

Documentos

ISSN 0104-6187

Número, 93

Novembro, 1999



**APLICAÇÃO E EVOLUÇÃO DOS MÉTODOS
MOLECULARES PARA O ESTUDO DA BIODIVERSIDADE
DO RIZÓBIO**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Agrobiologia
Ministério da Agricultura e do Abastecimento**

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Marcus Vinicius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Diretor Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Embrapa Agrobiologia

Chefe Geral

Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo

Vanderlei Pinto

DOCUMENTO Nº 93

ISSN 0104-6187
Novembro 1999

**APLICAÇÃO E EVOLUÇÃO DOS MÉTODOS
MOLECULARES PARA O ESTUDO DA BIODIVERSIDADE
DO RIZÓBIO**

Rosangela Stralotto
Norma Gouvea Rumjanek

Seropédica - RJ
1999

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à:

Embrapa Agrobiologia

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Expediente:

Revisor e/ou ad hoc: Kátia Regina dos Santos Teixeira

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix

Tiragem: 50 exemplares

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto (Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Robert Michael Boddey

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares para o Estudo da Biodiversidade do Rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1999. 58p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 93).

ISSN 0104-6187

1. Biodiversidade. 2. Biologia molecular. 3. DNA. 4. Taxonomia. 5. Fenótipo. 6. Genótipo. 7. Isoenzima. 8. Rhizobium. I. Rumjanek, N.G., colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 333.95

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. A EXTENSÃO DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA.....	5
3. A DIVERSIDADE DO RIZÓBIO.....	7
4. APLICAÇÕES DA BIOLOGIA MOLECULAR NOS ESTUDOS DE DIVERSIDADE E TAXONOMIA DO RIZÓBIO.....	13
4.1. MÉTODOS FENOTÍPICOS.....	17
4.1.1. <i>Métodos fenotípicos clássicos</i>	17
4.1.2. <i>Análise numérica de dados fenotípicos</i>	19
4.1.3. <i>Análise de isoenzimas</i>	20
4.1.4. <i>Pirólise</i>	20
4.1.5. <i>Métodos sorológicos</i>	21
4.1.6. <i>SDS-PAGE</i>	22
4.2. MÉTODOS GENOTÍPICOS.....	22
4.2.1. <i>Determinação da relação de bases do DNA (%G+C)</i>	23
4.2.2. <i>Homologia do DNA</i>	23
4.2.3. <i>Polimorfismo nos fragmentos de restrição do DNA (RFLP)</i>	25
4.2.4. <i>Estudos baseados no DNA ribossomal</i>	26
4.2.5. <i>A reação de polimerase em cadeia</i>	29
4.2.5.1. <i>Técnicas de “fingerprinting” do DNA baseadas em PCR</i> :.....	31
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

APLICAÇÃO E EVOLUÇÃO DOS MÉTODOS MOLECULARES PARA O ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DO RIZÓBIO

Rosangela Stralio¹
Norma Gouvea Rumjanek¹

1. INTRODUÇÃO

A palavra biodiversidade é uma forma abreviada de se referir à diversidade biológica, termo que ganhou muita popularidade nesta última década, especialmente após a declaração da Agenda XXI, publicada após a Reunião da Eco-92, no Rio de Janeiro em 1992. Uma das definições mais úteis de biodiversidade é dada pela União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais: biodiversidade envolve todas as formas de vida, ecossistemas e processos ecológicos, e abrange a sua hierarquia a níveis genético, taxonômico e de ecossistema (McNeely et al., 1990, citados por Bull et al., 1992). No conhecimento da biodiversidade presente nos diferentes ecossistemas está a base do progresso biotecnológico esperado em diferentes áreas da ciência aplicada.

Todo o progresso biotecnológico inicia-se com a procura e a descoberta de um fenômeno biológico que possa ser explorado; sendo assim o planejamento eficiente e otimização dos programas de pesquisa visando a busca e a descoberta é tão crucial quanto qualquer outra etapa neste processo (Bull et al., 1992). Na área de microbiologia, a coleta do material biológico nos estudos tradicionais, é dirigida ao acaso, utilizando métodos relativamente simples, embora laboriosos de isolamento e manipulação. Estes métodos são muito empíricos e sujeitos a grandes limitações, além de promoverem uma seleção prévia da população em estudo conforme o meio de cultivo selecionado, dificultando a eliminação de organismos recorrentes. Deste modo, já nesta etapa, o processo seguinte de seleção fica comprometido, tornando-se também empírico e menos eficiente. O processo de seleção implica em avaliar a maior diversidade genética possível, e, a seguir, dispor de um método eficiente para a seleção dos materiais a serem testados. Esta diversidade está presente na natureza através da variabilidade natural ou através da ocorrência de mutações e recombinações genéticas, enquanto que a escolha do critério de seleção depende do pesquisador e das condições de trabalho disponíveis. Muitos novos métodos tem revolucionado esta área da pesquisa, especialmente com o advento dos métodos moleculares de estudo, envolvendo estudos da variabilidade presente a nível de DNA. Estas novas metodologias tem provocado uma verdadeira revolução na nossa habilidade de detectar variabilidade a níveis de organismo e bioquímico. Além disso, atividades específicas do

¹ Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica-RJ.

diferentes organismos podem ser monitoradas no ecossistema através do acompanhamento da atividade de organismos geneticamente modificados, ou detectadas pela seleção dirigida através de sondas moleculares.

A diversidade dos microrganismos parece refletir as associações obrigatórias ou facultativas com organismos superiores e ser determinada pela diversidade espacial e temporal de seus hospedeiros (Witcomb & Hackett, 1989). No caso das associações rizóbio-leguminosas, apesar de haver mais de 19.000 espécies conhecidas de leguminosas (Allen & Allen, 1981), apenas cerca de dezessete espécies de rizóbio foram até o momento descritas. Esta discrepância é surpreendente uma vez que muitas espécies de rizóbio tem seu círculo de hospedeiras bastante restrito, e é certamente o reflexo do limitado número de espécies de leguminosas estudadas até o presente quanto à esta associação (Haukka, et al., 1996). Os dados levantados nos estudos de genética de populações dos diferentes gêneros de rizóbio indicam que há um alto grau de diversidade genética dentro deste grupo (Demezas et al, 1991, 1995; Eardly et al., 1990, 1995; Leung et al., 1994; Bottomley et al., 1994; Souza et al., 1992; Strain et al., 1994; Paffetti, et al., 1996).

O estudo da biodiversidade do rizóbio tem diversos aspectos importantes, tanto em termos de manejo cultural visando implementar a sobrevivência de populações mais eficientes e mesmo mais específicas, quanto da obtenção de germoplasma mais adaptado aos diferentes tipos de solo. A maioria dos estudos de biodiversidade têm sido conduzidos em solos de clima temperado, sob condições completamente diferentes dos nossos solos tropicais. O emprego das modernas técnicas de DNA recombinante é uma ferramenta preciosa nas mãos dos pesquisadores das regiões tropicais, especialmente as técnicas baseadas em PCR, relativamente baratas e de fácil manuseio (Felice & Alshinawi, 1996). Neste trabalho serão discutidos aspectos gerais e importância dos estudos da biodiversidade microbiana, enfatizando a seguir a situação atual da taxonomia do rizóbio, e a aplicação das modernas técnicas de biologia molecular nos estudos de diversidade destas espécies.

2. A EXTENSÃO DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA

Apesar do enorme potencial em termos de avanço biotecnológico que pode ser promovido pelos estudos visando o inventário da biodiversidade presente na natureza e do grande progresso alcançado nos últimos anos nesta área do conhecimento, estimativas mostram que muito pouco da diversidade presente nos diferentes grupos de organismos é conhecida, especialmente a dos vírus, fungos, bactérias e invertebrados. Em termos globais, foram descritos até o presente, cerca de 1,4 milhões de espécies vivas de todos os tipos de organismos, no entanto as estimativas indicam que sua magnitude fique entre 5 a 30 milhões de espécies (Wilson, 1997). Por sua vez estas estimativas apresentam uma grande amplitude de erro uma vez que os grupos mais bem estudados são os vertebrados e as plantas com flores. No caso dos insetos, que se constituem no grupo mais rico em espécies entre os organismos superiores, os recentes estudos de sua diversidade em florestas tropicais mostram uma grande riqueza em espécies ainda desconhecidas elevando muito o limite superior plausível de espécies.

Os microrganismos constituem cerca de 50% do protoplasma do planeta, representando a maior fonte de diversidade molecular e bioquímica da natureza (Anônimo, 1995). No entanto, as

estimativas dos números totais de espécies de bactérias, archaea e vírus são ainda mais problemáticas devido às dificuldades tais como a detecção e recuperação destes organismos do ambiente, associações obrigatórias desconhecidas e o problema do conceito de espécie neste grupo de organismos (Bull et al., 1992). Acredita-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, sendo que encontram-se descritas apenas 5% destas. Para as bactérias, as estimativas indicam sua magnitude em 300.000 a 1.000.000 de espécies, sendo que o Manual de Bergey, o tratado sobre as espécies bacterianas descritas, contém apenas 3.100 espécies (Anônimo, 1995). Outras estimativas indicam que o número de espécies de bactérias conhecidas esteja em torno de 12% do seu total (Bull et al., 1992), estimativa muito otimista quando se observa a diversidade de determinados grupos de microrganismos. Um exemplo é o caso dos micoplasmas, procaríotos que formam várias associações obrigatórias com organismos eucariotos, possuem requerimentos nutricionais fastidiosos e não são cultiváveis em meio de cultura, e que, no entanto, apresentam uma aparentemente notável diversidade genética. As evidências levantadas pelo estudo de um gênero, *Spiroplasma*, descoberto em 1972, indicam ser este o maior gênero da terra (Witcomb & Hackett, 1989). Estes organismos são associadas principalmente a insetos, apresentando uma taxa anual de isolamento de novas espécies a partir destas fontes de aproximadamente 6%, o que indica uma incrível riqueza de espécies.

O solo é considerado um dos mais diversos habitats na terra, embora muito pouco desta diversidade seja conhecida. Estima-se que apenas uma grama de solo contenha muitos milhares de bactérias, sendo que a população de fungos de solo é pouco estudada, com exceção dos patógenos vegetais e micorrizas. Entre a fauna do solo, estima-se que existam cerca de 100.000 espécies de protozoários, 500.000 espécies de nematóides e 3.000 espécies de minhocas, sem considerar a rica meso e macrofauna (diversos autores citados por Giller et al., 1997). Sabendo-se das diversas e importantes associações entre microrganismos e organismos superiores, pode-se ter uma noção da ampla biodiversidade presente neste habitat. A avaliação da biodiversidade presente no solo é limitada por inúmeras dificuldades, começando pelos problemas de amostragem e extração dos organismos do solo. Qualquer distúrbio na amostra de solo modifica as condições dos micro-habitats que se estabelecem nos microagregados de solo onde se alojam os microrganismos, especialmente bactérias. Além disso, no caso de bactérias, foi estimado que apenas 1% da população presente no solo pode ser recuperada pelos métodos convencionais de isolamento, devido à diversas limitações nutricionais e de condições de crescimento que podem estimular ou limitar o crescimento das diferentes populações presentes (Giller et al., 1997). Há ainda a influência da rizosfera das plantas, levando ao desenvolvimento de uma população altamente especializada de microrganismos, sob condições de aeração, pH, disponibilidade de nutrientes e fatores estimulatórios completamente diferentes das áreas do solo fora desta zona de influência.

O desconhecimento da biodiversidade presente nas regiões tropicais em termos de sua magnitude, dificulta as estimativas a respeito de sua progressiva extinção. As velocidades de extinção das espécies são baseadas não na observação direta de sua extinção mas em princípios de biogeografia. Usando uma relação área-espécie, Simberloff (1984, citado por Wilson, 1997) projetou perdas irreversíveis em razão da destruição das florestas no continente tropical: em torno de 12%

das espécies de aves e 15% das espécies de plantas em um século. A fragmentação das florestas, resultando em ilhas de floresta de pequena extensão circundadas por extensas áreas desmatadas, pode provocar uma redução ainda maior: em áreas de 1 a 25 quilômetros quadrados estimam-se perdas de 10 a 50% das espécies de aves, por exemplo (Wilson, 1997). Muitos outros fatores estão envolvidos nos cálculos destas taxas de extinção, mas o que se sabe é que a diversidade biológica mais ameaçada é também a menos conhecida e explorada. No entanto, dadas as extensas associações entre microrganismos e as diferentes espécies de animais e plantas, e com os diferentes tipos de meio ambiente, conclui-se que as estimativas de perda e degradação destes tem profundas conseqüências na diversidade microbiana. Não há nenhuma perspectiva de que se possa conhecer a diversidade biológica presente em nosso planeta antes que uma grande parte das espécies desapareça. Este quadro é mais preocupante nas regiões tropicais pelo restrito número de profissionais sistematistas competentes para trabalhar com a biodiversidade presente nestas áreas, e pela diminuição na disponibilidade de fundos para pesquisa nos últimos anos devido à priorização de outras áreas de pesquisa. O declínio foi acompanhado pela diminuição em mais de 50% no número de publicações em ecologia tropical de 1979 a 1983 (Cole, 1984). O problema da conservação tropical é assim exacerbado pela falta de conhecimento e escassez da pesquisa.

A importância dos estudos de biodiversidade decorre de um princípio básico, válido para todas as áreas da pesquisa biológica, inclusive a microbiologia do solo: para se fazer avaliações precisas e recomendações, é necessário se conhecer as espécies presentes, sua amplitude geográfica, propriedades biológicas e possível vulnerabilidade à mudanças ambientais (Wilson, 1997).

3. A DIVERSIDADE DO RIZÓBIO

Entre as bactérias fixadoras de nitrogênio presentes no solo, cujas populações são altamente influenciadas pela rizosfera das plantas, o rizóbio é considerado o grupo mais importante na agricultura tropical pela sua associação com as leguminosas. Esta simbiose é responsável por uma substancial parte, talvez a maior, do fluxo global de nitrogênio atmosférico fixado nas formas de amônia, nitrato e compostos orgânicos (Kahindi et al., 1997). Certamente esta associação é a mais estudada, mas simbioses envolvendo actinomicetos do gênero *Frankia*, cianobactérias especialmente a associação *Azolla-Anabaena* e organismos heterotóficos fixadores de nitrogênio de vida livre e associativos, podem também fixar quantidades significativas de nitrogênio sob condições específicas. Há uma grande diversidade de bactérias capazes de formar simbioses com as diferentes leguminosas sendo que, até o momento, encontram-se distribuídas dentro de três ramos filogenéticos principais que são os gêneros *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, e os chamados rizóbios de crescimento rápido. Estes atualmente encontram-se divididos em três gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*, sendo que *R. galegae* deve ser brevemente renomeado como um novo gênero (Young & Haukka, 1996; Lindström et al., 1998). Neste texto, todas estas bactérias capazes de formar nódulos em raízes e caules serão coletivamente chamados de rizóbio.

O rizóbio induz, em suas hospedeiras, a formação de estruturas especializadas chamadas nódulos, onde o nitrogênio molecular é reduzido a amônia, sendo que as diferentes etapas envolvidas

na diferenciação desta estrutura e o complexo controle exercido sobre cada etapa por cada um dos simbionte será discutido em capítulo à parte. Estes estudos tem demonstrado o alto grau de especialização desenvolvido durante o processo evolutivo desta simbiose, havendo importantes relações de especificidade e grandes possibilidades de manipulação deste conhecimento visando melhorar a eficiência simbiótica. Devido à sua importância econômica, os estudos da interação rizóbio-leguminosas tem tido um bom suporte econômico quando comparado às demais áreas de pesquisa agrônoma em diversas partes do mundo, sendo que atualmente é a interação planta-microrganismo mais bem estudada. O estudo da biodiversidade dentro destas espécies, especialmente em regiões tropicais, além de buscar entender suas complexas relações ecológicas e evolucionárias, envolve a procura de genótipos tolerantes aos diferentes estresses ambientais presentes nestas áreas e limitantes à esta simbiose, visando o manejo mais eficiente desta interação.

Os estudos taxonômicos e filogenéticos são necessários para estruturar a biodiversidade do rizóbio presente no solo, facilitar a comunicação entre os cientistas e buscar um maior entendimento da biologia e evolução desta simbiose, com importantes aplicações práticas. De acordo com Haukka (1997), a filogenia pode ser definida simplesmente como uma história evolucionária de organismos e genes, cujo entendimento é um pré-requisito para estudos ecológicos e de genética de populações. A identificação correta de um microrganismo de acordo com suas correlações filogenéticas nos ajuda a prever propriedades genotípicas e fenotípicas esperadas para cada espécie. Em termos de microbiologia, durante muito tempo foi dada pouca importância aos estudos taxonômicos, em vista das grandes dificuldades de classificação impostas pelos métodos tradicionais baseados essencialmente em características fenotípicas, tanto morfológicas como fisiológicas. As primeiras modificações nestes estudos, extremamente empíricos, começaram a ser introduzidas pela utilização dos métodos de taxonomia numérica. Este tipo de abordagem permite a análise conjunta dos dados de fisiologia, morfologia, sorologia e outros, utilizando métodos estatísticos de avaliação das diferenças e similaridades entre os microrganismos, de uma forma menos subjetiva e mais rigorosa, fornecendo medidas quantitativas de similaridade entre as bactérias. Há uma grande aplicabilidade destes estudos na avaliação da biodiversidade de diferentes grupos de microrganismos (Bull et al., 1992), que, além de permitir um levantamento preliminar da diversidade presente no ambiente em estudo, fornecem dados sobre a expressão de características fisiológicas que podem ser correlacionados com determinados fatores ambientais. O advento dos métodos moleculares baseados no estudo do genoma bacteriano, constituíram-se, logo a seguir, numa fonte abundante de dados, reproduzíveis facilmente e passíveis de serem gerados sem a interferência de problemas técnicos importantes como condições de cultivo, estado fisiológico e outros fatores que, muitas vezes, mascaram os dados fenotípicos.

Um exemplo do efeito desta revolução na taxonomia das bactérias é o que ocorreu na classificação taxonômica do rizóbio, a qual foi inicialmente baseada em sua especificidade hospedeira, que, embora ambígua, tem um aspecto prático pela sua utilidade para os usuários e fabricantes de inoculantes. Esta classificação baseada essencialmente na infecção da planta, de acordo com os chamados grupos de inoculação cruzada (Baldwin & Fred, 1929; Fred et al., 1932), foi abandonada devido ao grande número de exceções dentro destes grupos (Wilson, 1944; Graham,

1964). Evidências posteriores demonstraram que os genes que codificam para nodulação, especificidade hospedeira e fixação biológica de nitrogênio nos rizóbios de crescimento rápido estão codificados nos plamídeos simbióticos, transmissíveis entre as diferentes espécies (Brewin et al., 1980; Nuti et al., 1979; Prakash et al., 1981), tornaram este tipo de classificação. De acordo com esta classificação inicial, foram reconhecidas seis espécies, *Rhizobium leguminosarum* (nodula *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* e *Lens*), *R. trifolii* (*Trifolium*), *R. phaseoli* (*Phaseolus*); *R. meliloti* (*Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*), *R. japonicum* (*Glycine max*) e *R. lupini* (*Lupinus*). O círculo de hospedeiras foi o fator mais importante na definição destas espécies, embora tenham sido descritas também características morfológicas e fisiológicas (Fred et al., 1932).

Com o prosseguimento dos estudos, tornou-se claro que o rizóbio era um grupo de bactérias bastante diverso, tanto em círculo de hospedeiras como em características fisiológicas e que havia algum tipo de correlação entre estas duas propriedades. O grupo de rizóbio de crescimento lento, por exemplo, possui todo um conjunto de características distintas dos de crescimento rápido. Baseado em características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas, meio século depois, Jordan (1982) reclassificou algumas espécies, separando as de crescimento lento em um novo gênero, *Bradyrhizobium*. Logo a seguir Jarvis et al. (1986) usou cistrons de rRNA para estudar o relacionamento intergenérico entre *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, confirmando a disparidade filogenética entre estes dois grupos. Os rizóbios de crescimento rápido, na classificação de Jordan (1984) reportada no Manual de Bergey, foram então reclassificados, novamente com base na planta hospedeira que nodulam, em três espécies, *R. meliloti*, *R. loti* e *R. leguminosarum*. A espécie *R. leguminosarum* foi então subdividida em três biovares, *viceae*, *trifolii* e *phaseoli*, conforme sua capacidade de nodular respectivamente ervilha, trevo e o feijoeiro, permanecendo a deficiência no critério de classificação. Posteriormente, foi identificado um grupo de bactérias de crescimento rápido coletado na China, tanto a partir do solo como de nódulos de soja, cujas características fisiológicas e bioquímicas indicavam uma posição taxonômica intermediária entre *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Keyser et al., 1982; Xu & Ge, 1984, citados por Chen et al., 1988). Scholla & Elkan (1984) propuseram uma nova espécie para este grupo, *Rhizobium fredii*, baseados principalmente em experimentos de hibridização de DNA.

Nos últimos anos, conforme destacado acima, a taxonomia das bactérias fixadoras de nitrogênio em geral tem sofrido uma revisão substancial, devido ao advento dos métodos moleculares de análise filogenética (Young, 1994), revelando novas relações entre os grupos de taxonomia confusa, com importantes aplicações práticas. Estes métodos moleculares tem se revelado como ferramenta poderosa nos estudos de biodiversidade das populações de rizóbio presentes no solo. Métodos que consideram a variação genotípica e o relacionamento entre espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* tem sido estabelecidos (Martínez-Romero, 1994; Laguerre et al., 1996). Comparações entre seqüências completas ou parciais de nucleotídeos do 16S rRNA tem sido utilizadas para avaliar a relação filogenética entre as diferentes espécies de *Rhizobium* (Jarvis et al., 1992; Laguerre et al., 1993; Lucas et al., 1995; van Berkum et al., 1996).

Atualmente, na definição de novas espécies, recomenda-se o uso da "taxonomia polifásica", a qual procura integrar diferentes tipos de informações, fenotípicas, genotípicas e filogenéticas, do

microrganismo de interesse buscando uma classificação de consenso (Graham et al., 1991; de Lajudie et al., 1994; Vandamme et al., 1996). Como resultado destes estudos, até o presente, cinco gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio são reconhecidos como simbioses das leguminosas, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988; de Lajudie et al., 1994), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988) e *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997). Estes são os gêneros e espécies aprovados na Mesa Redonda sobre Taxonomia de *Rhizobium*, ocorrida durante o X Congresso Internacional sobre Fixação de Nitrogênio (Lindström et al., 1995) e sugeridos por Lindström et al. (1998) em palestra apresentada no XI Congresso Internacional sobre Fixação de Nitrogênio.

Análises baseadas nas seqüências do 16S rDNA revelaram que os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, apesar de pertencerem à subdivisão alfa de Proteobacteria, possuem uma relação bem distanciada entre si, mas bem próxima a outros grupos de bactérias que não incluem simbioses de plantas (Sawada et al., 1993; Willems & Collins, 1993; Yanagi & Yamasato, 1993; Young et al., 1991). O gênero *Bradyrhizobium* é proximamente relacionado, por exemplo, à bactérias do gênero *Afipia* e a *Rhodopseudomonas palustris*, uma bactéria de vida livre, fototrófica e fixadora de nitrogênio (Kahindi et al., 1997), o que não é tão surpreendente pois o rizóbio fototrófico BTAi1 (Eaglesham et al., 1990), inicialmente classificado como *Photorhizobium*, foi posteriormente considerado uma espécie, ainda não definida, de *Bradyrhizobium* (Young et al., 1991). O gênero *Rhizobium*, por sua vez, é relacionado a *Agrobacterium*, *Brucella*, *Rochalimea* e a *Bartonella* (Martinez-Romero, 1994).

Apesar de possuir até 1992 apenas uma espécie descrita, há muito vinha sendo relatada a grande diversidade genética presente no gênero *Bradyrhizobium* (Hollis et al., 1981; Keyser et al., 1982; Devine et al. 1983; Huber et al., 1984; Kuykendall et al., 1988; Minamisawa, 1989, 1990; Fuhrmann, 1990; Minisawa axonomia numérica, hibridização de DNA e sequenciamento do 16S rDNA. Segundo Lindström et al. (1995), a diferença de apenas 7 bases na seqüência do 16S entre a espécie proposta e *B. japonicum*, e a grande variabilidade existente nos genes do 16S em *Bradyrhizobium*, não justificariam a descrição de uma nova espécie para este grupo de estirpes. Estirpes de *Bradyrhizobium* apresentando ampla diversidade genotípica e fenotípica tem sido isoladas de diferentes gêneros de plantas (Gault et al., 1986; Thies et al., 1991; Young et al., 1991; Dupuy & Dreyfus, 1992; Moreira et al., 1993; Oyazu et al., 1993; Dupuy et al., 1994; Thomas et al., 1994; Chen et al., 1995; Vanrossum et al., 1995; Barrera et al., 1997), sendo provável que haja centros adicionais de variação taxonômica que precisam ser identificados e descritos (Barrera et al., 1997).

O gênero *Sinorhizobium* foi originalmente proposto para os rizóbios de crescimento rápido isolados das raízes de soja (*R. fredii*) (Chen et al., 1988), mas esta proposta foi rejeitada, uma vez que as seqüências do 16S rRNA indicaram que *R. fredii* era de fato muito proximamente relacionado a *R. meliloti* (Jarvis et al., 1992; Young, 1992). Pesquisas posteriores identificaram duas novas espécies muito proximamente relacionadas a este grupo, e levaram a conclusão de que *R. meliloti* devia ser incluído no gênero *Sinorhizobium* (*S. meliloti*), o qual abrangia também *R. fredii* (*S. fredii*) e duas novas espécies isoladas no Senegal, *Sinorhizobium teranga* e *Sinorhizobium saheli* (De Lajudie et al., 1994). Uma nova espécie foi recentemente descrita dentro deste gênero, *S. medicae* (Rome et

al., 1996), a qual abrange o chamado tipo B de *S. meliloti*, segundo divisão proposta por Eardly et al. (1990).

Mesorhizobium (Jarvis et al., 1997), foi o gênero proposto para as bactérias do ramo de *R. loti* (Jarvis et al., 1982) devido ao consenso, há muito tempo existente entre os pesquisadores, de que esta espécie era bastante distinta dos outros rizóbios de crescimento rápido, tais como *R. leguminosarum* e *R. meliloti*. Outras espécies muito proximamente relacionadas, passaram a ser incluídas no gênero *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997; Lindström et al., 1998), tais como *R. huakii* (Chen et al., 1991), *R. ciceri* (Nour et al., 1994), *R. mediterraneum* (Nour et al., 1995) e *R. tianshanense* (Chen et al., 1995). *M. tianshanense* teve sua posição taxonômica controversa, pela similaridade dos dados de sequenciamento com *M. ciceri*, e pela falta de dados de homologia de DNA com outras espécies de rizóbio recentemente descritas. Para confirmar sua posição filogenética, Tan et al (1997) publicaram dados de hibridização de DNA, sequenciamento completo do 16S rDNA e de perfil de proteínas incluindo outros isolados desta espécie e estirpes de referência pertencentes à 11 espécies distintas de rizóbio. Lindström et al. (1998) sugerem a inclusão das espécies *M. amorphi* para englobar a maioria dos isolados de *Amorpha*, uma leguminosa tropical e de *M. plurifarum*, que inclui isolados de diferentes espécies de leguminosas da África e do Brasil. A espécie *M. plurifarum* foi proposta por De Lajudie et al. (1998) para incluir um grupo de estirpes previamente classificadas como pertencentes ao cluster U, distinto inicialmente das demais espécies por eletroforese de proteínas e hibridização de DNA. De acordo com estes autores, o gênero *Mesorhizobium* é bastante heterogêneo e os critérios de taxonomia polifásica são ainda mais importantes quando se trata de estudos de caracterização de espécies dentro deste grupo.

O gênero *Azorhizobium* possui uma única espécie descrita até o momento, *A. caulinodans*, que nodula as raízes e caule de *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988). O *Azorhizobium* é bastante distinto dos outros rizóbios em uma série de propriedades, de modo que, apesar de conter apenas uma espécie, foi colocado em um gênero separado.

O gênero *Rhizobium*, sofreu diversas modificações, algumas relatadas acima como a definição dos gêneros *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* que acabaram englobando espécies que anteriormente pertenciam a este gênero. Atualmente, aceitas pelo Subcomitê Internacional de Taxonomia de *Rhizobium*, pertencem a este gênero as espécies *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. leguminosarum* (Jordan, 1984) e *R. hainanense* (Chen et al., 1997). A ampla diversidade genética presente dentro do gênero *Rhizobium* é evidenciada pelos estudos de isolados de apenas uma planta hospedeira, o feijoeiro (*P. vulgaris*). É reconhecida há bastante tempo a grande diversidade genética dos simbiossomas de *P. vulgaris*, inicialmente classificados como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, cuja diversidade relatada sempre foi maior do que a presente nos demais biovars (Graham & Parker, 1964; Jarvis et al., 1980; Jordan, 1984). Todos estes trabalhos foram baseados em isolados de rizóbio que nodulam o feijoeiro que ocorrem naturalmente em solos de países de clima temperado, resultando em comparações destes isolados com o rizóbio isolado de plantas originárias destas regiões, como ervilha e trevo. A partir de 1985, foi publicada uma série de estudos sobre os simbiossomas de feijoeiro isolados nas Américas, incluindo os provenientes das regiões de Cerrado brasileiras, liderados pelo grupo de pesquisa da Universidade

Autônoma do México (UNAM), com a colaboração do Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB). Estes estudos, que levaram em consideração diversas características fisiológicas e genéticas correlacionadas com a especificidade hospedeira, resultaram na definição de novas espécies e hipóteses sobre sua distribuição geográfica. Inicialmente estas bactérias foram divididas em dois grupos, denominados Tipo I e II (Martínez et al., 1985, 1987, 1988; Quinto et al., 1985; Brom et al., 1988). O prosseguimento destes estudos levou à descrição de *R. tropici*, incluindo as estirpes do tipo II, subdivididas em dois grupos, IIA e IIB (Martínez-Romero et al., 1991) e de *R. etli*, que inclui as estirpes do tipo I isoladas no México (Segovia et al., 1993). A partir daí ficou estabelecido pelo Subcomitê Internacional de Taxonomia de *Agrobacterium* e *Rhizobium*, que somente seriam consideradas como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* as estirpes que estivessem estreitamente relacionadas com os genes cromossomais dos outros biovars desta espécie (Hungria et al., 1997).

Quanto à distribuição geográfica do *Rhizobium* que nodula o feijoeiro, a hipótese lançada por Segovia et al. (1993) é de que a espécie *R. etli* seria encontrada normalmente na Mesoamérica, tendo sido introduzida na Europa juntamente com sua hospedeira no século XVI. Pela transferência horizontal do plasmídeo simbiótico destas estirpes para *R. leguminosarum*, teria surgido *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Por outro lado, *R. tropici* seria originário da América do Sul (Martínez-Romero et al., 1991), devido à freqüência de isolamento desta espécie principalmente no Brasil (Hungria et al., 1995; Mercante et al., 1998). No entanto, dados de levantamento de espécies de rizóbio nodulando o feijoeiro na Europa mostram uma ampla diversidade, incluindo a presença significativa de isolados de *R. etli*, *R. tropici* e mais recentemente duas novas espécies, compreendendo principalmente estirpes isoladas de nódulos de feijoeiro na França (Laguerre et al., 1993; Amarger et al., 1994), *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger, et al., 1997). Como estas espécies foram descritas após o último Congresso Internacional sobre Fixação Biológica de Nitrogênio, não foram listadas por Lindström (1998), no entanto foram publicadas no International Journal of Systematic Bacteriology, seguindo as regras do Subcomitê sobre Taxonomia de *Rhizobium* e *Agrobacterium*, o que deve garantir sua aceitação pela comunidade científica. Em resumo, até o presente, três espécies distintas de rizóbio são de reconhecida importância ecológica como simbioses do feijoeiro, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* e *R. tropici*, sem considerar ainda as duas novas espécies descritas recentemente na França. Além deste gênero, um número bastante representativo de isolados que, através de análise genética de restrição do 16SrDNA, foram incluídos dentro do gênero *Sinorhizobium* foram isoladas de nódulos de feijoeiro ocorrendo naturalmente em solos tropicais do Brasil (Stralio et al., 1997) e da África (Murphy et al., 1997). Esta diversidade observada nos estudos dos simbioses do feijoeiro não é, provavelmente, uma exceção e dá uma idéia do universo em termos de espécies de rizóbio ainda desconhecidas, presentes em nossos solos, associadas às mais de 19.000 espécies de leguminosas descritas, sendo que se estima que 2.800 delas formem nódulos (Allen & Allen, 1981). Apenas para citar mais alguns exemplos, estudando as leguminosas arbóreas, Zhang et al. (1991) relacionou oito agrupamentos distintos entre os isolados obtidos de *Leucaena*, *Acacia* e *Prosopis*. Haukka et al. (1996) confirmou esta ampla diversidade genotípica entre os isolados de *Acacia* e *Prosopis*, pois para estas duas espécies

arbóreas encontrou 12 genótipos distintos de rizóbio com base no sequenciamento parcial do 16S rRNA.

Ainda dentro do gênero *Rhizobium*, a espécie *R. hainanense* foi proposta por Chen et al. (1997), no entanto esta nomenclatura havia sido desencorajada por Lindström et al. (1995) após sua publicação inicial no International Symposium on *Rhizobium* Diversity and Taxonomy, realizado na China em outubro de 1994. Esta espécie foi identificada por taxonomia numérica e contém 13 estirpes isoladas de 13 diferentes espécies de plantas que crescem na ilha tropical chinesa de Hainan. A similaridade com *R. tropici* verificada pelo seqüenciamento parcial do 16S rRNA, e a falta de estudos de homologia de DNA com outros isolados de *R. tropici* geraram as críticas quanto à validade da nova espécie. O trabalho final propondo a nova espécie (Chen et al., 1997) já inclui comparações da homologia de DNA com 6 estirpes diferentes de *R. tropici*, além de estirpes pertencentes à outras espécies descritas de rizóbio, assim como dados de sequenciamento do 16S rDNA e círculo de hospedeiras. Após estas caracterizações adicionais Lindström et al. (1998) passaram a incluir a espécie dentro do gênero *Rhizobium*.

Continuam sendo classificadas como pertencentes ao gênero *Rhizobium*, as bactérias do grupo de *R. galegae* (Lindström, 1989). No entanto um quarto gênero de rizóbio de crescimento rápido deverá abranger esta espécie, uma vez que o sequenciamento do 16S rRNA mostra um distanciamento dos outros gêneros de *Rhizobium*, e uma maior proximidade com *Agrobacterium* (Young & Haukka, 1996). Este grupo é chamado de “rizóbio semelhante à agrobactéria”, constituindo um grupo fenotípica e genotipicamente distinto das bactérias capazes de formar nódulos (Lindström et al., 1998). No entanto há ainda uma grande distância evolucionária também em relação às agrobactérias, de modo que estas diferenças precisam ser melhor estabelecidas e maiores estudos são necessários, juntamente com a identificação de outras espécies proximamente relacionadas, para permitir o seu deslocamento para um novo gênero (Lindström et al., 1995).

4. APLICAÇÕES DA BIOLOGIA MOLECULAR NOS ESTUDOS DE DIVERSIDADE E TAXONOMIA DO RIZÓBIO

Os estudos taxonômicos foram por muito tempo relegados a um segundo plano dentro da chamada “ciência aplicada”, objeto de estudos de abnegados cientistas às voltas com inúmeros problemas relativos à definição de espécies, especialmente quando se considera o estudo da taxonomia bacteriana. Uma definição interessante desta ciência foi dada por Wilson (1985) já prevendo as mudanças que iniciavam a ocorrer neste campo de estudo: “Systematics, the study of biological diversity, is sometimes portrayed as the mere classification of organisms, but in fact its range and challenges are among the greatest in biology”. De fato a busca de organismos que possuem genes de interesse, tanto agrônomo quanto industrial, depende das metodologias de classificação uma vez que estirpes relacionadas dentro de um taxon tem maiores possibilidade de também possuírem estas características de interesse. Bull et al. (1992) listou uma série de campos onde a moderna sistemática microbiana pode auxiliar nos diversos desafios colocados aos biotecnologistas:

1. geração de dados de alta qualidade que podem ser usados para melhorar os sistemas existentes de identificação e classificação microbiana e formular novos métodos para o isolamento seletivo de microrganismos raros e novos;
2. permitir a rápida detecção, circunscrição e identificação de organismos novos ou alvo em placas de isolamento primárias, ou mesmo "in situ", e o reconhecimento de colônias que surjam de propágulos semelhantes;
3. determinar condições ecológicas para o isolamento seletivo;
4. providenciar descrições compreensivas de estirpes patenteadas; e
5. determinar a extensão da diversidade procariótica, inclusive determinando a distribuição geográfica de microrganismos importantes industrialmente ou agronomicamente, redirecionando a tendência corrente da ecologia microbiana, de focalizar na função mais do que em promover um entendimento dos papéis dos taxa específicos nos diferentes ecossistemas microbianos.

Este extenso campo de ação só pode ser melhor compreendido no contexto da nova sistemática microbiana, surgida a partir da introdução e aplicação de novos conceitos taxonômicos e técnicas surgidas a partir do final dos anos 50 e início dos anos 60 (Bull et al., 1992). O desenvolvimento mais significativo iniciou-se com a aplicação dos métodos de taxonomia numérica, molecular e química, e especialmente nos últimos 10 anos, com o rápido desenvolvimento no campo do sequenciamento do rRNA e dos genes que codificam para o rRNA (rDNA) e sua contribuição para a filogenia bacteriana e taxonomia de todos os organismos vivos, como também das técnicas de "fingerprinting" molecular. Com o advento da análise fenética numérica e das técnicas de biologia molecular dentro da taxonomia bacteriana, foi possível determinar objetivamente as relações inter e intra-específicas.

A chamada taxonomia polifásica, iniciou-se 25 anos atrás, e seu objetivo é a integração dos diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genéticas e filogenéticas) sobre o microrganismo e essencialmente indica uma taxonomia de consenso (Vandamme et al., 1996). O termo "taxonomia polifásica" foi utilizado pela primeira vez por Colwell (1970) e é utilizado para o delineamento de taxa em todos os níveis (Murray et al., 1990). Os recentes desenvolvimentos na taxonomia polifásica, também chamada de classificação polifásica ou identificação polifásica, constituem um enorme avanço na moderna taxonomia bacteriana (Vandamme et al., 1996).

A taxonomia é geralmente tida como um sinônimo de sistemática ou biosistemática, sendo tradicionalmente dividida em 3 partes (Vandamme et al., 1996):

1. classificação, isto é, o arranjo ordenado dos organismos em grupos taxonômicos com base em sua similaridade;
2. nomenclatura, ou seja, identificação das unidades definidas em (1);
3. identificação de organismos desconhecidos, que é o processo de definir se um determinado organismo pertence a uma das unidades definidas em (2).

Dois partes adicionais completam a moderna biosistemática: filogenia e genética de populações (Vandamme et al., 1996).

Dois termos merecem ser diferenciados: análise fenética e análise filogenética. Conforme a definição de Abbott et al. (1985, citados por Weising et al., 1995), padrões fenéticos são padrões de semelhança e diferença entre organismos, baseados em muitas características herdáveis. Frequentemente há descontinuidades, de modo que os padrões revelam agrupamentos com diferentes faixas de variação entre si e vários graus de diferença dentro do grupo. Os padrões filogenéticos mostram como os padrões fenéticos mudam com o tempo, formando uma árvore com diferentes ramificações.

Já a definição de espécie em bacteriologia é um questão ainda em aberto, e, segundo alguns autores, há tantas definições de espécie quanto há biólogos e mesmo assim muitos destes mudam de opinião no decorrer de suas carreiras científicas... Mas, antes de ser um problema, esta dificuldade é um padrão de evolução que ocorre em todos os campos do conhecimento humano, onde o progresso científico somente é possível e está ligado ao progresso tecnológico. Ou seja, a medida que novas tecnologias vão surgindo, os estudos vão progredindo e abrangendo um universo cada vez maior do desconhecido, conseqüentemente as nossas teorias vão se modificando e aperfeiçoando. A questão da definição de se as bactérias, assim como plantas e animais, podem ser ordenadas em taxa distintos, como gêneros e espécies, permanece portanto em aberto. A definição zoológica de espécie não pode ser aplicada aos organismos procariotos pois pressupõe que a "espécie é um grupo de populações que podem ser, ou são potencialmente, intercruzadas naturalmente e que são reprodutivamente isoladas de outros grupos ou espécies" (Ravin, 1963, citado por Stackebrandt & Goebel, 1994). Mesmo após muitos anos de pesquisas a extensão da sexualidade em bactérias é virtualmente desconhecida, e o isolamento reprodutivo de estirpes bacterianas pode ser descartado (Stackebrandt & Goebel, 1994). Se o termo espécie é usado, então, para expressar os membros de um determinado organismo em uma ordem taxonômica, os microbiologistas devem seguir algumas linhas mestras de modo a obter estabilidade, reproducibilidade e coerência em seus dados taxonômicos. Neste caso, a espécie passa a ser circunscrita como um grupo taxonômico definido em termos das características de seus membros constituintes (Stackebrandt & Goebel, 1994). Vem daí a grande utilidade da taxonomia polifásica, que busca, conforme destacado acima, este consenso na descrição das características dos membros deste grupo.

A espécie é a unidade básica da taxonomia bacteriana, definida finalmente como um grupo de estirpes, incluindo a estirpe padrão, que possuem 70% ou mais de homologia de DNA e com 5°C ou menos de ΔT_m (T_m é a temperatura de fusão do híbrido determinado por denaturação passo a passo; ΔT_m é a diferença em graus Celcius entre o híbrido homólogo e o heterólogo formada nas condições padrão) (Wayne et al., 1987). O nível exato abaixo do qual os organismos são considerados como pertencentes à espécies diferentes varia de autor para autor, e o valor de 70% acaba sendo mais indicativo do que absoluto (Bull et al., 1992). As características fenotípicas e quimiotaxonômicas devem estar de acordo com esta definição pois, idealmente, as espécies genômicas definidas utilizando a hibridização de ácidos nucleicos deveria corresponder à aquelas definidas pela taxonomia numérica (Bull et al., 1992; Stackebrandt & Goebel, 1994). Esta é a opinião do "Ad Hoc Committe on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics" (Wayne et al., 1987),

cujo documento lista uma série de recomendações taxonômicas visando estimular a discussão deste tópico, reforçando a visão de que critérios quimiotaxonômicos (tanto fenéticos quanto filogenéticos) devem ser observados quando da proposta ou inferência de níveis hierárquicos. Além disso, atualmente, a classificação bacteriana deve refletir o mais proximamente possível as relações naturais entre as bactérias, definidas pelas relações filogenéticas codificadas pelo sequenciamento do 16S ou 23S rRNA (Woese, 1987). Como veremos a seguir, nem sempre este consenso é de fácil obtenção, e vários casos são relatados em literatura onde surgem conflitos entre os dados gerados segundo os diferentes métodos de abordagem genotípica (Fox et al., 1992).

Conforme destacado no tópico 3, a taxonomia do rizóbio sofreu contínuas modificações como reflexo do avanço desta ciência, passando por revisões periódicas a medida que os estudos ecológicos mostraram a ocorrência significativa de novos grupos de bactérias. A medida que estes estudos taxonômicos se desenvolvem, é importante correlacionar as diferenças taxonômicas com características fenotípicas, sendo esta a visão do Subcomitê sobre a Taxonomia de *Rhizobium* e *Agrobacterium* (Elkan, 1992). Uma espécie de manual de padrões de procedimento na descrição de novos gêneros e espécies de bactérias formadoras de nódulos em raízes e caule foi proposto por este subcomitê e publicado por Graham et al. (1991). O subcomitê considera que descrição de um novo gênero ou espécie deve ser baseada em organismos independentemente isolados, de regiões geográficas distintas, com a descrição da espécie publicada no International Journal of Systematic Bacteriology, e que a estirpe padrão seja depositada numa coleção de culturas internacionalmente reconhecida, disponível a outros pesquisadores. Para a estirpe padrão e isolados representativos, as seguintes características devem ser consideradas: desempenho simbiótico baseado em parâmetros selecionados; características morfológicas e culturais; grau de homologia DNA:DNA; hibridização rRNA:DNA e análise do 16S rRNA; polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição do DNA (RFLPs); e eletroforese de enzimas multilocus (MLEE). Como destacado no item 3, assim como em todos os outros campos da taxonomia bacteriana, a taxonomia do rizóbio foi altamente influenciada pelos novos conceitos taxonômicos e filogenéticos, principalmente com a substituição do critério de especificidade-hospedeira por outros baseados neste conceito de taxonomia polifásica. A seguir serão descritos os principais métodos genotípicos e fenotípicos utilizados nos estudos de taxonomia polifásica com ênfase nos estudos desenvolvidos nos diferentes grupos de rizóbio. Não faz parte dos objetivos deste trabalho o detalhamento dos métodos microbiológicos e moleculares para o estudo e monitoramento do rizóbio introduzido artificialmente no solo, sendo que Akkermans et al. (1994); Wilson (1995) e van Elsas et al. (1998) apresentam revisões abrangentes sobre o estado da arte em relação a este tópico.

4.1. Métodos fenotípicos

Estão incluídos dentre os métodos fenotípicos todos aqueles não direcionados às moléculas de DNA ou RNA, conseqüentemente incluem as técnicas quimiotaxonômicas, conforme classificação proposta por Vandamme et al. (1996). O termo quimiotaxonomia refere-se à aplicação de métodos analíticos para a coleta de informações sobre os vários constituintes da célula visando a classificação bacteriana (Vandamme et al., 1996).

4.1.1. Métodos fenotípicos clássicos

Os métodos fenotípicos clássicos ou tradicionais são usados nos protocolos de identificação da maioria dos laboratórios de microbiologia. Compreendem dados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, os quais individualmente são considerados irrelevantes como parâmetros de relacionamento genético, mas coletivamente fornecem informações descritivas que permitem a distinção de diferentes taxa. As estirpes de *Rhizobium* diferem significativamente no metabolismo de carbono e na utilização de diferentes substratos. A habilidade de utilizar glucose, sacarose, lactose, frutose, arabinose, succinato ou adipato pode servir como um teste diagnóstico na diferenciação das espécies de rizóbio (Graham et al., 1991). O tempo de geração em meio contendo extrato de levedura, manitol e sais minerais (Vincent, 1970), denominado YMA (yeast-manitol-agar) distingue os diferentes gêneros de rizóbio, sendo de 2 a 4 horas para *Rhizobium*, 6 a 10 horas para *Bradyrhizobium* e apresentando valores intermediários para *Mesorhizobium*. Como conseqüência, o tamanho das colônias em meio sólido varia de 2 a 4mm após 3 a 5 dias de incubação para *Rhizobium* e *Mesorhizobium* e até 1 mm após 5 a 7 dias para *Bradyrhizobium*. Outras características importantes a serem observadas são listadas como padrões mínimos para a descrição de novas espécies de rizóbio, recomendadas pelo Subcomitê Internacional em Taxonomia de *Rhizobium* e *Agrobacterium*, e podem ser consultadas em Graham et al. (1991). É importante ressaltar que há uma grande variabilidade quando se analisa estas características, de modo que a possibilidade de análise do maior número possível de dados culturais, morfológicos e outras propriedades fenotípicas (tolerância a antibióticos, sorologia, análise de lipopolissacarídeos celulares, padrões proteicos, composição das paredes celulares, etc.) deve ser considerada, de acordo com a disponibilidade de cada laboratório (Vandamme et al., 1996). Muitos programas de computador são atualmente disponíveis para se proceder a análise numérica destes dados, facilitando a sua interpretação.

Inúmeros trabalhos tem sido publicados com base em características fenotípicas visando a caracterização de diferentes populações rizóbio nodulando as mais diversas hospedeiras (Kuykendall & Elkan, 1976; Fuhrmann, 1990; Shishido & Pepper, 1990; Moawad e Bohlool, 1992; Batzli et al., 1992; Leung et al., 1994; van Berkum et al. 1995; Sweelim et al., 1997; Ramirez et al., 1997a,b; Xavier et al., 1998). Muitas destas características fenotípicas são estudadas com o objetivo não somente de caracterização, mas de verificar a provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais prevalentes no ecossistema para o qual se procede a seleção do

rizóbio-inoculante. Além disso, busca-se correlacionar dados de diversidade metabólica com os de eficiência simbiótica, uma vez que aquela deve refletir a diversidade dos mecanismos de controle das interações simbióticas entre espécies de rizóbio e as diferentes leguminosas (Kuykendall & Elkan, 1976; Batzli et al., 1992). Tolerância às condições de salinidade (Swellim et al., 1997), pH (Graham et al., 1992; Swellim et al., 1997), temperatura (Sá et al., 1993; Mercante, 1993), antibióticos (Xavier et al., 1998), etc, são analisadas “in vitro”, tentando estabelecer-se correlações com a eficiência simbiótica dos isolados a nível de campo.

Shishido & Pepper identificaram os tipos dominantes de *Rhizobium meliloti* nodulando alfafa (*Medicago sativa* L.) em 5 locais diferentes do Arizona, EUA, através de resistência a antibióticos e padrão de plasmídeos. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas quando estas características foram correlacionadas com a eficiência simbiótica, medida através do peso seco da parte aérea, peso de raízes e nódulos, redução de acetileno e conteúdo de nitrogênio total.

Martins et al. (1997) tentou correlacionar características fenotípicas, como tempo de crescimento em meio YMA e pH do meio de crescimento, e simbióticas, como atividade da hidrogenase, capacidade de fixação de nitrogênio e nodulação da soja, com as condições de solo e clima das regiões onde populações de rizóbio capazes de nodular o caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) foram isoladas. Entre outras conclusões, os autores observaram a maior ocorrência de estirpes de crescimento rápido em condições de clima semi-árido, apesar da planta ser tida como caracteristicamente nodulada por estirpes de *Bradyrhizobium*, de crescimento lento. Num outro estudo desta população de rizóbio, características fenotípicas tais como produção de muco e resistência a antibióticos foram relacionadas aos níveis de fósforo (P) e alumínio (Al) no solo (Xavier et al., 1998). Uma grande diversidade em termos de níveis de resistência a antibióticos foi verificada na população em estudo, sendo que um aumento nos níveis de resistência pode ser correlacionado com maiores níveis de P e Al no solo, sendo que o tipo de muco produzido pela bactéria também variou em concentrações crescentes de Al.

Em termos ecológicos, a análise de dados fenotípicos tem aplicabilidade restrita devido ao grande número de interações que ocorrem no sistema solo, tanto bióticas como abióticas, especialmente quando se considera os microagregados do solo onde se alojam as populações bacterianas e a influência do ambiente rizosférico. Estas interações dificultam as correlações entre os resultados a nível de laboratório com os obtidos a nível de campo. No entanto, em termos taxonômicos, após a introdução dos métodos de taxonomia numérica, permitindo o agrupamento de um grande número de isolados com características fenotípicas semelhantes, a análise destes dados tornou-se imprescindível. Atualmente, apesar da avalanche de dados genotípicos na literatura, a correlação destes com as características fenotípicas é uma das condições para a descrição de novos gêneros e espécies bacterianas. Além disso, estas análises de agrupamento facilitam o estudo comparativo do comportamento dos diferentes grupos, tanto intraespecíficos como interespecíficos, quanto às diferentes características a nível de campo.

4.1.2. Análise numérica de dados fenotípicos

O primeiro grande impulso na sistemática bacteriana foi dado pela introdução e aplicação dos novos conceitos taxonômicos e técnicas no final dos anos 50 e início dos anos 60. A classificação auxiliada por computadores ou taxonomia numérica foi primeiramente aplicada a microrganismos no final dos anos 50, tendo surgido paralelamente com o desenvolvimento dos computadores. O objetivo inicial era distribuir as estirpes bacterianas em grupos homogêneos ou taxoespécies, usando dados fenéticos e usar os resultados quantitativos gerados nos diferentes agrupamentos para implementar protocolos de identificação (Bull et al., 1992). Os dados fenotípicos foram os primeiros a serem analisados por meio de comparações baseadas em análise numérica auxiliada por programas computacionais específicos (Vandamme et al., 1996). Este tipo de análise permitiu a manipulação simultânea de um grande número de dados para um grande número de isolados. Inicialmente são calculadas matrizes mostrando o nível de similaridade entre cada par de isolados, a seguir, dendrogramas são construídos baseados em análise de agrupamento, os quais indicam o nível de relacionamento entre os diferentes grupos. O grande número de dados analisados são obviamente um reflexo de um grande número de informações genotípicas, e os dados comparativos com outras abordagens taxonômicas mostram que a análise numérica baseada em um grande número de informações fenotípicas é taxonomicamente relevante (Vandamme et al., 1996).

Na classificação bacteriana estes métodos tem sido extensivamente utilizados em estudos de diversidade de um grande número de espécies em diferentes ambientes (Goodfellow et al., 1992; Lipski et al., 1992; Prieto et al., 1992; Riedel & Britz, 1993; Dykes et al., 1994). Zhang et al. (1991) demonstrou através de análise fenotípica numérica que os isolados de rizóbio obtidos de *Acacia senegal* e *Prosopis chilensis*, no Sudão, são bastante diversos e podem ser classificados em pelo menos oito agrupamentos distintos das espécies até então descritas. De Lajudie et al. (1994) num estudo de taxonomia polifásica de 52 isolados de *Acacia* spp e *Sesbania* spp do Senegal, procederam, entre outras análises fenotípicas e genotípicas, a análise numérica baseada na utilização de 147 compostos orgânicos, sendo que houve concordância entre estes agrupamentos e os obtidos baseados em características genotípicas. Estudos de taxonomia numérica de 240 características fenotípicas serviram como base para a proposta do gênero *Sinorhizobium* por Chen et al. (1988). Uma nova espécie pertencente a este gênero, *Sinorhizobium medicae* (Rome et al., 1996), foi recentemente descrita de acordo com o conceito de taxonomia polifásica, utilizando dados genotípicos diversos e análise numérica baseada em 63 características fenotípicas, havendo boa correlação entre estes dados e os derivados da análise genotípica.

A caracterização de um grande número de isolados através da análise fenotípica numérica é muitas vezes utilizado como critério de agrupamento para a seleção de isolados representativos que serão a seguir analisados quanto a outras características, como análise por métodos genotípicos ou fenotípicos mais complexos e dispendiosos e características simbióticas. Batzli et al. (1992) analisou inicialmente 182 isolados quanto à utilização de carboidratos, resistência à antibióticos, tolerância à NaCl e resposta à níveis de pH. Os isolados foram agrupados em 37 grupos distintos por taxonomia

numérica, sendo que isolados representativos destes agrupamentos foram então selecionados para análise quanto ao padrão de proteínas, tempo de geração e resposta simbiótica.

4.1.3. Análise de isoenzimas

O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma determinada espécie, como resultado da presença de um ou mais genes codificando para cada uma destas formas (Selander et al., 1986). Este método detecta os diferentes alelos de genes diagnósticos analisando a mobilidade eletroforética das enzimas que codificam. O princípio básico da técnica reside no uso de eletroforese em gel de amido e na visualização do produto enzimático por métodos bioquímicos. Os padrões eletromórficos produzidos para um certo número de enzimas são identificados como fenótipos multilocus ou tipos eletroforéticos (Electrophoretic Types - ET's), os quais refletem o genótipo cromossomal. A difusão do uso desta metodologia deu-se através do desenvolvimento de metodologias eficientes para a visualização do produto enzimático, e da aplicabilidade imediata encontrada em diversas áreas da biologia (Ferreira & Grattapaglia, 1995). O estudo dos padrões de isoenzimas obtidos por eletroforese (MLEE – multilocus enzyme electrophoresis) tem sido amplamente aplicados nos estudos de diversidade genotípica cromossomal e da estrutura genética de populações bacterianas do solo, inclusive dentro do gênero *Rhizobium* (Denny et al., 1988; Piñero et al., 1988; Harrison et al., 1989; Young, 1985; Young & Wexler, 1988; Eardly et al., 1990; Demezas et al., 1991; Souza et al., 1994; Barrera et al., 1997). Embora as técnicas baseadas nas metodologias de amplificação de DNA por PCR tenham obtido grande popularidade nos últimos anos, a maioria dos dados de diversidade e estrutura genética das populações bacterianas disponíveis são baseados em isoenzimas. Em rizóbio, Martínez-Romero & Caballero-Mellado (1996) apresentam um levantamento atualizado e crítico dos estudos realizados, e a conclusão é de que, em geral, as estimativas de relacionamento genético entre estirpes bacterianas por este método apresentam boa correlação com os estudos baseados em hibridização de DNA, embora possam estar subestimadas quando comparadas com os dados de sequenciamento.

4.1.4. Pirólise

A espectrometria de massa após a pirólise é um método sofisticado de análise da composição química total das células bacterianas. É uma metodologia sensível às condições de crescimento das culturas uma vez que faz a análise dos ácidos graxos celulares (Jarvis & Tighe, 1994) mas sob condições padronizadas, constitui-se num método rápido, altamente reproduzível e universal. É adequado para a determinação da integridade taxonômica de grupos bacterianos classificados através de outras metodologias (Barrera et al, 1997). O método foi utilizado para a discriminação entre estirpes de *Bradyrhizobium* e *R. meliloti* (Goodrace et al., 1991; Kay et al., 1994). Numa análise de diversidade de *Bradyrhizobium* utilizando as técnicas de isoenzimas e pirólise, Barrera et al (1997) encontraram um excelente concordância entre os dados obtidos com as duas metodologias, sendo que dentre 13 grupos eletroforéticos distintos (ET's), 10 corresponderam aos grupos PyMS (Curie point pyrolysis mass spectrometry).

4.1.5. Métodos sorológicos

A sorologia tem sido frequentemente utilizada há mais de 70 anos para a caracterização de populações rizobianas no solo (Means et al., 1964; Fuhrmann, 1990; Moawad & Bohlool, 1992; Leung et al., 1994; Ramirez et al., 1997a). Os métodos sorológicos de caracterização são baseados na presença de variabilidade nos constituintes antigênicos das células bacterianas. Diferentes tipos de reações sorológicas podem ser utilizadas, incluindo os testes simples de aglutinação e precipitação ou reações mais complexas como ELISA (Vandamme et al., 1996). Estes métodos são utilizados com diferentes finalidades: fornecer uma visão superficial da diversidade das populações de rizóbio nativas em ecossistemas específicos; permitir o levantamento da ocorrência e distribuição de bactérias antigenicamente relacionadas entre diferentes estados, países e continentes e estudar a ecologia destas bactérias no solo. A aplicação taxonômica dos estudos sorológicos é bastante limitada uma vez que estirpes de rizóbio possuindo propriedades antigênicas similares podem ser bastante diversas com respeito à outras características fenotípicas e genotípicas. Sendo assim, outras propriedades dos diferentes isolados tem sido também analisadas dentro dos diferentes grupos sorológicos, tais como resistência a antibióticos, características morfofisiológicas, indução de clorose foliar (em *Bradyrhizobium*), eficiência na fixação de nitrogênio, evolução de hidrogênio, entre outras (Fuhrmann, 1990; Moawad & Bohlool, 1992; Ramirez et al., 1997a).

Alguns trabalhos tem procurado correlacionar características antigênicas com propriedades fisiológicas e genotípicas (Leung et al., 1994; van Berkum et al., 1995; Ramirez et al., 1997b). Ramirez et al. (1997b) num estudo envolvendo 58 isolados de *Bradyrhizobium* de duas populações do solo, observaram que isolados com propriedades antigênicas similares mostraram-se distintos com respeito à características de morfologia de colônias, resistência a antibióticos, propriedades simbióticas, indução de clorose foliar e análise por PFGE (RFLP do DNA cromossomal, obtido com enzimas de restrição de corte raro). Neste estudo, o padrão de bandas obtido foi mais heterogêneo quando se considerou a origem dos isolados dentro de um dos sorogrupos analisados, enquanto que o outro mostrou maior homogeneidade independentemente do solo em que os isolados foram recuperados. Os autores levantaram hipóteses sobre a influência de características do solo na predominância de determinadas características antigênicas, o que não é de surpreender, uma vez que os constituintes da parede celular tem alguma influência na proteção celular e interação com componentes químicos do solo. Por outro lado, conforme esperado, o padrão de bandas geradas pela análise de PFGE foi específico para cada isolado e os agrupamentos obtidos pela análise genotípica foram mais homogêneos em relação às características simbióticas, refletindo uma maior correlação entre estes parâmetros. Os parâmetros fenotípicos não apresentaram este tipo de agrupamento.

A variabilidade de isolados de *Vicia faba* foi analisada através de sorologia, padrão de plasmídeos, MLEE, RFLP do DNA cromossomal hibridizado com sondas de rDNA e de genes *nodDABC* de *R. meliloti* (van Berkum et al., 1995). Não foi observada uma correlação clara entre os dados serológicos e de MLEE. Os isolados mostraram grande diversidade em conteúdo de

plasmídeos e características antigênicas. Os autores investigaram também a reação de isolados de ervilha (*Pisum sativum*) contra anticorpos preparados para isolados de *Vicia*, bem como procederam análises comparativas baseadas em RFLP utilizando as sondas acima descritas. Estes dados indicaram que estas estirpes são distintas de isolados de *Pisum sativum*, *V. villosa* e *Trifolium* sp. em todas estas características.

Como se percebe, os dados sorológicos se constituem em uma ferramenta adicional na caracterização de diferentes populações, e correlações entre estes dados e dados genotípicos podem ou não auxiliar no entendimento da sua diversidade e ecologia.

4.1.6. SDS-PAGE

A análise de proteínas totais por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio - poliacrilamida (SDS PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) também tem sido utilizada para a caracterização da diversidade em isolados bacterianos, sendo considerado um método bastante confiável para comparação de grandes grupos de estirpes muito proximamente relacionadas (Vandamme et al., 1996). Moreira et al. (1993) comparou através desta metodologia, 180 isolados de rizóbio de crescimento rápido e lento obtidos de nódulos de leguminosas tropicais da região Amazônica e Floresta Atlântica, comparando-as com diferentes espécies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*. Entre os isolados de crescimento rápido, os autores identificaram muitos agrupamentos distintos das espécies até então descritas. Este método foi também utilizado, entre outros, na caracterização de gênero *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988) e na determinação das relações filogenéticas entre *M. tianshanense* e outros rizóbios (Tan et al., 1997), ou mesmo em um estudo de diversidade de rizóbio que nodula *Robinia pseudoacacia* L. (Batzli, et al., 1992).

4.2. Métodos genotípicos

A identificação rápida e confiável de estirpes continua sendo o objetivo mais importante nos estudos taxonômicos. Nos últimos anos o interesse renovado nos estudos de taxonomia microbiana deve muito ao desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, o quais aumentaram em muito a disponibilidade de métodos que permitem a identificação e classificação mais rápida e precisa de microrganismos. Neste grupo de análise genotípica estão todas as metodologias direcionadas ao estudo das moléculas de DNA ou RNA. Através da aplicação de tecnologias baseadas em PCR, sequenciamento automatizado, eletroforese de “pulse-field” e sondas de oligonucleotídeos, a velocidade de geração de dados é impressionante.

O desenvolvimento das abordagens moleculares levou à formação diferentes tendências dentro da sistemática bacteriana, por exemplo, a elucidação de relações filogenéticas, estudos descritivos combinando informações filogenéticas e fenotípicas, estudos ecológicos com o objetivo de revelar espécies não cultiváveis de microrganismos, ou mesmo evitar os procedimentos de cultivo nos estudos de ecologia microbiana do solo, e o desenvolvimento de metodologias de diagnose (Stackebrandt & Goebel, 1994). Metodologias mais simples como a técnica de hibridização do DNA

de colônias, com sondas ligadas a genes cromossomais ou simbióticos (Mercante et al., 1998) são bastante úteis no levantamento da biodiversidade do rizóbio presente em determinado ecossistema, embora de limitado valor taxonômico. As técnicas de hibridização de ácidos nucleicos e de sequenciamento tem tido muita ênfase na sistemática bacteriana por revelarem relações naturais entre os diferentes níveis na hierarquia taxonômica, codificados no DNA (Bull et al., 1992).

4.2.1. Determinação da relação de bases do DNA (%G+C)

O estudo da composição de bases do DNA ainda é uma ferramenta útil e um modo rotineiro de distinguir entre estirpes fenotipicamente semelhantes mas geneticamente não relacionadas (Bull et al., 1992). Conforme já discutido, a composição de bases do DNA é parte dos padrões mínimos para a definição de gêneros e espécies (Wayne et al., 1987). É geralmente aceito que microrganismos mostrando diferenças em mais de 5% de guanina (G) mais citosina (C) não devem ser considerados da mesma espécie, e aqueles com mais de 10% de diferença no padrão G+C não devem ser classificados dentro do mesmo gênero (Bull et al., 1992). Outros autores consideram que as espécies já seriam distintas a partir de uma diferença de 3% em suas porcentagens de G+C (Stackebrandt & Liesack, 1993, citados por Vandamme et al., 1996). Esta percentagem varia entre 24 e 76% dentro das espécies bacterianas estudadas até o presente (Vandamme et al., 1996).

4.2.2. Homologia do DNA

A hibridização de ácidos nucleicos é considerada uma forma confiável de estabelecer o relacionamento entre diferentes espécies bacterianas, embora não seja uma metodologia suficientemente precisa, estando sujeita a várias restrições (Martínez-Romero, 1994; Vandamme et al., 1996). Classicamente uma espécie genômica, conforme destacado acima, engloba isolados com aproximadamente 70% ou mais de hibridização de DNA, embora o nível abaixo do qual um organismo é considerado como pertencente a outra espécie varie (Martínez-Romero, 1994). A hibridização DNA:rRNA também tem sido utilizada para determinar relacionamentos filogenéticos (Dreyfus et al., 1988; De Lajudie et al., 1994).

A principal razão para o uso da homologia de DNA como o critério principal na definição de espécies baseia-se no resultado de numerosos estudos onde um alto grau de correlação foi encontrado entre a similaridade do DNA e similaridade baseada em dados quimiotaxonômicos, genômicos, sorológicos e de análise fenética numérica (Stackebrandt & Goebel, 1994). Esta metodologia está baseada na descoberta inicial de que o DNA de fita simples de duas estirpes diferentes podem se reassociar até um determinado ponto mensurável e formar um DNA híbrido se as fitas contêm menos de 15% de bases não pareadas (Ullman & McCarthy, 1973). As medidas de 70% ou mais de similaridade se correlacionam com pequenas diferenças na estabilidade dos duplexes formados durante a reassociação (Johnson, 1985). A recomendação, acima citada, do comitê que dispõe sobre as metodologias recomendadas em sistemática bacteriana, propõe uma diferença de 5°C ou menos para indicar relacionamento a nível de espécie, valor baseado em centenas de experimentos de hibridização, utilizando diferentes metodologias (Schleifer &

Stackebrandt, 1983). Os cálculos originados destes dados indicam que isolados com 70% de homologia terão no mínimo 96% de identidade em suas seqüências, sendo assim, num genoma como o *Escherichia coli* que possui 5×10^6 pb, 2% de diferença significam 10^5 nucleotídeos. Isto poderia ser suficiente para gerar mudanças fenotípicas entre estirpes desta espécie, no entanto vem daí a importância da análise polifásica, uma vez que é muito pouco provável que estas diferenças venham a abranger a estrutura primária da maioria dos genes envolvidos num conjunto de características distintas.

Em alguns casos, a homologia de DNA não está de acordo com a filogenia determinada pelo sequenciamento do 16S rRNA. Fox et al. (1992), estudando o gênero *Bacillus*, por exemplo, verificaram que duas estirpes, pertencentes à espécies distintas, possuíam mais de 99,5% de similaridade em suas seqüências de 16S rDNA, podendo ser assim consideradas idênticas. No entanto, os dados de homologia de DNA indicam valores de homologia entre elas de 23 a 50%, muito baixos para que sejam consideradas como pertencentes à mesma espécie. Além disso, fenotipicamente as estirpes podem ser facilmente distinguíveis, podendo ser corretamente classificadas em espécies distintas. Neste caso, o critério baseado em taxonomia polifásica, onde é importante considerar os dados de sequenciamento, levanta um sério problema de definição de qual parâmetro deve ser considerado mais importante na definição da espécie. Num levantamento de dados de sequenciamento e de homologia de DNA de diversas bactérias estes autores observaram que, quando o nível de similaridade do 16S rRNA é de 99% ou mais, os dados de homologia de DNA podem ou não certificar a existência de espécies distintas. Há vários casos, dentro da mesma espécie, de alta similaridade da seqüência do 16S rRNA e baixos valores de homologia do DNA. No entanto o oposto não ocorre, ou seja, estirpes distintas no sequenciamento também o são pelos dados de homologia. Os autores sugerem que no contexto da nomenclatura atual, um solução seria estabelecer-se que a identidade das seqüências do 16S rRNA não implica na identidade das espécies, e organismos que sejam proximamente relacionados desta forma mas que não preencham o requisito de 70% de homologia de DNA possam ser considerados como diferentes subespécies. O problema com esta definição é que o valor de 70% de homologia foi baseado no que parece ser um razoável nível de variabilidade genética após extensiva caracterização de numerosos isolados. Sendo assim, quando se estabelece um critério baseado no 16S rRNA estaríamos permitindo níveis muito elevados de variabilidade genética para a definição de espécies em alguns casos.

A segunda alternativa, que seria considerar que os dados baseados no 16S rRNA não tenham relevância na definição de espécies, também não é apropriada. Isto é mais aparente no caso de 100% de identidade nas seqüências, onde certamente haverá homologia do DNA, sendo os isolados considerados como pertencentes à mesma espécie por ambos critérios. O problema surge quando há pequenas diferenças nas seqüências do 16S rRNA, nestes casos a homologia do DNA muitas vezes não faz uma distinção significativa. Tais estirpes, segundo estes autores, podem possuir níveis de homologia de até 30%, podendo ser classificadas como pertencentes ao mesmo "complexo de espécies de rRNA", cuja homologia não necessariamente deva exceder os 70%. Esta nomenclatura é aplicável à espécies que possuem alta probabilidade de pertencer à mesma espécie,

e os dados de sequenciamento servem para identificar estirpes que claramente não pertencem ao mesmo grupo. Por outro lado, estes dados nunca poderão estabelecer que o restante da variabilidade seja consistente com a existência de apenas uma espécie. De acordo com Stackebrandt & Goebel (1994), a análise do 16S rRNA é muito útil dentro da abordagem de taxonomia polifásica, e, a nível de espécie, é extremamente importante quando da decisão se será necessário ou não obter os laboriosos dados de homologia de DNA. De acordo com os dados compilados em literatura, organismos que possuam menos de 97% de homologia em suas seqüências do 16S rDNA não irão apresentar dados de reassociação do DNA maiores do que 60%, independentemente da metodologia utilizada (Stackebrandt & Goebel, 1994), não sendo provavelmente espécies relacionadas. Como conclusão, a presença ou ausência de coerência fenotípica deverá ser o fator decisivo se uma espécie deve ser descrita à níveis de homologia de DNA de 60 ou 80% (Stackebrandt & Goebel, 1994), ou mesmo a menos de 40% (Martínez-Romero, 1994).

Em rizóbio também ocorrem problemas de concordância dos dados de homologia de DNA com os de seqüenciamento do 16S rRNA, havendo casos de muito baixa homologia de DNA dentro da mesma espécie (Martínez-Romero, 1994). A explicação dada pelos autores é de que a hibridização do DNA envolve também o DNA presente em plasmídeos, que, no caso de algumas espécies de rizóbio, pode representar até 45% do genoma. Uma vez que este DNA extracromossomal provavelmente sofre mudanças muito mais rápidas do que o restante do genoma, este pode estar contribuindo para esta alta variabilidade, não congruente com os demais resultados de similaridade baseados em outros critérios (Martínez-Romero, 1994).

Os estudos de homologia do DNA, no consenso das diversas discussões levantadas pelos diferentes taxonomistas, com todas as suas restrições metodológicas e dependência de uma série de parâmetros físico-químicos (Vandamme et al., 1996) ainda é considerado o método mais apropriado no delineamento de espécies e medidas de relações interespecíficas, apesar do desenvolvimento dos métodos moleculares atuais. Devido às restrições acima levantadas, o sequenciamento do 16S rRNA ainda não se constitui num substituto à altura, embora seja um auxiliar importante e cada vez mais utilizado pela sua rapidez e reproducibilidade.

4.2.3. Polimorfismo nos fragmentos de restrição do DNA (RFLP)

A análise do DNA cromossomal de dois ou mais organismos após o corte com diferentes enzimas de restrição, gera um padrão de polimorfismo nos fragmentos obtidos, metodologia denominada RFLP, que tem sido amplamente utilizada em estudos de diversidade. O polimorfismo pode ser evidenciado por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas (sondas) com radioatividade ou com compostos que desencadeiam reações de luminescência ou coloração. Em rizóbio, sondas baseadas em diferentes genes, tanto ligados a características simbióticas (*nod*, *fix*) ou não simbióticas (operons do rRNA e outras), tem sido utilizadas para detectar polimorfismos, utilizando diferentes metodologias de marcação e detecção. Estas metodologias combinadas tem sido utilizadas para a caracterização da diversidade entre diferentes populações de rizóbio (Young & Wexler, 1988; Kaijalainen & Lindström, 1989; Eardly et al.,

1990; Demezas et al., 1991; Kuykendall et al., 1991; Laguerre et al., 1992; van Berkum et al., 1993; Thomas et al., 1994; Urtz & Elkan, 1996; Paffetti et al., 1996). É uma metodologia relativamente trabalhosa, exigindo diversas etapas de preparo do DNA, hibridização e detecção das bandas polimórficas. Além disso as enzimas de restrição são reagentes caros, sendo o método pouco adequado aos estudos de diversidade, exceto com fins taxonômicos, ou como método de referência para avaliar a validade das demais metodologias, uma vez que reflete a variabilidade do genoma total.

A técnica pode ser também utilizada para evidenciar polimorfismos resultantes do corte do DNA genômico com enzimas de restrição de corte raro (6 a 8 pb) gerando fragmentos de DNA grandes, cuja separação em gel só é possível pelo uso da técnica de eletroforese usando campo de pulso elétrico alternado (pulsed-field electrophoresis) (Corich et al., 1991; Sobral et al., 1991; Haukka & Lindström, 1994).

4.2.4. Estudos baseados no DNA ribossomal

Os ribossomos procarióticos consistem de três moléculas de RNA (5S, 16S e 23S) de diferentes tamanhos e cerca de 50 proteínas ribossomais. A molécula do 16S rRNA contém cerca de 1.540 resíduos de nucleotídeos e forma, juntamente com aproximadamente 20 proteínas, a subunidade menor, 30S (SSU); a molécula do 23S rRNA (2.900 resíduos de nucleotídeos), juntamente com a do 5S rRNA (120 nucleotídeos) e aproximadamente 20 proteínas formam a subunidade maior, 50S. Estas duas subunidades juntas formam o ribossomo 70S funcional, que catalisa a síntese proteica. Os genes que codificam para o rRNA (operons do rRNA - *rrn*) tem sido extensivamente estudados para muitas espécies bacterianas, sendo que o número de operons varia de uma (em micoplasmas) a doze cópias (em bacilos) por cromossomo (Rosado et al., 1997). Em rizóbio, uma a três cópias tem sido detectadas: uma em *B. japonicum* e em *R. tropici*, três em *S. meliloti*, *R. galegae*, *R. leguminosarum* e *R. etli* (Haukka, 1997). Assim como outros genes que ocorrem em múltiplas cópias no genoma, os genes ribossomais estão sujeitos a um processo de homogeneização o que significa que todas as cópias tendem a ser similares umas às outras. No entanto, recentes estudos tem detectado que pequenas variações podem existir entre as cópias destes genes, sendo relatadas a presença de variações alélicas, ou microheterogeneidade, entre os genes do 16S de várias espécies bacterianas, inclusive rizóbio (Haukka et al., 1996). Neste caso, mais uma vez fica o questionamento sobre o uso dos dados de sequenciamento do 16S rRNA quando da separação de espécies muito proximamente relacionadas. Neste limite, a quantidade de seqüências úteis diminui, e a ocorrência de transferência horizontal e recombinação genética entre estas cópias heterogêneas interrompem o padrão filogenético (Haukka et al., 1996).

Vale a pena ressaltar a sugestão colocada por Vandamme & Ludwig (1994, citados por Vandamme et al., 1996), de se escolher grupos de isolados semelhantes e não apenas a estirpe referência, nos estudos filogenéticos, de modo a obter árvores filogenéticas mais confiáveis. Os autores destacam que é importante não restringir a análise aos taxons mais proximamente

relacionados, mas incluir grupos de organismos aparentemente não relacionados. Estes procedimentos diminuem o efeito de pequenas diferenças características de estirpe e não da espécie.

As moléculas das diferentes espécies de rRNA são particularmente importantes nos estudos de ecologia microbiana, sendo que são consideradas cronômetros moleculares nos estudos de evolução, pois preenchem todos os requisitos que definem um marcador filogenético (Rosado et al., 1997): (1) os rRNA's estão presentes e tem a mesma função em todos os microrganismos; (2) eles se originaram de um ancestral comum, portanto são homólogos; (3) suas seqüências de nucleotídeos são altamente conservadas em algumas regiões e possuem regiões variáveis; (4) as moléculas do 16S e 23S rRNA são relativamente grandes e contém suficiente seqüências informativas para permitir comparações estatisticamente significativas; (5) a estrutura primária destas moléculas possui sítios de evolução independente, conseqüentemente contém suficiente regiões variáveis para permitir a discriminação entre diferentes moléculas; (6) um grande número de seqüências está disponível via base de dados pela internet, permitindo o alinhamento de seqüências e a identificação das regiões distintas. O fato destas moléculas possuírem sítios de rápida e outros de lenta evolução, permite que se avalie as relações filogenéticas tanto entre organismos muito proximamente relacionados quanto entre os filogeneticamente muito distantes.

A caracterização da seqüência do 16S rRNA tem sido amplamente utilizada em estudos evolucionários, taxonômicos e ecológicos, não apenas para definir taxas mas também para detectar quais taxas estão presentes (Fox et al., 1992; Olsen et al., 1994). A amplificação direta via PCR do 16s rRNA a partir de amostras de solo tornou possível o estudo da diversidade microbiana sem a necessidade de cultivar o microrganismo (Ward et al., 1990). Comparações entre as seqüências de nucleotídeos completas ou parciais do 16S rRNA tem sido amplamente utilizadas para avaliar relações filogenéticas entre muitas espécies de *Rhizobium* (Jarvis et al., 1992; Laguerre et al. 1993; Lucas et al., 1995; van Berkum et al., 1996; Barrera et al., 1997).

As moléculas do 23S rRNA são bem maiores do que as do 16S rRNA, contendo mais informação genética o que pode ser muito útil em estudos filogenéticos (Ludwig et al., 1992), embora o banco de dados de 23S ainda seja bem mais restrito, dificultando a comparação de novas seqüências. Tesfaye et al. (1997) amplificaram por PCR uma região hipervariável do 23S rDNA de *Rhizobium* e determinaram as relações filogenéticas entre várias estirpes através da comparação entre suas seqüências de nucleotídeos. As variações nas seqüências do 23S rDNA estudadas foram consistentes com as relação filogenéticas determinadas pela especificidade na nodulação de diferentes hospedeiras e/ou análise das seqüências do 16S rDNA. Neste estudo os autores distinguíram entre estirpes de *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Bradyrhizobium*, sendo que os taxons representados por *R. leguminosarum* bv *trifolii*, *R. meliloti* e *R. etli* foram claramente mais relacionados uns aos outros do que à s estirpes de *B. japonicum*, consistente com a teoria de origem evolucionária distinta ou divergência ancestral destes dois gêneros (Sprent, 1994). Além disso, através da análise da estrutura secundária da molécula do 23S rDNA, os autores detectaram seqüências variáveis nas regiões chamadas de D (hélices 55-59, numeração em *E. coli*) e E (hélice 63), as quais podem servir para diferenciar espécies particulares e/ou estirpes por apresentarem

características distintas. Sondas específicas para estas regiões podem ser desenhadas e usadas como ferramenta para análise de populações de *Rhizobium* no campo.

A estrutura primária da molécula do 16S rRNA é altamente conservada, e espécies que possuem 70% ou mais de homologia do DNA, usualmente possuem mais de 97% de identidade em suas seqüências. Esta diferença de 3% ou 45 nucleotídeos, não está distribuída ao acaso ao longo da estrutura primária da molécula, mas está concentrada principalmente nas chamadas regiões hipervariáveis (Stackebrandt & Goebel, 1994). Alguns autores defendem o estudo das diferenças em similaridade apenas nestas regiões como medida da distância filogenética entre estirpes. No entanto há vários argumentos contrários a esta escolha uma vez que a quantidade de nucleotídeos diferentes não concentrados nestas regiões é substancial (Stackebrandt et al., 1992) e por omissão se poderia perder informações que, em termos estatísticos, já são bastante escassas. Em segundo lugar, as regiões hipervariáveis são específicas de cada taxon, e precisam ser determinadas para cada novo organismo pelo sequenciamento completo da molécula. A análise de seqüências muito curtas tem uma influência negativa na estabilidade da árvore filogenética, mas se, devido alguma limitação, o número de nucleotídeos a ser analisado tiver que ser reduzido a algumas centenas, deve-se tomar muito cuidado ao escolher a região a ser analisada de modo a obter o mesmo grau de similaridade dado pelo completo sequenciamento da molécula. Stackebrandt & Goebel (1994) mostram uma tabela onde os valores de similaridade obtidos em determinadas seqüências podem apresentar até 10 pontos percentuais de diferença em relação ao grau de similaridade obtido pelo sequenciamento total. No entanto a seleção prévia criteriosa de seqüências menores adequadas facilita o trabalho de sequenciamento, sendo que, em rizóbio, uma região de 260pb do 16S rDNA, amplificada pelos primers Y1 e Y2 (Young et al., 1991) tem sido bastante útil nos trabalhos de diversidade (Oyaizu et al., 1992; Haukka et al., 1996), por conter uma parte relativamente variável da molécula, com alta densidade de informações. O uso desta região amplificada nos trabalhos de sequenciamento permitiu determinar com um bom nível de precisão as relações filogenéticas entre as diferentes espécies (Eardly et al., 1992; Jarvis et al., 1992, Laguerre et al., 1993; Lucas et al., 1995). No entanto, em *R. galegae*, diferentes posições filogenéticas foram obtidas com as seqüências parciais ou com a seqüência total do 16S rRNA (Nour et al., 1994; Willems & Collins, 1993). Esta inconsistência pode ser atribuída à natureza altamente conservada das seqüências da subunidade menor aliada a eventos de recombinação entre genes divergentes (Eardly et al., 1996).

Os genes ribossomais de algumas espécies ou estirpes contêm os chamados elementos de inserção (IVS – intervening sequence), principalmente nos genes que codificam para o 23S rRNA, sendo a ocorrência destes IVS restritos à determinadas regiões desta molécula (Haukka, 1997). A presença de duas IVS (IVS I e IVS II) foram detectadas em rizóbio, e a possibilidade de utilização destas seqüências em estudos ecológicos, através do desenho de primers específicos é bastante promissora (Selenska-Pobell & Evgenieva-Hackenberg, 1995; Selenska-Pobell et al., 1997). Uma seqüência de inserção de 72 nucleotídeos foi encontrada pela primeira vez nos genes do 16S rRNA em *R. tropici* (Willems & Collins, 1993). A diferença no tamanho do gene provocada por esta inserção serve para o reconhecimento de estirpes diferentes após a amplificação por PCR da região que a contém e análise em gel de agarose (Linton et al., 1994).

Young & Haukka (1996) destacam diversas limitações no uso da subunidade menor do rRNA (SSU rRNA) em estudos filogenéticos e taxonômicos. A primeira delas seria a ocorrência de recombinação dos genes ribossomais entre espécies diferentes o que afeta uma das condições necessárias para o estabelecimento de filogenias, que é a inexistência de transferência genética interespecífica nesta região, o que garante a evolução independente das diferentes linhagens. Outro tipo de recombinação, entre os genes do 16S rRNA e outros genes, foi verificada em *Rhizobium leguminosarum* e *R. etli* por Eardly et al. (1995) onde diferenças significativas no sequenciamento da molécula do 16S rDNA não refletem necessariamente grandes divergências no genoma total, avaliado por MLEE (multilocus enzyme electrophoresis – análise de isoenzimas). Como o 16S rRNA é uma molécula altamente conservada, não é útil para discriminar espécies muito proximamente relacionadas, onde pode haver uma identidade de seqüências, especialmente no sequenciamento parcial. Os autores destacam ainda o problema da heterogeneidade nas seqüências entre espécies e mesmo dentro de uma mesma espécie. Isto tem se tornado cada vez mais evidente a medida que outros isolados além das estirpes padrão vão sendo sequenciados, ou mesmo vários isolados de uma mesma estirpe. Finalmente, um problema técnico foi verificado no uso desta metodologia, que é a detecção de alguns erros em seqüências presentes na base de dados do EMBL, provocados por uma série de fatores listados por Vandamme et al. (1996).

Apesar de todas estas limitações, o desenvolvimento dos métodos rápidos de PCR e sequenciamento tem consolidado o papel dos genes ribossomais na filogenia bacteriana. Os genes que codificam para o 16S rRNA são os mais populares nestes estudos, devido ao seu tamanho adequado para as análises de sequenciamento. Além disso há um extensivo o banco de dados disponível para comparações usando a molécula do 16S é bem maior do que para a 23S. Segundo Young & Haukka (1996), as filogenias baseadas no 16s rRNA são de modo geral corretas, embora não em todos os detalhes. Muitos trabalhos tem mostrado a utilidade das informações provenientes do sequenciamento do RNA além dos estudos filogenéticos (Young et al., 1991; Eardly et al., 1992; Laguerre et al., 1993; Segovia et al., 1993; Willems & Collins, 1993), no desenho de sondas e “primers” que podem ser específicos a nível de gênero, espécie ou mesmo estirpe (Ludwig & Scleifer, 1994; Kirchhof et al., 1996; Tesfaye et al., 1997). Mesmo se considerados as limitações, esta metodologia, de modo geral, confirma os resultados obtidos por uma série de outras abordagens, inclusive de taxonomia polifásica com um grande número de estirpes (Vandamme et al., 1996), e seu valor parece inquestionável.

4.2.5. A reação de polimerase em cadeia

Um parêntesis é apropriado para enfatizar a importância da tecnologia da reação da polimerase em cadeia (PCR – Polymerase Chain Reaction) nos diferentes estudos de ecologia e sistemática bacteriana. Poucas tecnologias nos últimos anos provocaram um impacto tão profundo na biotecnologia quanto o PCR, inicialmente descrito por Mullis & Faloona (1987). A técnica do PCR baseia-se na repetição cíclica da extensão enzimática de “primers” (iniciadores). Estes “primers”,

pequenas seqüências de DNA, anelam-se em dois extremos opostos da fita de DNA que serve como molde e a amplificação envolve repetições cíclicas de altas temperaturas necessárias para a denaturação do DNA (usualmente 94°C), seguidas de uma temperatura mais baixa para possibilitar o anelamento dos “primers” (entre 37 e 60°C) e uma temperatura intermediária que permita a extensão da cópia da fita de DNA a partir do ponto de anelamento dos “primers”. Esta técnica, resumidamente, resulta na amplificação enzimática *in vitro* de uma seqüência alvo de DNA.

A relativa simplicidade da tecnologia mudou radicalmente a forma de se fazer genética e biologia molecular comparada com alguns anos atrás. O próprio autor da metodologia, ao descrever o processo de sua invenção, espanta-se de o método não ter sido anteriormente descoberto, mesmo cerca de 15 anos depois de todos os elementos necessários para sua implementação (Taq polimerase, disponibilidade de dNTP's, etc) estarem disponíveis (Mullis, 1990). O impacto do PCR é fácil de compreender uma vez que a técnica se aplica a um dos problemas fundamentais em biotecnologia que é a busca de seqüências gênicas de interesse. Ao se procurar uma simples seqüência gênica, de, digamos, 1.000 nucleotídeos entre cerca de 100.000 genes em um genoma de aproximadamente 3 bilhões de nucleotídeos, mesmo uma quantidade em torno de 3 *ug* de DNA poderá conter apenas uma cópia desta seqüência ou gene. Ou seja, ela estará altamente diluída e misturada com um grande número de moléculas com propriedades físico-químicas semelhantes, o que torna virtualmente impossível a obtenção de grandes quantidades da molécula de interesse purificada pelos procedimentos padrões de separação. Antes do advento do PCR, a clonagem molecular era a única alternativa para superar estas dificuldades. Este procedimento requer a construção de vetores e sondas por uma série de etapas demoradas, incluindo a restrição do DNA, ligação a vetores, transformação bacteriana, cultivo e plaqueamento seguido de detecção dos clones, usualmente através de sondas, isto sem citar as etapas de subclonagem, etc. Com o PCR, após cerca de 30 ciclos de amplificação e menos de 2 horas, a quantidade de DNA alvo é aumentada milhares de vezes, e, após a separação dos produtos por eletroforese em gel e coloração adequada, estes podem ser visualizados a olho nu. Pode-se então proceder diversos tipos de manipulação deste DNA dependendo do tipo de problema a ser resolvido, tendo sido já ressaltada sua importância nos estudos de sequenciamento, os quais antigamente dependiam destas trabalhosas etapas de clonagem. Felice & Alshinawi (1996) apresentam uma descrição simplificada dos princípios, componentes e aplicações desta tecnologia, sendo que mais detalhes podem ser encontrados em diversos livros como o de Innis et al. (1990).

Em estudos de diversidade de microorganismos a técnica de PCR é utilizada em várias metodologias como a análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA – Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis), polimorfismo dos espaçadores (IGS – intergene sequences) do DNA ribossômico, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), PCR-SSCP (Single-Strand-Conformation Polymorphism), PCR de seqüências repetitivas de DNA (rep-PCR usando primers REP, ERIC ou BOX), PCR com primers randômicos (RAPD, AP-PCR) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Algumas destas técnicas serão descritas a seguir conforme sua importância nos estudos de diversidade de rizóbio.

4.2.5.1. Técnicas de “fingerprinting” do DNA baseadas em PCR:

A mais divulgada delas é a técnica de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), que consiste na amplificação do DNA utilizando primers randômicos, que envolve o uso de um primer geralmente composto de 10 nucleotídeos, a baixa temperatura de anelamento (36°C). Os produtos são diretamente analisados em um gel de agarose colorido com brometo de etídio (Williams et al., 1990). A técnica de AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction), envolve o uso de primers mais longos, de 20 a 34 nucleotídeos de comprimento em reações de anelamento a baixa temperatura, seguidas de reações à altas temperaturas de anelamento (60°C). Os produtos do AP-PCR são marcados com ^{32}P nos últimos ciclos de reação, submetidos a eletroforese e visualizados por autoradiografia (Welsh & McClelland, 1990). Estas técnicas envolvem a amplificação de regiões desconhecidas do DNA genômico com primers arbitrariamente construídos, produzindo padrões complexos de bandas que “identificam” o organismo. Estes estudos não requerem que se conheça previamente as seqüências do organismo a ser estudado. Em rizóbio estas técnicas foram utilizadas nos estudos de diversidade por Harrison et al. (1992); Dooley et al. (1993); Kay et al. (1994); Leung et al. (1994); van Rossum et al. (1995); Richardson et al. (1995), Selenska-Pobell et al. (1996); Paffetti et al. (1996); Sá et al. (1997). Harrison et al. (1992) foi o primeiro a utilizar o método de RAPD para caracterizar estirpes de *R. leguminosarum*. Estes autores testaram 21 primers buscando discriminar diferentes isolados desta espécie, sendo que um deles (SPH1) foi suficiente para discriminar 11 entre 12 isolados. Este primer foi posteriormente utilizado para caracterização de estirpes de *R. meliloti* e *Bradyrhizobium* (Dooley et al., 1993; van Rossum et al., 1995). Há uma boa correlação entre os dados de relacionamento genético obtidos entre diferentes estirpes por MLEE e por RAPD (Leung et al., 1994).

A análise combinada de seqüências de rRNA amplificadas por PCR e digeridas a seguir com enzimas de restrição de corte freqüente (sítios de 4 pb) gerando padrões de RFLP's tem sido extensivamente utilizada nos estudos de diversidade de rizóbio, metodologia que passou a ser denominada ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado). Esta técnica foi inicialmente utilizada por Laguerre et al. (1994) sendo que a topologia das árvores filogenéticas obtidas por mapeamento dos sítios de restrição e por alinhamento de seqüências apresentam-se muito bem relacionadas, mostrando que o método é uma ferramenta poderosa para a estimativa rápida de relações filogenéticas (Lindström et al., 1998). Esta metodologia foi aprimorada através da construção de uma base de dados de sítios de restrição nos genes que codificam para o 16S rDNA na família *Rhizobiaceae* (Laguerre et al., 1997). A análise dos mapas dos sítios de restrição (MRSP) do 16S rRNA é mais confiável porque elimina o problema do escore de fragmentos de restrição de tamanho similar mas que correspondam a diferentes sítios de restrição. Vinuesa et al. (1998) utilizou esta metodologia para a caracterização de isolados de *Bradyrhizobium* que nodulam diversas leguminosas arbóreas.

Uma modificação desta técnica consiste na análise da região espaçadora intergênica (IGS) do operon 16S-23S. Esta região foi amplificada em rizóbio, utilizando primers específicos, gerando um fragmento de cerca de 1.350 pb, digerido a seguir com enzimas de restrição (Nour et al., 1994;

Paffetti et al., 1996). Jensen et al. (1993) estudaram, através desta metodologia, cerca de 300 estirpes pertencentes à diferentes gêneros de bactérias concluindo que o nível de variabilidade obtido na análise de restrição do IGS não é suficiente para discriminação intraespecífica. Os resultados obtidos por Paffetti et al. (1996) em uma população de 96 isolados de *R. meliloti*, também revelaram um baixo nível de polimorfismo havendo um elevado grau de homogeneidade no tamanho das bandas amplificadas, tendo sido detectados três padrões distintos de restrição do IGS. Já Vinuesa et al. (1998) num estudo envolvendo 9 isolados de leguminosas arbóreas e diversas estirpes de referência, observaram que a análise de agrupamento dos RFLP's obtidos do IGS com três enzimas de restrição revelaram 6 agrupamentos distintos, enquanto que por ARDRA com 4 enzimas apenas 3 haviam sido detectados. Neste estudo os autores procederam uma análise conjunta dos dados provenientes da análise restrição do IGS e do 16S rDNA, uma vez que estas se constituem em regiões genômicas contíguas. A partir desta análise foi possível obter um agrupamento de consenso, dividindo as estirpes nos mesmos 6 genótipos distintos definidos pela análise do IGS, mas em concordância com os resultados de ARDRA.

Os métodos de REP-PCR (repetitive extragenic palindromic sequences – PCR), ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus – PCR) e BOX-PCR baseiam-se na amplificação de seqüências repetitivas (rep-elements) no genoma bacteriano (Versalovic et al., 1994). Estas três famílias de seqüências repetitivas tem sido estudadas em maiores detalhes, correspondendo a 35-40 pb na seqüência REP; 124-127 pb para a ERIC e 154 pb no elemento BOX, o qual consiste de três subunidades (boxA, boxB e boxC). Quando um destes elementos repetitivos é detectado dentro de uma distância amplificável durante a reação de polimerase em cadeia, um produto de PCR de tamanho característico é gerado, de modo que o genoma pode gerar um padrão do tipo impressão digital (fingerprinting) em um gel. Maiores detalhes sobre a metodologia e referências originais podem ser encontrados em Versalovic et al. (1994). O método é uma poderosa ferramenta para estudar a diversidade genética intraespecífica e a nível de estirpe, fornecendo uma análise complementar à caracterização prévia por outras metodologias. A análise da impressão digital gerada a partir de genomas distintos tem sido usada para separação de estirpes muito proximamente relacionadas de *B. japonicum* (Judd et al., 1993; Vinuesa et al., 1998), *R. tropici* (van Berkum et al., 1994), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Leung et al., 1994), *R. galegae* (Selenska-Pobell et al., 1995) e *R. meliloti* (de Bruijn, 1992; Rossbach et al., 1995). Estas metodologias foram utilizadas por Laguerre et al. (1997) para detectar um maior nível de polimorfismo entre tipos genômicos separados pela análise de restrição do 16S rDNA. Neste trabalho, 44 isolados de rizóbio de *Astragalus*, *Oxytropis* e *Onobrychis* analisados foram distribuídos em 14 tipos baseados no 16S rRNA e em 34 grupos REP, utilizando primers para REP e ERIC, confirmando sua alta capacidade para detectar heterogeneidade genética. Os padrões específicos obtidos para cada estirpe podem ser armazenados em uma base de dados e analisados usando programas específicos para comparação, tais como GELCOMPAR (Schneider & Bruijn, 1996) ou PRO-SCORE (DNA Proscan, Inc., Nashville, Tenn.). Niemann et al. (1997) num estudo comparativo do poder de resolução dos métodos de RAPD e ERIC para discriminar isolados de *R. meliloti*, procederam a análise das “impressões digitais” geradas pelas diferentes estirpes através de um sequenciador automatizado a laser fluorescente (ALF-DNA

sequencer). Segundo os autores, não houve influência do uso de primers marcados com fluoresceína nas reações de RAPD ou ERIC, permitindo o arquivo e processamento “on-line” dos padrões de PCR gerados, representando um avanço no uso da técnica. Além disso, a reproducibilidade dos padrões obtidos através desta estratégia, que antes era uma limitação da técnica, é sensivelmente aumentada. Os resultados deste teste comparativo indicaram que, embora ambos métodos sejam adequados para revelar o relacionamento genético entre estirpes proximamente relacionadas, a técnica de RAPD-PCR é levemente mais discriminatória do que a de ERIC-PCR. Isto pode ser explicado pelas menores chances de os primers arbitrários de RAPD ligarem-se à seqüências conservadas (ERIC) das diferentes estirpes. Como desvantagem, o método de RAPD exige o teste com um grande número de primers para gerar o nível de polimorfismo necessário de modo a obter um alto poder discriminatório, ou seja, é mais laborioso que ERIC. No entanto, o maior poder de resolução foi dado pelos padrões de RFLP gerados pela hibridização do DNA com uma sonda contendo uma seqüência de inserção (IS), o qual foi utilizado como um método de referência para fins comparativos, apesar de pouco adequado à análise de grande número de isolados.

Outras técnicas tem sido publicadas utilizando a técnica de PCR na detecção e identificação de estirpes de rizóbio. Hartmann et al. (1996) descreve uma metodologia baseada na amplificação específica da seqüência $RS\alpha$, estruturalmente semelhantes à seqüências de inserção (IS). Esta seqüência, que ocorre em múltiplas cópias no genoma, consiste de um fragmento de DNA de 1.195 pb, originalmente isolada de *B. japonicum* (Hahn & Henecke, 1987). O número de cópias em alguns isolados de *B. japonicum* pode ser extremamente elevado, variando de 86 a 175, sendo que estes isolados não apresentaram diferenças em suas propriedades simbióticas, embora apresentem crescimento mais lento (Minasawa et al., 1998). A amplificação desta seqüência foi utilizada para a identificação de estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* (Hartmann et al, 1992; Hartmann et al., 1996), mostrando alta especificidade para estas espécies quando testada contra treze espécies de rizóbio e duas de *Agrobacterium* (Hartmann et al., 1996). Primers específicos foram desenhados para esta seqüência, podendo a análise de diversidade ser efetuada através da amplificação direta por PCR ou por hibridização de colônias com sondas de $RS\alpha$ (Hartmann et al., 1996). Ambos métodos se mostraram eficientes e podem ser utilizados por exemplo no controle de qualidade de inoculantes ou em estudos ecológicos, substituindo os métodos sorológicos (Hartmann et al., 1996).

Laguerre et al. (1996) comparou o poder de resolução e limitações de algumas técnicas de “fingerprinting” do DNA baseadas em PCR para caracterizar e classificar estirpes de diferentes biovares de *R. leguminosarum*. As técnicas utilizadas foram: RFLP da seqüência espaçadora intergênica do rDNA (16S-23S rDNA IGS sequences) amplificada por PCR, análise por PCR das seqüências repetitivas (REP-PCR) e RAPD. Estas foram comparadas com as técnicas convencionais de análise de RFLP de DNA hibridizados com sondas para regiões cromossômicas e de genes ligados à características simbióticas (*nod* e *nif*). Os métodos mais rápidos e com maior poder discriminatório foram os baseados em “fingerprinting” do DNA baseado em PCR. Estes refletiram a variabilidade a nível de cromossomo, mas não a variabilidade das regiões simbióticas nas espécies e biovares de *R. leguminosarum* (vide o tópico Considerações Finais). Os padrões gerados pelos primers REP e RAPD, conforme já discutido, geram padrões complexos de bandas de intensidade

variável, que dificultam a estimativa quantitativa do relacionamento genético entre as diferentes estirpes. Além disso são métodos que ainda apresentam baixa reprodutibilidade em diferentes condições laboratoriais e dificultando a comparação dos dados entre os diferentes laboratórios. No entanto, apesar destas limitações, estes métodos simples são um meio eficiente de proceder a caracterização de um grande número de isolados em condições experimentais bem padronizadas. A análise da região IGS mostrou um poder discriminatório suficiente para agrupar estirpes cromossomicamente relacionadas com base num padrão simples, reproduzível e facilmente analisável de bandas de restrição. No entanto, limitações como variabilidade no tamanho desta seqüência, tanto entre espécies como entre genótipos distintos e a presença de inserções de vários genes de tRNA nestas regiões foram levantadas pelos autores. Conforme destacado acima, quando se considera outros gêneros de rizóbio, o poder de discriminação intraespecífica baseado em RFLP de seqüências IGS pode ser extremamente baixo (Jensen et al., 1993; Paffetti et al., 1996). Como conclusão, pelo menos para *R. leguminosarum* e seus biovars, os autores consideram que os métodos avaliados mostraram um bom nível de concordância com os métodos de classificação genotípica convencionais baseados na análise de restrição do DNA, sendo uma alternativa conveniente à estes métodos, com a mesma faixa de resolução e a mesma possibilidade de caracterizar o genoma total ou regiões específicas. Como são muito menos demorados, evitando os procedimentos de extração e hibridização do DNA, são mais adequados para a identificação em larga escala de coleções bacterianas e para o estudo de grandes populações a nível intraespecífico.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

“Em bactérias, a reprodução e a troca de genes cromossomais são funções distintas e independentes, não vinculadas em um único processo como nas plantas e animais. Sendo assim, toda a reprodução em bactérias é assexual e toda a troca gênica é devido a outros processo que não a recombinação recíproca” (Dykhuizen & Green, 1991). A natureza clonal da estrutura de populações em *E. coli*, tornou-se um paradigma para todos as populações bacterianas (Gordon et al., 1995). Formou-se um consenso geral de que não ocorre uma recombinação extensiva dentro do cromossoma do *Rhizobium*; conseqüentemente estas bactérias se comportariam como clones, apresentando ligação gênica entre os diferentes marcadores moleculares (Piñero et al., 1988; Souza et al., 1992). Sendo assim seria suficiente fazer um levantamento da ocorrência de regiões gênicas específicas, características da espécie, para se ter uma noção do genoma completo (Martínez-Romero, 1994). No entanto com o objetivo de avaliar a estrutura genética das populações de rizóbio, Gordon et al. (1995) analisou dados MLEE em *R. meliloti* e em *R. leguminosarum* bv. *viciae* e outros dados de diversos autores, chegando à conclusão que o paradigma da estrutura clonal não é sempre verdadeiro em rizóbio. Em *R. etli* bv. *phaseoli*, Souza et al. (1994) encontraram valores baixos de desequilíbrio de ligação em três populações distintas, sugerindo a presença de forças evolucionárias mantendo um número grande de genótipos recombinantes. Houve ainda distinção entre o nível de diversidade encontrado em populações de feijoeiro selvagem e nas espécies cultivadas. A conclusão

é de que dentro do gênero *Rhizobium*, espécies distintas possuem diferentes níveis de recombinação genética de modo que algumas espécies ou biovars podem possuir uma estrutura de populações panmítica, outras tem estrutura aproximadamente clonal. Estas evidências sugerem que deve ser tomado bastante cuidado na seleção dos marcadores moleculares a serem utilizados nos estudos populacionais em rizóbio.

O potencial de transferência lateral de genes ligados a especificidade hospedeira e patogenicidade é outra consideração particularmente importante na classificação e análise filogenética de bactérias do solo associadas à plantas. Por exemplo, em experimentos de hibridização, Courier & Nester (1976) encontraram que os padrões de homologia de plasmídeos ligados à indução de tumores em 15 estirpes de *Agrobacterium* não estavam correlacionados com os seus padrões de homologia do cromossomo. Em rizóbio, Kaijalainen & Lindström (1989) estudaram o padrão de RFLP's para isolados de *R. galegae*, tentando correlacionar a divergência taxonômica com o isolamento geográfico das estirpes. Esta espécie nodula duas espécies de leguminosas, *Galega officinalis* e *Galega orientalis*. Quando foram utilizadas sondas obtidas a partir de genes associados com os atributos específicos da fixação de nitrogênio (genes *nod*, comuns da nodulação, e *nif*, fixação de nitrogênio) os padrões de restrição mostraram alta especificidade hospedeira, e pouca correlação geográfica. No entanto, quando os RFLP's eram comparados utilizando sondas não associadas a estes atributos, muitos agrupamentos de isolados distintos foram obtidos. Neste caso quatro estirpes isoladas de *G. officinalis* foram mais relacionadas aos isolados de *G. orientalis*. Como os genes ligados aos atributos de fixação de nitrogênio em *Rhizobium* estão codificados em plasmídeos, os chamados plasmídeos simbióticos, transmissíveis entre as diferentes espécies (Young & Wexler, 1988; Geniaux & Amarger, 1993), esta troca genética mascara os dados de similaridade, que podem ser distintos ao nível de genes não envolvidos na simbiose (Laguerre et al., 1992). Neste caso, a falta de correlação geográfica dos padrões de RFLP's observados são aparentemente uma consequência direta da transferência de seqüências simbióticas entre duas populações geograficamente distintas de bactérias. O mesmo parece ter ocorrido no caso de *R. etli*-*R. leguminosarum* (Segovia et al., 1993) discutido no item 3. Em estudos anteriores baseados na análise de MLEE de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, Piñero et al. (1988) chegaram a conclusão de que este biovar, definido em função da especificidade hospedeira, é um reunião de estirpes polifiléticas, geneticamente heterogêneas, chegando a compor 11 espécies evolucionárias. Torna-se evidente diante destes estudos que os trabalhos essencialmente baseados em características fenotípicas codificadas por plasmídeos resultam em esquemas de classificação artificiais. Consequentemente, os autores sugerem que uma classificação mais adequada de *Rhizobium* spp deve ser baseada na variação alélica dos genes cromossomais mais do que em características simbióticas codificadas por plasmídeos, evidência levantada também por Eardly et al. (1990) estudando a estrutura genética de populações de *R. meliloti*.

Parece grande a complexidade dos relacionamentos entre as diferentes espécies quando se considera características codificadas por plasmídeos em comparação com os dados de sequenciamento do 16S rRNA. Haukka et al. (1998) estudaram a diversidade e filogenia dos genes *nodA* e *nifH* em 52 isolados de rizóbio de *Acacia senegal* e *Prosopis chilensis*. Estes isolados,

procedentes de duas origens distintas, África e América Latina, possuíam círculo de hospedeiras similar e estavam classificados como pertencentes aos gêneros *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* através da análise das seqüências do 16S rRNA. Neste estudo, de acordo com os diferentes níveis hierárquicos, fatores distintos influenciaram a evolução dos genes ligados a características simbióticas em comparação com a filogenia determinada pelo 16S rRNA. Apenas no mais alto nível hierárquico analisado, as filogenias dos genes *nifH* e do 16S rRNA mostraram-se similares, por exemplo, as seqüências *nifH* entre as espécies da subdivisão gama e alfa de *Proteobacteria* mostraram-se bastante distintas. Os padrões de restrição dos genes simbióticos dividiram as estirpes em três grupos distintos, sinorizóbio de origem africana, sinorizóbio de origem latina e um último grupo envolvendo os mesorizóbios de ambas origens. Dentro de um grande grupo de sinorizóbio de origem africana, tipos semelhantes de genes simbióticos foram encontrados em diferentes espécies, sugerindo a transferência genética destes genes através dos limites espécie-específicos. No último nível hierárquico analisado, a nível de estirpe, várias combinações entre os tipos *nod* e *nif* foram encontradas em diferentes “backgrounds” de 16S rRNA.

A questão dos plasmídeos simbióticos tem um papel crítico na evolução das populações de *Rhizobium*, os quais tem uma história evolucionária diferente da história evolucionária das estirpes que os contém (Young & Haukka, 1996).

Na falta de métodos para rapidamente determinar o relacionamento genético entre um grande número de estirpes, as espécies de *Rhizobium* e de outras bactérias do solo associadas à plantas (p. ex. *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*) tem sido tradicionalmente definidas com base em características fenotípicas, tais com círculo de hospedeiras, morfologia de colônias, crescimento em meios seletivos e várias propriedades metabólicas (Jordan, 1984; Schaad, 1980). Embora há muito se saiba que características fenotípicas, particularmente as de círculo de hospedeiras não são se constituem em uma base confiável para o estabelecimento de filogenias (Wilson, 1944), seu contínuo uso em sistemática se justifica com base na sua conveniência e significância agrônômica. Com o desenvolvimento de métodos moleculares para a determinação de genótipos cromossomais em bactérias, tornou-se possível estimar o relacionamento filogenético entre estirpes. Métodos como tão diversos quanto o sequenciamento de nucleotídeos dos genes ribossomais (Woese, 1987) ou a detecção eletroforética do polimorfismo de isoenzimas (MLEE) dentro de populações locais (Selander et al., 1986), indicam que as filogenias baseadas em características fenotípicas às vezes apresentam concordância com as filogenias baseadas em dados genotípicos mas frequentemente podem mostrar profundas inconsistências (Fox et al., 1980).

Para finalizar, vale a pena destacar o potencial de uma ferramenta valiosa, principalmente nas mãos dos pesquisadores dos países subdesenvolvidos que consiste na ampla base de dados atualmente disponível na rede mundial de computadores para o estudo de sistemática bacteriana, inclusive com a disponibilização de programas de domínio público para a análise dos dados. Informações relevantes para a comparação de seqüências, padrões eletroforéticos de proteínas e DNA estão disponíveis em rede, facilitando o intercâmbio de informações e promovendo o desenvolvimento de projetos cooperativos. Canhos et al. (1993, 1996) apresenta uma visão geral

destas ferramentas, com exemplos de programas e base de dados com os respectivos mecanismos de comunicação para o acesso a estes importantes recursos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKERMANS, A.D.L.; MIRZA, M.S.; HARMSSEN, A.J.M.; BLOK, H.J.; HERRON, P.R.; SESSITSCH, A.; AKKERMANS, W. Molecular ecology of microbes: a review of promises, pitfalls and true progress. **FEMS Microbiology Reviews**, Haren, v.15, p.185-194, 1994.
- ALLEN, O.N.; ALLEN, E.K. ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The leguminosae**; a source book of characteristics, uses, and nodulation. Madison: The University of Wisconsin Press, 1981. 812p.
- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M.R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p. 47-156. 1994.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.996-1006, 1997.
- ANÔNIMO. **Priorities for microbial biodiversity research**. Summary and Recommendations. Report of the Workshop on Microbial Ecology, Michigan State University, Michigan, USA. 1995.
- BALDWIN, I.L.; FRED, E.B. Nomenclature of the rootnodule bacteria of the *Leguminosae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.17, p.141-150, 1929.
- BARRERA, L.L.; TRUJILLO, M.E.; GOODFELLOW, M.; GARCÍA, F.J.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; DÁVILA, G.; van BERKUM, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.1086-1091, 1997.
- BATZLI, J. McC.; GRAVES, W.R.; van BERKUM, P. Diversity among rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2137-2143, 1992.
- BERKUM, P. van; BEYENE, D.; EARDLY, B.D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).

- International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p.240-244, 1983.
- BERKUM, P. van; BEYENE, D.; VERA, F.T.; KEYSER, H.H. Variability among *Rhizobium* strains originating from nodules of *Vicia faba*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.2649-2653, 1995.
- BERKUM, P. van; KOTOB, S.I.; BASIT, H.A.; SALEM, S.; GEWAILY, E.M.; ANGLE, J.S. Genotypic diversity among strains of *Bradyrhizobium japonicum* belonging to serogroup 110. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p. 3130-3133, 1993.
- BERKUM, P. van; NAVARRO, R.B.; VARGAS, A.A.T. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup⁺) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.554-561, 1994.
- BOTTOMLEY, P.J.; CHENG, H.-H.; STRAIN, S.R. Genetic structure and symbiotic characteristics of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1754-1761, 1994.
- BREWIN, N.J.; BERINGER, J.E.; JONSTON, A.W.B. Plasmid mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, London, v.120, p.413-420, 1980.
- BROM, S.; MARTÍNEZ, E.; DÁVILA, G.; PALACIOS, R. Narrow- and broad-host range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1280-1283, 1988.
- BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.46, p.219-252, 1992.
- CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P.; BLAINE, L.D. Software tools and databases for bacterial systematics and their dissemination *via* global networks. **Antonie van Leeuwenhoek**, Delft, v.64, p.205-229, 1993.
- CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P.; CANHOS, D.A.L. Networking the microbial diversity information. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.17, p.498-504, 1996.
- CHEN, W.E.; 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**, Washington, v.43, p.153-159, 1995.
- CHEN, W.X.; LI, G.S.; Qi, Y.L.; WANG, E.T.; YUAN, H.L.; LI, J.L. *Rhizobium huakii* sp nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.275-280, 1991.
- CHEN, W.X.; TAN, Z.Y.; GAO, J.L.; LI, Y.; WANG, E.T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.870-873, 1997.
- 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**, Washington, v.38, p. 392-397, 1988.
- COLE, N.H.A. Tropical ecology research. **Nature**, London, v.309, p.204, 1984.
- COLWELL, R.R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.104, p.410-433, 1970.
- CORICH, V.; GIACOMINI, A.; OLLERO, F.J.; SQUARTINI, A.; NUTI, M.F. Pulsed-field electrophoresis in counter-clamped homogeneous electric fields (CHEF) for fingerprinting of *Rhizobium* spp. **FEMS Microbiology Letters**, Haren, v.83, p. 193-198, 1991.
- CURRIER, T.C.; NESTER, E.W. Evidence for diverse types of large plasmids in tumor-inducing strains of *Agrobacterium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.126, p.157-165, 1976.
- BRIJN, F.J. de Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2180-2187, 1992.
- DEMEZAS, D.H.; REARDON, T.B.; STRAIN, S.R.; WATSON, J.M.; GIBSON, A.H. Diversity and genetic structure of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolated from *Trifolium subterraneum* L. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 4, p. 209-220. 1995.

- DEMEZAS, D.H.; REARDON, T.B.; WATSON, J.M.; GIBSON, A.H. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.3489-3495, 1991.
- DENNY, T.P.; GILMOUR, M.N.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Journal of General Microbiology**, London, v.134, p.1949-1960, 1988.
- DEVINE, T.E.; KUYKENDALL, L.D.; BREITHAUPT, B.H. Nodule like structures induce on peanut by chlorosis producing strains of *Rhizobium* classified as *R. japonicum*. **Crop Science**, Madison, v.23, p.394-397, 1983.
- DREYFUS, B.L.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. s. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, p.89-98, 1988.
- DUPUY, N.C.; DREYFUS, B.L. *Bradyrhizobium* populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2415-2419, 1992.
- DUPUY, N.C.; WILLEMS, A.; POT, D.; DEWETTINCK, I.; VANDENBRUAENE, I.; MAESTROJUAN, G.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; COLLINS, M.D.; GILLIS, M. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.461-473, 1994.
- DYKES, G.A.; BRITZ, T.J.; HOLY, A. von. Numerical taxonomy and identification of lactic bacteria from spoiled, vacuum-packaged vienna sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.76, p.246-252, 1994.
- DYKHUIZEN, D.E.; GREEN, L. Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.7257-7268, 1991.
- EAGLESHAM, A.R.J.; ELLIS, J.M.; EVANS, .R.; FLEISCHAM, D.E.; HUNGRIA, M.; HARDY, R.W.F. The first photosynthetic nitrogen-fixing *Rhizobium*: characteristics. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L.E.; STACEY, G.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation**: achievements and objectives. New York: Chapman, 1990. p.805-811.

- EARDLY, B.D.; MATERON, L.A.; SMITH, N.H.; JOHNSON, D.A.; RUMBAUGH, M.D.; SELANDER, R.K. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.187-194, 1990.
- EARDLY, B.D.; WANG, T.S.; van BERKUM, P. Corresponding 16S rRNA gene segments in *Rhizobiaceae* and *Aeromonas* yield discordant phylogenies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.186, p.69-72, 1996.
- EARDLY, B.D.; WANG, T.S.; WITTAM, T.S.; SELANDER, R.K. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.507-512, 1995.
- EARDLY, B.D.; YOUNG, J.P.W.; SELANDER, R.K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp strain Or191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequence of the 16S rRNA and nifH genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1809-1815, 1992.
- ELSAS, J.D. van; DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.32, p.133-154, 1998.
- FELICE, A.E.; ALSHINAWI, C. Polymerase chain reaction in molecular biotechnology; appropriate technology for developing countries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.12, p.467-471, 1996.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).
- FOX, G.E.; STACKEBRANDT, R.B.; HESPELL, R.B.; GIBSON, J.; MANILOFF, J.; DYER, R.S.; WOLF, R.S.; BALCH, W.E.; TANNER, R.S.; MAGRUM, L.J.; ZABLEN, L.B.; BLAKEMORE, R.; GUPTA, R.; BONEN, L.; LEWIS, B.J.; STAHL, D.A.; LUEHRSEN, K.N.; CHEN, K.N.; WOESE, C.R. The phylogeny of prokaryotes. **Science**, Washington, v.209, p.457-463, 1980.
- FOX, G.E.; WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK JR., P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.42, p.166-170, 1992.

- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; McCOY, W. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin, 1932. 343p.
- FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.224-229, 1990.
- GAULT, R.R.; CORBIN, E.J.; BOUNDY, K.A.; BROCKWELL, J. Nodulation studies on legumes exotic to Australia: *Lupinus* and *Ornithopus* spp. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v.26, p.37-48, 1986.
- GENIAUX, E.; AMARGER, N. Diversity and stability of plasmid transfer in isolates from a single field population of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v.102, p.251-260, 1993.
- GILLER, K.E.; BEARE, M.H.; LAVELLE, P.; IZAC, A.-M.N.; SWIFT, M.J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, p.3-16, 1997.
- GOODACRE, R.; HARTMANN, A.; BERINGER, J.E.; BERKELEY, R.C.W. The use of pyrolysis mass spectrometry in the characterization of *Rhizobium meliloti*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.13, p.157-160, 1991.
- GOODFELLOW, M.; FERGUSON, E.V.; SANGLIER, J.-J. Numerical classification and identification of *Streptomyces* species – a review. **Gene**, Amsterdam, v.115, p. 225-233, 1992.
- GORDON, D.M.; WEXLER, M.; REARDON, T.B.; MURPHY, P.J. The genetic structure of *Rhizobium* populations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, p.491-499, 1995.
- GRAHAM, P.H. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. **Journal of General Microbiology**, London, v.35, p. 511-517, 1964.
- GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERRY, M.L. Occurrence and characterization of acid-pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.475-484, 1992.
- GRAHAM, P.H.; PARKER, C.A. Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of the legumes. **Plant and Soil**, The Hague, v.20, p.383-396, 1964.
- GRAHAM, P.H.; SADOWSKI, M.J.; KEYSER, H.H.; BARNET, Y.M.; BRADLEY, R.S.; COOPER, J.E.; DE LEY, D.J.; JARVIS, B.D.W.; ROSLYCKY, E.B.; STRIJDOM,

- B.W.; YOUNG, J.P.W. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.582-587, 1991.
- HAHN, M.; HENNECKE, H. Conservation of a symbiotic DNA region in soybean root nodule bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.2253-2255, 1987.
- HARRISON, S.P.; MYTTON, L.R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplifications of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p. 1009-1015, 1992.
- HARRISON, S.P.; JONES, D.G.; YOUNG, J.P.W. *Rhizobium* population genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. **Journal of General Microbiology**, London, v.135, p.1061-1069, 1989.
- HARTMANN, A.; CATROUX, G.; AMARGER, N. *Bradyrhizobium japonicum* strain identification by RFLP analysis using the repeated sequence RS-alpha. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.15, p.15-19, 1992.
- HARTMANN, A.; GOMEZ, M.; GIRAUD, J.J.; REVELLIN, C. Repeated sequence RS α is diagnostic for *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.23, p.15-19, 1996.
- HAUKKA, K. **Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from tropical tree legumes**. Helsinki: Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, 1997. Tese de Mestrado.
- HAUKKA, K.; LIDSTRÖM, K. Pulsed-field electrophoresis for genotypic comparison of *Rhizobium* bacteria that nodulate leguminous trees. **FEMS Microbiology Letters**, Haren, v.119, p.215-220, 1994.
- HAUKKA, K.; LIDSTRÖM, K.; YOUNG, P.W. Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of african rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.19, p.352-359, 1996.
- HAUKKA, K.; LIDSTRÖM, K.; YOUNG, P.W. Three pylogenetic groups of nodA and nif H genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.419-426, 1998.

- HOLLIS, A.B.; KLOOS, W.E.; ELKAN, G.H. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. **Journal of General Microbiology**, London, v.123, p.215-222, 1981.
- HUBER, T.A.; AGARWAL, A.K.; KEISTER, D.L. Extracellular polysaccharide composition, ex planta nitrogenase, and DNA homology in *Rhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.158, p.1168-1171, 1984.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; SANTOS, J.C.F. Ecologia microbiana em solos sob cultivo na Região Sul do Brasil. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOSSI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S., eds. **Microbiologia do solo**; desafios para o século XXI. Londrina: IAPAR/Embrapa-CNPSO, 1995. p.234-270.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. **PCR protocols** – a guide to methods and applications. San Diego: Academic, 1990. 482p.
- JARVIS, B.D.W.; DICK, A.G.; GREENWOOD, R.M. Deoxyribonucleic acid homology among strains of *Rhizobium trifoli* and related species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.30, p.42-52, 1980.
- JARVIS, B.D.W.; DOWNER, J.L.; YOUNG, J.P.W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* & *Bradyrhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.42, p.93-96, 1992.
- JARVIS, B.D.W.; PANKUHURST, C.E.; PATEL, J.J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.32, p.378-380, 1982.
- JARVIS, B.D.W.; TIGHE, S.W. Rapid identification of *Rhizobium* based on cellular fatty acid analysis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.31-41, 1994.
- JARVIS, B.D.W.; van BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNADZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.895-898, 1997.
- JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p. 945-952, 1993.

- JOHNSON, J.L. DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acids. **Methods in Microbiology**, v.28, p.33-74, 1985.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae. CONN. 1938. In: KRIEG, N.R., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p.234-256.
- 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**, Washington, v.32, p.136-139, 1982.
- JUDD, A.K.; SHNEIDER, M.; SADOWSKY, M.J.; de BRUIJN, F.J. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1702-1708, 1993.
- KAHINDI, J.H.P.; WOOPER, P.; GEORGE, T.; de SOUZA MOREIRA, F.M.; KARANJA, N.K.; GILLER, K.E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.6, p.55-76, 1997.
- KAIJALAINEN, S.; LINDSTRÖM, K. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Rhizobium galegae* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171, p.5561-5566, 1989.
- KAY, H.E.; COUTINHO, H.L.C.; FATTORI, M.; MANFIO, G.P.; GOODACRE, R.; NUTI, M.P.; BASSAGLIA, M.; BERINGER, J.E. The identification of *Bradyrhizobium japonicum* strains isolated from Italian soils. **Microbiology**, New York, v.140, p.2333-2339, 1994.
- KEYSER, H.H.; BOHLOOL, B.B.; HU, T.S.; WEBER, D.F. Fast growing rhizobia isolated from root nodules of soybeans. **Science**, Washington, v.215, p.1631-1632, 1982.
- KEYSER, H.H.; van BERKUM, P.; WEBER, D.F. A comparative study of the physiology of symbiosis formed by *Rhizobium japonicum* with *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Plant Physiology**, Bethesda, v.70, p.1626-1630, 1982.
- KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.853-862, 1997.

- KUYKENDALL, L.D.; ELKAN, G.H. *Rhizobium japonicum* derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.32, p.511-519, 1976.
- KUYKENDALL, L.D.; ROY, M.A.; O'NEILL, J.J.; DEVINE, T.E. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, p.358-361, 1988.
- 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**, Ottawa, v.38, p.501-505, 1992.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of *Rhizobia* by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.56-63, 1994.
- 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 and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.4748-4758, 1997.
- LAGUERRE, G.; FERNANDEZ, M.P.; EDEL, V.; NORMAND, P.; AMARGER, N. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.761-767, 1993.
- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA 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**, Washington, v.62, p.2029-2036, 1996.
- LAGUERRE, G.; MAZURIER, S.I.; AMARGER, N. Plasmid profiles and restriction length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v.101, p.17-26, 1992.
- LAJUDIE, P. de; 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**, Washington, v.44, p.715-733, 1994.
- LAJUDIE, P. de; 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**, Washinhgton, v.48, p.369-382, 1998.
- LEUNG, K.; STRAIN, S.R.; BRUJIN, F.J.; BOTTOMLEY, P.J. Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within na indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.416-426, 1994.
- LINDSTRÖM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.39, p.365-367, 1989.
- LINDSTRÖM, K.; van BERKUM, P.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; NOVIKOVA, N.; JARVIS, B. Report from the roundtable on *Rhizobium* taxonomy. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOPOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.807-810.
- LINDSTRÖM, K.; LAGUERRE, G.; NORMAND, P.; RASMUSSEN, U.; HEULIN. T.; JARVIS, B.D.W.; de LAJUDIE, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CHEN, W.-X. Taxonomy and phylogeny of diazotrophs. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E., ed. **Biological nitrogen fixation for the 21st century**; proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation, Institut Pasteur, Paris, France, july 20-25, 1997. Dordrecht: Kluwer, 1998. p.559-570. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, v.31).
- LINTON, D.; DEWHIRST, F.E.; CLEWLEY, J.P.; OWEN, R.J.; BURNENS, A.P.; STANLEY, J. Two types of 16S rRNA gene are found in *Campylobacter helveticus*: analysis, applications and characterization of the intervening sequence found in some strains. **Microbiology**, New York, v.140, p.847-855, 1994.

- LIPSKI, A.; KLATTE, S.; BENDINGER, B.; ALTENDORF, K. Differentiation of gram-negative, nonfermentative bacteria isolated from biofilters on the basis of fatty acid composition, quinone system, and physiological reaction profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2053-2065, 1992.
- LUCAS, I.H.; L. SEGOVIA, L.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PUEPPKE, S.G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.2775-2779, 1995.
- LUDWIG, W.; KIRCHHOF, G.; KLUGBAUER, N.; WEIZENEGGER, M.; BETZEL, D.; EHRMANN, M.; HERTEL, C.; JILG, S.; TATZEL, R.; ZITZELSBERGER, H.; LIEBL, S.; HOCKBERGER, M.; SHAH, J.; LANE, D.; WALLNÖFER, P.R.; SCHEIFER, K.H. Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.15, p.487-501, 1992.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS. Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.15, p.155-173, 1994.
- LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.K.; HIRIGOYEN, D.; STOLL, M.; BONATTO, S.; OZAKI, L.S. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.10, p.648-652, 1994.
- MARTÍNEZ, E.; FLORES, M.; BROM, S.; ROMERO, D.; DÁVILA, G.; PALACIOS, R. *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p.179-184, 1988.
- MARTÍNEZ, E.; PALACIOS, R.; SÁNCHEZ, F. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens*, harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.169, p.2828-2834, 1987.
- MARTÍNEZ, E.; PARDO, M.A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M.A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, Washington, v.131, p.1779-1786, 1985.

- MARTÍNEZ, 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**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.
- MARTINEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.11-20, 1994.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.15, p.113-140, 1996.
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJNEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.1005-1010, 1997.
- MEANS, U.M.; JOHNSON, H.W.; DATE, R.A. Quick serological method of classifying strains of *Rhizobium japonicum* in nodules. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.87, p.547-553, 1964.
- MERCANTE, F.M.M.; CUNHA, C.O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO-JÚNIOR, W.Q.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. *Leucaena leucocephala* as a trap host for *Rhizobium tropici* strains from the brazilian "Cerrado" region. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.29, p.49-58, 1998.
- MINASAWA, K. Division of rhizobitoxine-producing and hydrogen-uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by *nifDKE* sequence divergence. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.31, p.81-89, 1990.
- MINASAWA, K. Extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production, and hydrogenase phenotype in *Bradyrhizobium japonicum*. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.30, p.877-884, 1989.
- MINASAWA, K.; FUKAI, K. Production of indole-3-acetic acid by *Bradyrhizobium japonicum*: a correlation with genotype grouping and rhizobitoxine production. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.32, p.1-9, 1991.
- MINASAWA, K.; ISAWA, T.; NAKATSUKA, Y.; ICHIKAWA, N. New *Bradyrhizobium japonicum* strains that possess high copy numbers of the repeated sequence RS_{alfa}. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.1845-1851, 1998.

- MOAWAD, H.; BOHLOOL, B.B. Characterization of rhizobia from *Leucaena*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.8, p.387-392, 1992.
- MOREIRA, F.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.16, p.135-146, 1993.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, New York, April, p.56-65, 1990.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p.355-350, 1987.
- MURPHY, P.J.; WILSON, K.J.; ANYANGO, B.; GILLER, K.E. *Rhizobium tropici*, *R. leguminosarum* and *Sinorhizobium fredii* are all *Phaseolus*-nodulating rhizobia indigenous to Kenyan soils. In: CONGRÈS INTERNATIONAL DE FIXATION DE L'AZOTE, 11., 1997, Paris. **Résumés...** Paris: Institut Pasteur, INRA, CNRS, CEA, ORSTOM, CIRAD, 1997. Abst.01-11.
- MURRAY, R.G.E.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; De VOS, P.; COODFELLOW, M.; GRIMONT, P.A.D.; PFENING, N.; STACKEBRANDT, E.; ZAVARSIN, G.A. Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.40, p.213-215, 1990.
- NIEMANN, S.; PÜHLER, A.; TICHY, H.-T.; SIMON, R.; SELBITSCHKA, W. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.82, p.477-484, 1997.
- NOUR, S.M.; CLEYET-MAREL, J.-C.; BECK, D.; EFFOSSE, A.; FERNANDEZ, M.P. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.40, p.345-354, 1994.
- NOUR, S.M.; CLEYET-MAREL, J.-C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M.P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.640-648, 1995.

- NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.-C. *Rhizobium ciceri* sp nov. consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.511-522, 1994.
- NUTI, M.P.A.; LEPIDI, R.K.; PRAKASH, R.A.; SCHILPERROT; CANNON, F.C. Evidence for nitrogen fixation (nif) genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. **Nature**, London, v.282, p.533-535, 1979.
- OLSEN, G.J.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1-6, 1994.
- OYAIZU, H.; MATSUMOTO, S.; MINAMISAWA, K.; GAMOU, T. Distribution of rhizobia in leguminous plants surveyed by phylogenetic identification. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.39, p.339-354, 1993.
- PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2279-2285, 1996.
- PIÑERO, D.; MARTÍNEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.2825-2832, 1988.
- PRAKASH, R.K.; SCHILPERROT, R.A.; NUTI, M.P. Large plasmids of fast-growing rhizobia: homology studies and location of structural nitrogen fixation (nif) genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.145, p.1129-1136, 1981.
- PRIETO, M.; GARCÍA-ARMESTO, M.R.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; OTERO, A.; MORENO, B. Numerical taxonomy of gram-negative, nonmotile, nonfermentative bacteria isolated during chilled storage of lamb carcasses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2245-2249, 1992.
- QUINTO, C.; de la VEGA; FLORES, M.; LEEMANS, J.; CEVALLO, M.A.; PARDO, M.A.; AZPIROZ, R.; GIRARD, M. de L.; CALVA, E.; PALACIOS, R. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.82, p.1170-1174, 1985.

- RAMIREZ, M.E.; ISRAEL, D.W.; WOLLUM II, A.G. Phenotypic and genotypic diversity of similar serotypes of soybean bradyrhizobia from two soil populations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.1539-1545, 1997a.
- RAMIREZ, M.E.; ISRAEL, D.W.; WOLLUM II, A.G. Phenotypic characterization of soybean bradyrhizobia in two soils of North Carolina. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.1547-1555, 1997b.
- RICHARDSON, A.E.; VICCARS, L.A.; WATSON, J.M.; GIBSON, A.H. Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. **Soil and Biology Biochemistry**, Oxford, v.27, p.515-524, 1995.
- RIEDEL, K.H.J.; BRITZ, T.J. *Propionibacterium* species diversity in anaerobic digesters. **Biodiversity and Conservation**, London, v.2, p.400-411, 1993.
- ROME, S.; FERNANDEZ, M.P.; BRUNEL, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp.. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p.972-980, 1996.
- ROSSBACH, S.; RASUL, G.; SCHNEIDER, M; EARDLEY, B.; de BRUIJN, F.J. Structural and functional conservation of the Rhizopine catabolism (*moc*) locus limited to selected *Rhizobium meliloti* strains and unrelated to their geographical origin. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v.8, p.549-559, 1995.
- SÁ, N.M.H.; SCOTTI, M.R.M.L.; PAIVA, E.; FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. Selection and characterization of *Rhizobium* spp strains stable and capable in fixing nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.24, p.28-48, 1993.
- SÁ, N.M.H. de; KATTAH, L. da S.; SELDIN, L.; VASCONCELOS, M.J.V.; PAIVA, E. Genomic heterogeneity within bean nodulating *Rhizobium* strains isolated from Cerrado soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.1011-1014, 1997.
- SAWADA, H.; IEKI, H.; OYAIZU, H.; MATSUMOTO, S. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.694-702, 1993.
- SCHAAD, N.W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Minnesota: American Phytopathological Society, 1980.

- SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. Molecular systematics of prokaryotes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.37, p.143-187, 1983.
- SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.12, p.163-174, 1996.
- SCHOLLA, M.H.; ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.34, p.484-486, 1984.
- 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**, Washington, v. 43, p.374-377, 1993.
- SELANDER, R.K.; CAUGANT, D.A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N.; WHITTAM, T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, p.873-884, 1986.
- SELENSKA-POBELL, S.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E. Fragmentation of the large subunit rRNA in the family *Rhizobiaceae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, p.6993-6998, 1995.
- SELENSKA-POBELL, S.; DÖRING, H.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E. Unusual organization of the 23S rRNA genes in *Rhizobiaceae*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.905-909, 1997.
- SELENSKA-POBELL, S.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; RADEVA, G.; SQUARTINI, A. Characterization of *Rhizobium 'hedysari'* by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.80, p.517-528, 1996.
- SELENSKA-POBELL, S.; GIGOVA, L.; PETROVA, N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v.79, p.425-431, 1995.
- SHISSHIDO, M.; PEPPER, I.L. Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.11-16, 1990.

- SOBRAL, B.W.S.; HONEYCUTT, R.J.; ATHERLY, A.G. The genomes of the family *Rhizobiaceae*: size, stability, and rarely cutting restriction endonucleases. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.704-709, 1991.
- SOUZA, V.; EGUIARTE, L.; AVILA, G.; CAPPELLO, R.; CALLARDO, C.; MONTOYA, J.; PIÑERO, D. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultured bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p.1260-1268, 1994.
- SOUZA, V.; NGUYEN, T.T.; HUDSON, R.R.; PIÑERO, D.; LENSKI, R. Hierarchical analysis of the linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence of sex? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.89, p.8389-8393, 1992.
- SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume – *Rhizobium* symbiosis symbiosis: chaos or theory? **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.846-849, 1994.
- STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W.; WITT, D. Ribosomal RNA and rRNA sequence analysis. **Gene**, Amsterdam, v.115, p.255-260, 1992.
- STRAIN, S.R.; LEUNG, K.; WHITTAM, T.S.; De BRUIJN, F.J.; BOTTOMLEY, P.J. Genetic structure of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and *viciae* populations found in two Oregon soils under different plant communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.2772-2778, 1994.
- STRALIOTTO, R.; CUNHA, C.O.; FERREIRA, M.E.; RUMJANEK, N.G. Diversidade genética de rizóbio que nodula o feijoeiro em condições tropicais: *Sinorhizobium*, um novo gênero nodulando eficientemente o feijoeiro em condições de stress térmico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 19., 1997, Rio de Janeiro. **Abstracts...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. Abst. MS-069.
- 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**, Berlin, v.25, p.224-232, 1997.

- TAN, Z.Y.; XU, X.D.; WANG, E.T.; GAO, J.L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CHEN, W.X. Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.874-879, 1997.
- TESFAYE, M.; PETERSEN, D.J.; HOLL, F.B. Comparison of partial 23S rDNA sequences from *Rhizobium* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.526-533, 1997.
- THIES, J.E.; BEM BOHLOOL, B.; SINGLETON, P.W. Subgroups of the cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.1540-1545, 1991.
- THOMAS, P.M.; GOLLY, K.F.; ZYSKIND, J.W.; VIRGINIA, R.A. Variation of clonal, mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1146-1153, 1994.
- ULLMANN, J.S.; McCARTHY, B.J. The relationship between mismatched base pairs and the thermal stability of DNA duplexes. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v.294, p.416-424, 1973.
- URTZ, B.E.; ELKAN, G.H. Genetic diversity among *Bradyrhizobium* isolates that effectively nodulate peanut (*Arachis hypogaea*). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, p.1121-1130, 1996.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v.60, p.407-438, 1996.
- VANROSSUM, D.; SCHUURMANS, F.P.; GILLIS, M.; MUYOTCHA, A.; VANVERSEVELD, H.W.; STOUTHAMER, A.H.; BOOGERD, F.C. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1599-1609, 1995.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v.5, p.25-40, 1994.

- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).
- VINUESA, P.; RADEMAKER, J.L.W.; de BRUIJN, F.J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding a 16S rRNA and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.2096-2104, 1998
- WARD, D.M.; WLLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, London, v.345, p.63-65, 1990.
- WAYNE, L.G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.D.; KANDLER, P.; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, L.H.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M.P.; TRÜPER, H.G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, p.463-464, 1987.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLF, K.; MEYER, W. **DNA fingerprints in plants and fungi**. Boca Raton: CRC, 1995. 322p.
- WILLEMS, A.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.305-313, 1993.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIC, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WILSON, E.O. A situação atual da diversidade biológica. In: WILSON, E.O.; PETER, F.M., eds. **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p.3-35.
- WILSON, E.O. Time to revive systematics. **Science**, Washington, v.230, p.1227-1229, 1985.
- WILSON, J.K. Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. **Soil Science**, Baltimore, v.58, p.61-69, 1944.
- WILSON, K.J. Molecular technique for the study of rhizobial ecology in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, p.501-514, 1995.

- WITCOMB, R.F.; HACKETT, K.J. Why are there so many species of mollicutes? An essay on procariotic diversity. In: KNUTSON, L.; STONER, A.K., ed. **Biotic Diversity and germplasm Preservation, Global Imperatives**. Amsterdam: Kluwer, 1989. p.205-240.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v.51, p. 221-271, 1987.
- XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.27, p.386-392, 1998.
- YANAGI, M.; YAMASATO, K. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. **FEMS Microbiology Letters**, Haren, v.107, p.115-120, 1993.
- YOUNG, J.P.W. *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans and lucerne grown at the same site. **Journal of General Microbiology**, London, v.131, p.2399-2408, 1985.
- YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of N₂-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J., ed. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: John Wiley, 1992. p.43-85.
- YOUNG, J.P.W. All those new names: an overview of the molecular phylogeny of plant-associated bacteria. In: DANIELS, M.J.; DOWNIE, J.A.; OSBOURN, A.E., ed. **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions**. Dordrecht: Kluwer, 1994. p.73-80.
- YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTai1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.2271-2277, 1991.
- YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, Oxford, v.133, p.87-94, 1996.
- YOUNG, J.P.W.; WEXLER, M. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, London, v.134, p.2731-2739, 1988.

ZHANG, X.; HARPER, R.; KARSISTO, M.; LINDSTRÖM, K. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.104-113, 1991.