

Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz

Characterization and influence of alfalfa rhizobia on germination and early growth of rice seedling

Marcos Roberto Dobler Stroschein^{I*} Enilson Luiz Saccol de Sá^{II} Rafael Goulart Machado^I
Thais de Lima Cabral^I Manuela Bruxel^{III} Adriana Giongo^{IV} Rogério Chimanski Da Fontoura^V

RESUMO

A inoculação de plantas leguminosas com rizóbios é um dos principais métodos biotecnológicos de utilização de micro-organismos em plantas visando à fixação biológica de nitrogênio na agricultura. No entanto, nos últimos anos, vêm sendo observada nesses micro-organismos a capacidade de produção de fitohormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA) e a promoção de crescimento em gramíneas. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram quantificar o ácido indol-acético produzido por rizóbios isolados de alfafa, avaliar o efeito da inoculação desses micro-organismos na germinação de sementes de arroz e realizar a caracterização genética desses isolados. Nove rizóbios isolados de nódulos de alfafa foram avaliados quanto a sua capacidade de produção de equivalentes de AIA e a influência da inoculação desses micro-organismos na germinação e desenvolvimento de plântulas de arroz. Os rizóbios produtores de AIA foram identificados pelo sequenciamento da região do gene 16S do DNAr. A produção de equivalentes ao ácido indol-acético foi observada em todos rizóbios, com valores que variaram de 43,04 a 101,26 µg mL⁻¹ em meio de cultura. Com relação à germinação das sementes de arroz, a inoculação com rizóbios acelerou o processo e o crescimento de suas plântulas. Os rizóbios UFRGS Ms58, Ms515, Ms195, Ms205, Ms2010 e 2012 foram identificados como pertencentes à espécie *Sinorhizobium meliloti* e UFRGS Ms55, Ms72 e Ms75 à espécie *Rhizobium* sp.

Palavras-chave: rizobactéria, promoção de crescimento, ácido indol-acético, caracterização genética, *Oriza sativa*.

ABSTRACT

The inoculation of leguminous plants with rhizobia is one of the main methods of biotechnological use of microorganisms in order to obtain biological nitrogen fixation in agriculture. However, in recent years it has been attributed to these microorganisms the ability to produce phytohormones, mainly indole acetic acid (IAA), and to promote the growth in grasses. Thus, the objectives of this study were to quantify the indole acetic acid produced by rhizobia from alfalfa and to evaluate the effect of inoculation of these microorganisms on the germination of rice seed and to perform the genetic characterization of these isolates. Nine rhizobia, from nodules of alfalfa, were evaluated for their ability to produce IAA equivalents and for their influence in inoculating these microorganisms on germination and seedling development of rice. Moreover, these rhizobia producers of IAA were identified by the 16S region of DNAr. The equivalent production of indole acetic acid was observed in all tested isolates, with values ranging from 43.04 to 101.26 µg mL⁻¹ in culture medium. Regarding the germination of rice seeds, the inoculation with rhizobia accelerated this germination and its growth. Microorganisms UFRGS Ms58, UFRGS Ms515, UFRGS Ms195, UFRGS Ms205, UFRGS Ms2010 and UFRGS 2012 were identified as belonging to the species of *Sinorhizobium meliloti*. Microorganisms Ms55 UFRGS, UFRGS Ms75 and UFRG Ms72 were identified as belonging to the species of *Rhizobium* sp.

Key words: rhizobacteria, plant growth promotion, indole acetic acid, the genetic characterization, *Oriza sativa*.

^IPrograma de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: marcosstroschein@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Solos, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{III}Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^{IV}Department of Microbiology and Cell Science, University of Florida, Gainesville, FL, USA.

^VCurso de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

INTRODUÇÃO

A sustentabilidade da exploração dos recursos naturais é um dos principais desafios da agricultura moderna, cujo uso de micro-organismos vem sendo apontado como uma alternativa para o menor uso de insumos no incremento da produção agrícola, sendo a inoculação de leguminosas com rizóbios e a utilização de micorrizas em mudas de diferentes espécies os exemplos mais notáveis. No entanto, nas últimas décadas, outros micro-organismos têm atraído a atenção dos pesquisadores, com vista a uma potencial utilização na agricultura (VARGAS et al., 2009). As bactérias presentes na rizosfera são capazes de contribuir para o aumento da produtividade de algumas lavouras devido à colonização das raízes e estímulo ao crescimento das plantas. Esses micro-organismos são conhecidos como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (*Plant growthpromoting rhizobacteria* - PGPR) (BISWAS et al., 2000).

Diversos micro-organismos vêm sendo relatados como promotores de crescimento em plantas, que incluem os gêneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia*, os quais são exclusivamente micro-organismos não simbióticos (VARGAS et al., 2009). Além desses micro-organismos, estudos comprovaram a ação benéfica de rizóbios na atividade de promoção de crescimento vegetal em diversas espécies de plantas, a exemplo de milho, sorgo, milheto, canola, alface, mostarda, arroz, cevada (MATIRU & DAKORA, 2004; PERRINE-WALKER et al., 2007). Os detalhes dos mecanismos da interação entre rizóbios e não-leguminosas ainda é pouco entendido, no entanto, a capacidade de produção de fitohormônios, como o ácido indol-acético (AIA), vem sendo relatada como uma das possíveis formas de estímulo ao crescimento vegetal (CHEN et al., 2005; BANERJEE et al., 2006).

O ácido indol-acético, fitohormônio pertencente ao grupo das auxinas, atua na alongação das células vegetais, na formação das raízes laterais e pêlos radiculares, bem como na germinação das sementes (BISWAS et al., 2000). Nas fases iniciais do desenvolvimento das plantas, a inoculação de rizóbios produtores de AIA pode aumentar a velocidade da germinação das sementes inoculadas, como observado em arroz e alface (SCHLINDWEIN et al., 2008; VARGAS et al., 2009; PALANIAPPAN et al., 2010).

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram quantificar o ácido indol-acético produzido por rizóbios isolados de alfafa, avaliar o efeito da inoculação

desses micro-organismos na germinação de sementes de arroz e realizar a caracterização genética desses isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Os rizóbios estudados foram obtidos da coleção de culturas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo escolhidos nove rizóbios que produzem equivalentes ao ácido indol-acético em meio de cultura. A estirpe SEMIA 816 e o isolado de *Lotus corniculatus* UFRGS Lc348 foram usados como referência na quantificação do ácido indol-acético (OSORIO FILHO, 2009). Os testes de germinação das sementes foram realizados com a espécie *Oriza sativa* cultivar 'IRGA 409'.

A quantificação da produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético pelas bactérias selecionadas foi realizada utilizando-se o método de ASGHAR et al. (2002). As concentrações de ácido indol-acético foram determinadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530nm (GORDON & WEBER, 1951), em comparação com uma curva com os seguintes valores: 0, 0,2, 1, 2, 3, 6, 11, 15, 20, 45, 100, 200 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA sintético.

Na avaliação do efeito dos rizóbios sobre a germinação de sementes de arroz, foram utilizadas sementes da cultivar 'IRGA 409' submetidas previamente à assepsia com álcool 70% (1min) e hipoclorito de sódio (2,5%) (1min), seguida de cinco lavagens com água esterilizada. Os testes foram conduzidos em placas de Petri, em quatro repetições e 36 sementes em cada placa, sendo o delineamento inteiramente ao acaso e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro. Os tratamentos foram nove rizóbios isolados de alfafa (UFRGS Ms205, UFRGS Ms75, UFRGS Ms72, UFRGS Ms55, UFRGS Ms58, UFRGS Ms2010, UFRGS Ms2012, UFRGS Ms515 e UFRGS Ms195) e duas testemunhas, a estirpe SEMIA 816 e o isolado de *Lotus corniculatus* UFRGS Lc348. As sementes foram colocadas sobre papel toalha previamente esterilizados, sendo umedecidos com 10 mL de meio de cultura LM estéril (tratamento não inoculado - controle). As placas contendo as sementes inoculadas foram mantidas no escuro, em uma estufa bacteriológica, à temperatura de 28°C, por um período de sete dias. Do segundo, quarto e sexto dia após a inoculação das sementes com os rizóbios nas placas de Petri, foi determinado o percentual de germinação. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado pela soma do número de sementes germinadas a cada dia e dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da

instalação do teste, conforme MAGUIRE (1962). O comprimento da raiz principal e parte aérea das plântulas de arroz foram determinados aos dois e seis dias após a emergência, em câmara de fluxo laminar, sendo medidas 10 plântulas de cada repetição, com auxílio de uma régua.

A região de DNA do gene que codifica a porção 16S do ribossomo foi amplificada com os oligonucleotídeos 8F (AGAGTTTGATCCTTGCTCAG) e 1492R (GCYTACCTTGTT-ACGACTT) (EDWARDS et al., 1989). Os ciclos empregados foram: um ciclo inicial a 95°C por 3min, 35 ciclos de desnaturação em 94°C por 1min, anelamento em 55°C por 1min, extensão em 72°C para 2min e um ciclo final de extensão em 72°C por 3min. Os fragmentos foram sequenciados usando o sistema de eletroforese por capilaridade MegaBace 500 (Amersham Biosciences) e as sequências obtidas foram adicionadas ao GenBank (UFRGS Ms55: JF693274; UFRGS Ms58: JF693275; UFRGS Ms515: JF693273; UFRGS Ms75: JF693278; UFRGS Ms72: JF693277; UFRGS Ms195: JF693268; UFRGS Ms205: JF693272; UFRGS Ms2012: JF693269). As sequências parciais da região 16S DNAr das estirpes homólogas foram pesquisadas no GenBank com o programa BLAST 2.0, analisadas pelo algoritmo Megablast e usadas para a construção da árvore filogenética. As sequências selecionadas foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW e as relações filogenéticas foram analisadas usando-se o método Neighbor-joining, realizado pelo programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de substâncias equivalentes ao ácido indol-acético foi observada em todos os isolados

testados, com valores que variaram de 43,04 a 101,26 µg mL⁻¹ de equivalente ao ácido indol-acético (AIA) em meio de cultura (Tabela 1). Os isolados UFRGS Ms205, Ms75, Ms72, Ms55 e Ms58 produziram quantidades de AIA em meio de cultura superiores aos dois controles testados. Valores superiores a 100 µg mL⁻¹ foram observados para isolados de rizóbios, como os microorganismos estudados por CHAGAS Jr. et al. (2009).

Todos os rizóbios inoculados nas sementes de arroz promoveram um aumento inicial na porcentagem de germinação a partir do segundo dia após a inoculação, em comparação ao tratamento controle (não inoculado), sendo que, para as sementes inoculadas com o isolado UFRGS Ms72, observou-se a maior porcentagem de germinação inicial (Tabela 1). As porcentagens de germinação final não diferiram significativamente entre os tratamentos inoculados e o controle (Tabela 1). O aumento da germinação inicial favoreceu o índice de velocidade da germinação (IVG) das sementes inoculadas com rizóbios, sendo que quando se utilizou os isolados UFRGS Ms72 e UFRGS Ms205 ocorreram os maiores índices de velocidade de germinação (Tabela 1). Incrementos da germinação inicial e aumentos da velocidade de germinação de sementes inoculadas com rizóbios produtores de AIA foram relatados por BISWAS et al. (2000), GUPTA et al. (2002), PANDEY et al. (2005), SCHLINDWEIN et al. (2008), VARGAS et al. (2009) e OSORIO FILHO (2009), sendo esse fator importante no estabelecimento da cultura.

A inoculação dos rizóbios em sementes de arroz também induziu mudanças no comprimento da raiz e da parte aérea das plântulas (Tabela 2). Cinco

Tabela 1 - Quantificação de substâncias equivalentes ao ácido indol-acético (AIA) produzidas por rizóbios em meio LM enriquecido com triptofano, germinação inicial e final de sementes de arroz e índice de velocidade de germinação (IVG).

Rizóbios	AIA (µg mL ⁻¹)	Germinação inicial %	Germinação final %	IVG
UFRGS Ms72	95,6 a	25,0 a*	95,1 ^{ns}	23,0 a
UFRGS Ms205	101,3 a	18,8 b	100,0	23,0 a
UFRGS Ms55	92,0 a	18,8 b	93,1	21,3 b
UFRGS Ms2012	56,7 b	18,8 b	98,9	20,5 b
UFRGS Ms195	55,6 b	18,8 b	98,9	20,5 b
SEMIA 816	55,0 b	18,8 b	98,9	20,5 b
UFRGS Ms515	55,8 b	17,4 b	92,6	20,1 b
UFRGS Lc 348	43,0 c	16,0 b	95,6	20,1 b
UFRGS Ms58	84,4 a	16,0 b	100,0	20,1 b
UFRGS Ms2010	59,3 b	16,0 b	95,4	20,1 b
UFRGS Ms75	100,3 a	14,8 b	97,2	20,1 b
Controle	-	3,5 c	99,6	17,6 c
CV(%)	10,1	26,3	-	7,2

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro. ^{ns}: não significativo.

Tabela 2 - Influência da inoculação com diferentes isolados de rizóbios produtores de AIA sobre o crescimento de plântulas de arroz.

Rizóbios	-----Raiz-----		-----Parte aérea-----	
	2 ^o dia	6 ^o dia	2 ^o dia	6 ^o dia
-----mm-----				
UFRGSMs75	24 a*	48 a	27 a	59 a
UFRGSMs72	26 a	53 a	28 a	61 a
UFRGSMs205	21 b	44 b	27 a	54 b
UFRGSMs55	18 b	42 b	21 b	54 b
UFRGSMs515	20 b	45 b	23 b	55 b
UFRGS Lc 348	16 c	44 b	19 b	55 b
UFRGSMs58	14 c	40 c	19 b	50 c
UFRGSMs2010	15 c	40 c	18 b	49 c
UFRGSMs2012	14 c	40 c	17 c	49 c
UFRGSMs195	13 c	39 c	17 c	49 c
SEMIA 816	12 c	41 b	16 c	51 c
NI	11 c	39 c	14 c	48 c
CV (%)	19,9	16,9	18,1	17,2

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

isolados de alfafa (UFRGS Ms72, Ms75, Ms205, Ms55, Ms515) promoveram aumento no tamanho da raiz no segundo e sexto dia após a inoculação, sendo que, nas sementes inoculadas com os isolados UFRGS Ms72 e Ms75, constataram-se os maiores valores de comprimento de raiz. O isolado de *Lotus corniculatus* usado nesse experimento como referência promoveu aumento no tamanho da raiz no sexto dia após a inoculação. Os isolados (UFRGS Ms75 e UFRGS Ms72) inoculados em sementes de arroz promoveram os maiores aumentos no comprimento da parte aérea das plântulas (Tabela 2). A promoção do crescimento de plântulas inoculadas com rizóbios promotores de crescimento foi descrita por BISWAS et al. (2000) e VARGAS et al. (2009).

Com relação à análise filogenética, a amplificação da região 16S do DNA ribossomal dos

rizóbios isolados de alfafa produtores de ácido indol-acético com os oligonucleotídeos 8F e 1492R foi de aproximadamente 1000bp para todas as bactérias sequenciadas (Tabela 3). Fragmentos com esse tamanho têm sido considerados suficientes para se realizar a identificação correta de procariotos (TRÜPER et al., 2006), por abranger quase todo o tamanho esperado do gene 16S do DNA ribossomal (WEISBURG et al., 1991).

A partir dos dados do sequenciamento dos nucleotídeos do fragmento obtido da amplificação da região 16S DNAr dos isolados mais eficientes avaliados nesse estudo e de representantes dos gêneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*, foi possível construir uma árvore filogenética (Figura 1). A análise filogenética das seqüências obtidas com as depositadas no banco de

Tabela 3 - Identificação de rizóbios isolados de alfafa produtores de ácido indol-acético pelo sequenciamento da região 16S DNAr.

Isolados	Comprimento do gene (pb)	Número de acesso	-----Organismos homólogos-----	
			Espécie	Identidade (%)
UFRGSMs55	1012	JF693274	<i>Rhizobium</i> sp.	100
UFRGSMs58	1004	JF693275	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99
UFRGSMs515	1017	JF693273	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99
UFRGSMs75	923	JF693278	<i>Rhizobium</i> sp.	100
UFRGSMs72	1008	JF693277	<i>Rhizobium</i> sp.	100
UFRGSMs195	985	JF693268	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99
UFRGSMs205	1012	JF693272	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99
UFRGSMs2010	978	JF693269	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99
UFRGSMs2012	983	JF693270	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99

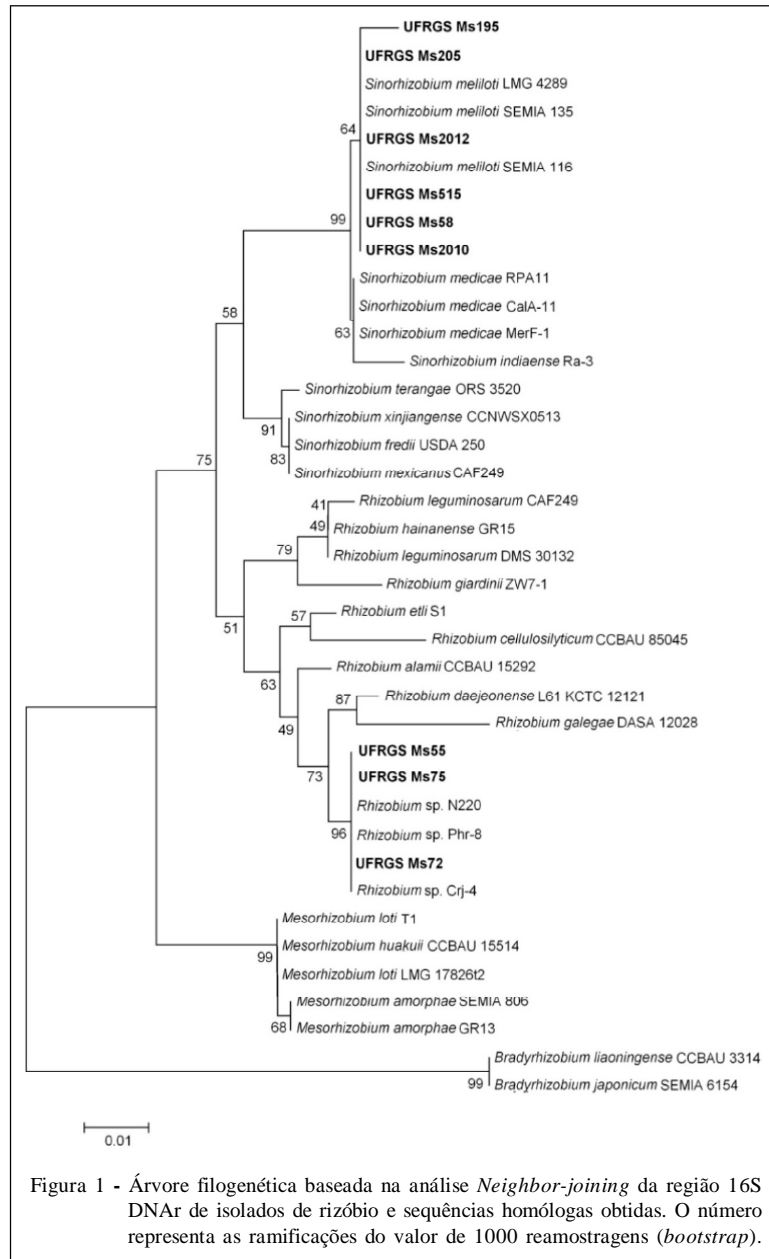


Figura 1 - Árvore filogenética baseada na análise *Neighbor-joining* da região 16S DNAr de isolados de rizóbio e sequências homólogas obtidas. O número representa as ramificações do valor de 1000 reamostragens (*bootstrap*).

dados do GenBank revelou que os isolados UFRGS Ms195, Ms2012, Ms515, Ms58 e Ms210 foram identificados como pertencentes à espécie *Sinorhizobium meliloti* e os isolados UFRGS Ms72, Ms75 e UFRGS Ms55 foram identificados como pertencentes ao gênero *Rhizobium* (Figura 1). A identificação do gênero *Rhizobium* para bactérias isoladas de nódulos de alfafa foi descrita por BROMFIELD et al. (2010).

CONCLUSÃO

Todos os micro-organismos testados produzem substâncias equivalentes ao ácido indol-

acético, sendo que a inoculação com rizóbios acelera o processo de germinação das sementes e o crescimento das plântulas de arroz. Os rizóbios UFRGS Ms58, UFRGS Ms515, UFRGS Ms195, UFRGS Ms205, UFRGS Ms2010 e UFRGS 2012 pertencem à espécie *Sinorhizobium meliloti* e os rizóbios UFRGS Ms55, UFRGS Ms72 e UFRGS Ms75 ao gênero *Rhizobium*.

REFERÊNCIAS

ASGHAR, H.N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.35, n.4, p.231-237, 2002. Disponível em: <http://

- www.scielo.br/revistas/cr/pinstruc.htm>. Acesso em: 13 jun. 2009. doi: 10.1007/s00374-002-0462-8.
- BANERJEE, M.R. Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. In: RAI, M.K. (Ed). **Handbook of microbial biofertilizers**. New York: Food Products, 2006. p.137-181.
- BISWAS, J. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v.92, n.5, p.880-886, 2000. Disponível em: <http://www.crops.org/publications/aj/articles/92/5/880>. Acesso em: 13 jun. 2009. doi: 10.2134/agronj2000.925880x.
- BROMFIELD, E.S.P. et al. *Ensifer*, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa) and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation. **Microbiology**, Madison, v.156, n.2, p.505-520, 2010. Disponível em: <http://mic.sgmjournals.org/content/156/2/505.short>. Acesso em: 05 jan. 2011. doi: 10.1099/mic.0.034058-0.
- CHAGAS Jr., A.F. et al. Produção de ácido indol-acético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v.56, n.6, p.812-817, 2009. Disponível em: <http://www.ceres.ufv.br/ceres/revistas/V56N006P54109.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2010.
- CHEN, X.C. et al. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.33, n.8, p.2540-2548, 2005. Disponível em: <http://nar.oxfordjournals.org/content/33/8/2540.full>. Acesso em: 12 mar. 2010. doi: 10.1093/nar/gki537.
- EDWARDS, U. et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes characterization of a gene coding for 16S-ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.17, n.19, p.7843-7853, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334891/>. Acesso em: 12 nov. 2005.
- GORDON, S.A.; WEBER, P.R. Colorimetric estimation of indolacetic acid. **Plant Physiology**, Moscow, v.26, n.1, p.192-195, 1951. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/content/26/1/192.full.pdf+html>. Acesso em: 03 mar. 2010. doi: 10.1104/pp.26.1.192.
- GUPTA, C. et al. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v.35, n.6, p.399-405, 2002. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/jrr4x4x81efu3nxk/>. Acesso em: 03 mar. 2010. doi: 10.1007/s00374-002-0486-0.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962. Disponível em: <https://www.soils.org/publications/cs/abstracts/2/2/CS0020020176>. Acesso em: 03 mar. 2010.
- MATIRU, V.N.; DAKORA, F.D. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in land races of African cereal crops. **African Journal Biotechnol**, Africa, v.3, n.1, p.1-7, 2004. Disponível em: <https://www.soils.org/publications/cs/abstracts/2/2/CS0020020176>. Acesso em: 03 mar. 2010.
- OSORIO FILHO, B.D. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- PALANIAPPAN, P. et al. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v.46, n.8, p.807-816, 2010. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/g385407120575151/>. Acesso em: 03 mar. 2010. doi: 10.1007/s00374-010-0485-5.
- PANDEY, P. et al. Rhizosphere competent *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 produces characteristic siderophore and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). **Current Microbiology**, New York, v.51, n.5, p.303-309, 2005. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/u31746546120318/>. Acesso em: 15 mar. 2010. doi: 10.1007/s00284-005-0014-1.
- PERRINE-WALKER, F.M. et al. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.58, n.12, p.3343-3350, 2007. Disponível em: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/58/12/3343.short>. Acesso em: 08 fev. 2010. doi: 10.1093/jxb/erm181.
- SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alfafa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.658-664, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782008000300010&script=sci_arttext>. Acesso em: 08 fev. 2010. doi: 10.1590/S0103-84782008000300010.
- TAMURA, K. et al. MEGA. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Amsterdam, v.24, n.8, p.1596-1599, 2007. Disponível em: <http://mbe.oxfordjournals.org/content/24/8/1596.short>. Acesso em: 08 fev. 2010. doi: 10.1093/molbev/msm092.
- TRÜPER, H.G. et al. The prokaryote characterization and identification. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The prokaryotes a handbook on the biology of bacteria**. 3.ed. New York: Springer Science, 2006. 959p.
- VARGAS, L.K. et al. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Piracicaba, v.33, n.5, p.1227-1235, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v33n5/v33n5a16.pdf>. Acesso em: 08 fev. 2010.
- WEISBURG, W.G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.173, n.2, p.697-703, 1991. Disponível em: <http://jb.asm.org/cgi/content/short/173/2/697>. Acesso em: 08 fev. 2010.