16 nov. 2011.

STOCCO, P. et al. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.3, p.1107-1120, 2008.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-06832008000300019&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 dez. 2008. doi: 10.1590/S0100-06832008000300019.

SHAMSELDIN, A. Molecular biodiversity and identification of free living *Rhizobium* strains from diverse Egyptian soils as assessed by direct isolation without trap hosts. **American Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v.4, n.5 p.541-549, 2008. Disponível em: <<http://www.idosi.org/aejaes/aejaes4%285%29.htm>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

STRALIOTTO, R. Aplicação e evolução dos métodos moleculares no estudo da biodiversidade do rizóbio. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Org.). **Processos biológicos no sistema solo-planta**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.281-322.

SY, A. et al. Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.214-220, 2001.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).