



¹Caracterização genética de rizóbios isolados de *Lotus corniculatus* L.

**Andréia Mara Rotta de Oliveira², Naylor Bastiani Perez³, Miguel Dall'agnol⁴,
Eliane Villamil Bangel⁵ e Gilmário da Silva⁶**

Resumo - Trinta e três isolados de *Rhizobium* sp obtidos a partir de nódulos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.), coletados em diferentes regiões do Rio Grande do Sul, foram caracterizados pela técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando oligonucleotídeos específicos para a amplificação de seqüências repetitivas Box. Os isolados apresentaram perfis de amplificação distintos entre si e das estirpes de *Mesorhizobium loti*, SEMIA 806 e SEMIA 816, atualmente recomendadas para a produção de inoculantes para cornichão. O índice de similaridade genética determinado pelo coeficiente de Jaccard variou entre 0,5 e 0,9% indicando uma grande variabilidade entre os isolados. A análise de agrupamento dos isolados demonstrou a formação de três grupos, não tendo sido possível estabelecer relação entre o perfil de amplificação, grupos formados e origem geográfica dos isolados.

Palavras-chave: Cornichão, Box-PCR, Fixação Biológica de Nitrogênio, *Rhizobium* sp., variabilidade genética.

Genetic characterization of Rhizobia isolated from *Lotus corniculatus* L.

Abstract - Thirty three *Rhizobium* sp isolates obtained from birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) collected on different regions of Rio Grande do Sul were characterized using Box-PCR. The isolates presented distinct amplification profiles among then, as well as from the isolates recommended nowadays for the production of birdsfoot trefoil inoculants, SEMIA 806 and SEMIA 816. The genetic similarity index, determined by the Jaccard coefficient, ranged from 0.5 to 0.9%, pointing out to a large genetic variability among the isolates. The cluster analysis isolates showed a formation of tree large groups and was not possible to establish a relationship among the amplification profiles, groups formed and geographic origin of the isolates.

Key words: Birdsfoot trefoil, *Rhizobium* sp., genetic variability.

¹ Trabalho desenvolvido pelo primeiro autor, durante o período de bolsa Recém - Doutor - CNPq.

² Bióloga. Dra. UERGS, Rua Inconfidentes, 395, CEP 93340-140, Novo Hamburgo - RS.

³ Pesquisador EMBRAPA-Pecuária Sul, Prof. Dr. UERGS, BR153, km595, Caixa Postal 242. E-mail: naylor@cppsul.embrapa.br

⁴ Engenheiro Agrônomo Dr. Depto. de Plantas Forrageiras, UFRGS, Caixa Postal 776, CEP 90130-060, Porto Alegre - RS

⁵ Médico Veterinário MSc. FEPAGRO, Rua Gonçalves Dias, 570, CEP 900130-060, Porto Alegre - RS

⁶ Técnico de Laboratório. FEPAGRO, Rua Gonçalves Dias, 570, CEP 900130-060, Porto Alegre - RS

Recebido para publicação em 18/03/2006



Introdução

O cornichão (*Lotus corniculatus* L.), leguminosa perene de clima temperado, tem grande importância para a região Sul do Brasil, por ser adaptado às condições edafoclimáticas e por suas características desejáveis para corte ou pastejo (ARAÚJO e JACQUES, 1974). Além disso, o cornichão é uma forrageira que se destaca por sua tolerância à acidez e à baixa fertilidade do solo, sendo muito utilizado em misturas de espécies de inverno e para introdução sobre o campo nativo, proporcionando uma melhor distribuição da forragem ao longo do ano e aumentando a qualidade e a produção de massa seca (SOSTER et al., 2004; BROSE, 1994).

Uma das principais justificativas para o uso e a manutenção de leguminosas em pastagens, reside na capacidade dessas em obter nitrogênio, via fixação simbiótica, o que torna possível melhorar a produtividade e a qualidade protéica da forragem, quando estabelecida uma simbiose eficiente planta-rizóbio (SCHEFFER-BASSO et al., 2002).

Do ponto de vista taxonômico, a determinação de espécies de rizóbio associadas à família *Lotus* ainda não está bem estabelecida. Porém, em *L. corniculatus*, tem sido demonstrado que a nodulação ocorre por *Mesorhizobium loti* sin. *Rhizobium loti*, (JARVIS et al., 1997; SULIVAN et al., 1996; BARAIBAR et al., 1999; KWON, et al., 2005).

O conhecimento da ecologia, da capacidade simbiótica e da variabilidade genética de populações nativas de rizóbio é um pré-requisito para a seleção de novas estirpes, uma vez que, por serem altamente competitivas, dificultam o estabelecimento e a permanência de estirpes selecionadas introduzidas através de inoculantes (YOUNG, 1985; BRONFIELD et al. 1995; PERES et al., 1993; VANCE e GRAHAM, 1995; BRADIC, 2003).

Diferentes métodos moleculares estão disponíveis para a caracterização genética.

A caracterização genética de rizóbios por métodos moleculares, como RAPD, REP-PCR e PCR-RFLP, tem demonstrado que estas bactérias diferem na estrutura intra e interespecífica de suas populações, possibilitando o entendimento da variabilidade fenotípica de populações de rizóbios (BRUIJN, 1992; LUNGE et al., 1994; LAGUERRE et al., 1996; CHUEIRE et al., 2000; ANDRONOV et al. 2003, OLIVEIRA et al., 2002).

Embora a importância da caracterização de rizóbios para a seleção de novas estirpes para *Lotus corniculatus* esteja bastante fundamentada, poucos estudos têm sido realizados no Brasil nesse sentido. Este trabalho teve por objetivo determinar a variabilidade genética de rizóbios noduladores de cornichão isolados de plantas coletadas em áreas experimentais e em campo nativo sob diferentes condições de sucessão de vegetação nativa, utilizando marcadores Box-PCR.

Material e métodos

Isolamento de rizóbios - Os isolados foram obtidos a partir de nódulos de raízes de plantas de cornichão, coletadas em áreas experimentais de plantio de cornichão na região Metropolitana de Porto Alegre e em campo nativo nas regiões da Campanha e Depressão Central do Rio Grande do Sul. As coletas foram realizadas no ano de 2002 em áreas sob diferentes condições de sucessão de vegetação nativa (Tabela 1). Os isolamentos foram realizados em meio de cultivo agarizado, contendo extrato de levedura e manitol YM (VINCENT, 1970), acrescido de vermelho congo.

Tabela 1 - Isolados de *Rizobium* sp analisados por Box-PCR

Estirpe/Isolados	Local – Histórico da Área de Coleta
¹ USDA 3471	³ ATCC 33669; ⁴ NZP 2213
² SEMIA 806	⁵ FEPAGRO
SEMIA 816	FEPAGRO
RLc 1	Rio Pardo/Campo Nativo
RLc 2	Faz. Alqueire/Rio Pardo/Campo Nativo
RLc 3	Faz. Alqueire/Rio Pardo/Campo Nativo
RLc 7	EEA/Eldorado do Sul/ Solo preparado
RLc 8	EEA/Eldorado do Sul/ Solo preparado
RLc 9	EEA/Eldorado do Sul/ Experim. pastejado
RLc 10	EEA/Eldorado do Sul/ Experim. pastejado
RLc 11	EEA/Eldorado do Sul/ Experim. pastejado
RLc 12	EEA/Eldorado do Sul/ Solo preparado
RLc 13	EEA/Eldorado do Sul/ Solo preparado
RLc 14	EEZ/São Gabriel/ Campo Nativo
RLc 15	EEZ/São Gabriel/ Campo Nativo
RLc 16	EEZ/São Gabriel/ Campo Nativo
RLc F2 A	EEZ/ São Gabriel/ Campo Nativo
RLc N1	EEZ/São Gabriel/ Campo Nativo
RLc N3	EEZ/São Gabriel/ Campo Nativo
RLc N2	EEZ/São Gabriel/ Campo Nativo
RLc M1	EEZ/São Gabriel/ Campo Nativo
RLc M4	EEZ/São Gabriel/ Campo Nativo
RLc M6	EEZ/São Gabriel/ Campo Nativo
RLc P2	Guatambú/D. Pedrito/ Campo Nativo
RLc P4	Guatambú/D. Pedrito/ Campo Nativo
RLc P1 C	Guatambú/D. Pedrito/ Campo Nativo
RLc CN1	Colônia Nova/ Campo Nativo
RLc CN3	Colônia Nova/ Campo Nativo
RLc F1	EEZ/ São Gabriel/ Campo Nativo
RLc F3	EEZ/ São Gabriel/ Campo Nativo
RLc V1A	Guatambú/ Dom Pedrito/ Campo Nativo
RLc V2A	Guatambú/ Dom Pedrito/ Campo Nativo
RLc V1B	Guatambú/ Dom Pedrito/ Campo Nativo
RLc V2B	Guatambú/ Dom Pedrito/ Campo Nativo
RLc V1	Guatambú/ Dom Pedrito/ Campo Nativo
RLc V3	Guatambú/ Dom Pedrito/ Campo Nativo

¹ USDA = United States Department of Agriculture

² SEMIA = Seção de Microbiologia Agrícola

³ ATCC= American Type Culture Collection

⁴ NZP = Culture Collection of the Department for Scientific and Industrial Research

⁵ FEPAGRO = Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária

Caracterização por Box-PCR - O DNA dos isolados foi extraído de acordo com o método de Boucher et al. (1987) e amplificado com o oligonucleotídeo iniciador Box A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), de acordo com o protocolo descrito por Bruijn

(1992), com modificações. As reações foram realizadas em um volume final de 25 ml, contendo 30 ng de DNA, 0,1 mM dNTPs (Amersham Pharmacia), 1,5 mM MgCl₂, 1 ml de BSA (0,085 mg/mL⁻¹), 1 mM do oligonucleotídeo iniciador, tampão de reação (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl), 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram desenvolvidas no termociclador Techne-Progene (Uniscience) com os seguintes ciclos: um ciclo inicial de 94°C, 7 min; 34 ciclos de 94°C, 1 min; 53°C, 1 min, e 65°C, 5 min; com um período de extensão final de 65°C, 10 min. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen), corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e documentados pelo sistema de fotodocumentação computadorizada EDAS 120 (Kodak).

Análise de agrupamento - As bandas produzidas por Box-PCR foram analisadas pelo programa NTSYS – pc 2.02 (ROHLF, 1990), para o qual foi determinada a similaridade genética utilizando o coeficiente de Jaccard e construídos os agrupamentos de acordo com o método UPGMA – Unweighted Pair-Group Method, arithmetic averages (CRISCI et al. 1983).

Resultados e discussão

A amplificação do DNA dos isolados com o oligonucleotídeo Box A1R (Figuras 1 e 2) gerou produtos entre 250 pb e 2.500 pb. A técnica de Box – PCR mostrou ser eficiente tanto para a diferenciação entre os isolados, quanto das estirpes atualmente recomendadas para a produção de inoculantes, SEMIAs 806 e 816 (Figura 1). Estes resultados se assemelham aos já obtidos por outros autores, que demonstraram que seqüências repetitivas BOX apresentam um grande poder de resolução para separarem isolados de rizóbio estreitamente relacionados (CHUEIRE et al., 2000; CARVALHO, 2003).

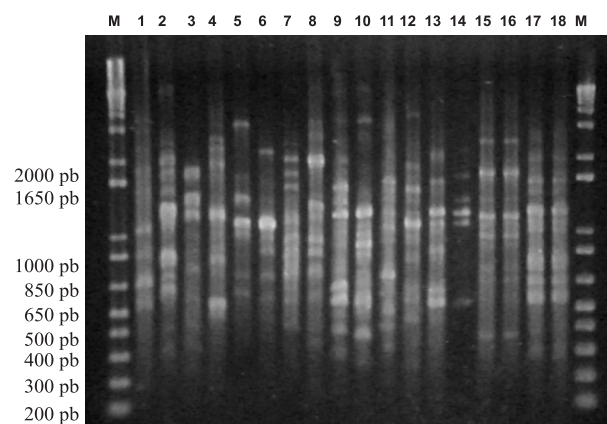


Figura 1 - Box PCR dos isolados. Marcador de peso molecular 1Kb Plus (M).1-18:USDA 3471,SEMIA 816,SEMIA 806, *RLc* 1, *RLc* 2, *RLc* 3, *RLc* 7, *RLc* 8, *RLc* 9, *RLc* 10, *RLc* 11, *RLc* 12, *RLc* 14, *RLc* F2A, *RLc* CN1, *RLc* V2B, *RLc* 15, *RLc* CN3.

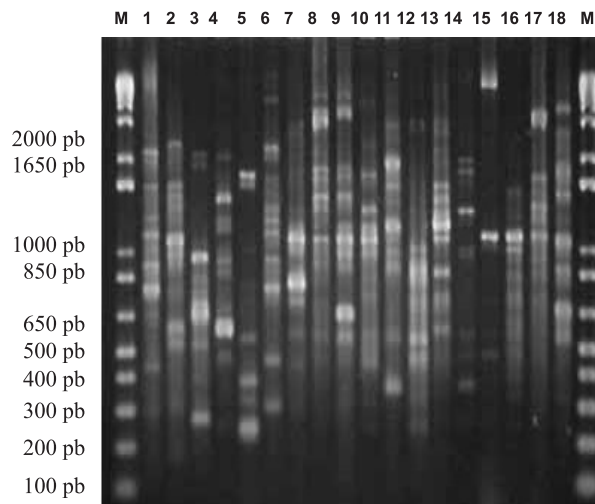


Figura 2 - Box PCR dos isolados. Marcador de peso molecular 1Kb Plus (M). 1-18: *RLc* V1, *RLc* F3, *RLc* M4, *RLc* P4, *RLc* 16, *RLc* V1B, *RLc* V1A, *RLc* P1C, *RLc* N3, *RLc* V2A, *RLc* 13, *RLc* V3, *RLc* N1, *RLc* M4, *RLc* N2, *RLc* M6, *RLc* F1, *RLc* P2.

Os isolados *RLc* CN1, proveniente de Colônia Nova, e *RLc* V2B, proveniente de Dom Pedrito, assim como *RLc* 15, de São Gabriel, e *RLc* CN3, de Colônia Nova, apresentaram perfis de amplificação idênticos entre si (Figura 1), sugerindo a possibilidade de uma origem comum. O isolado *RLc* 8, proveniente de Eldorado do Sul, apresentou um perfil bastante semelhante à estirpe SEMIA 816, atualmente recomendada para a produção de inoculantes para cornichão.

Além da possibilidade dos isolados serem variantes de uma mesma estirpe, a hipótese da transferência lateral de genes deve ser considerada, para os isolados que apresentaram o mesmo perfil de amplificação. Estudos demonstraram que a transferência lateral de genes tem contribuído de forma significativa para mudanças na estrutura genética de populações de rizóbios, aumentando sua diversidade ou tornando-as mais homogêneas (RAO et al.,1994; RUVKUN e AUSUBEL, 1980). Sullivan et al.(1995), em estudos realizados com estirpes de *R. loti*, isoladas de cornichão, constataram a transferência de genes simbióticos e de fixação do nitrogênio entre bactérias simbióticas nativas do solo, de estirpes que compunham inoculantes para populações nativas e destas últimas, para populações não-simbióticas. Utilizando a técnica de RFLP, os autores observaram a ocorrência de perfis idênticos entre as populações analisadas, quando hibridizadas com genes de fixação do nitrogênio.

A análise de agrupamento dos isolados demonstrou a formação de três grandes grupos, não tendo sido possível estabelecer relação entre estes e a origem geográfica dos isolados (Figura 3). O índice de similaridade genética determinado pelo coeficiente de Jaccard ficou entre 0,5 e 0,9% indicando uma grande variabi-

lidade genética entre os isolados. Considerando a similaridade dos isolados em relação à estirpe padrão USDA 3471 - *Mesorhizobium loti*, exceto os isolados RLC 16 e RLC N1 (0,5%), RLC V1A e RLC 3 (0,7%), todos apresentaram índices de similaridade igual ou acima de 0,8% (Figura 3).

Conclusão

Os isolados de rizóbio obtidos de nódulos de *Lotus corniculatus* (cornichão) de diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul, apresentam grande variabilidade genética e a maioria apresentou perfil de Box-PCR distinto das estirpes recomendadas para inoculação dessa leguminosa.

Referências

ANDRONOV, E. E.; Z. TEREFEWORK, M. L.; ROUMIANTSEVA, N. I.; DZYUBENKO, O. P.; ONICHTCHOUK, O. N.; KURCHAK, A.; DRESLER-NURMI, J.; YOUNG, P. W.; SIMAROV, B. V.; LINDSTRÖM, K. Symbiotic and Genetic Diversity of *Rhizobium galegae* Isolates Collected from the *Galega orientalis* Gene Center in the Caucasus. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.69, p.1067-1074, 2003.

ARAUJO, J. C. ; JACQUES, A. V. A. Características Morfológicas e Produção de Matéria Seca de Cornichão (*Lotus corniculatus* L.) Colhido em Diferentes Estádios de Crescimento e a Duas Alturas. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 3, n. 2, p. 138-147, 1974.

BARAIBAR, A.; FRIONI, L.; GUEDES M. E.; LJUNGGREN, H. Symbiotic Effectiveness and Ecological Characterization of Indigenous *Rhizobium loti* Populations in Uruguay. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 1011-1017, 1999.

BOUCHER C. A.; VAN GEANGIGSEGEM, F.; BARBERIS, B. A.; et al. *Pseudomonas solanacearum* Genes Controlling Both Pathogenicity on Tomato and Hipersensitivity on Tobacco are Clustered. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.169, p.5626-5632, 1987.

BRADIC, M.; SIKORA, S.; REDZEPOVIC, S.; STAFKA, Z. Genetic Identification of *Sinorhizobium meliloti*. **Food Technology and Biotechnology**, Croatia, v. 41, n. 1, p. 69-75, 2003.

BRONFIELD, E. S. P.; BARRAN, L. R.; WHEATCROFT, R. Relative Genetic Structure of a Population of *Rhizobium meliloti* Isolated Directly From Soil and From Nodules of Alfalfa (*Medicago sativa*) and Sweet Clover (*Melilotus alba*). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 4, p.183-188, 1995.

BROSE, E. Seleção de Rizóbio para Trevo-Branco em Solo Ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 281-285, 1994.

_____. Seleção de Rizóbio para *Lotus pedunculatus* em Solo Ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 409-415, 1992.

_____. Seleção de Rizóbio Tolerante a Al e Baixo pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 125-136, 1991.

BRUIJN. 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.

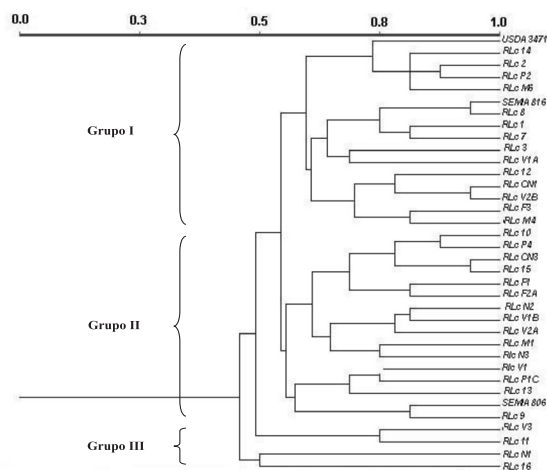


Figura 3 - Dendrograma baseado no método UPGMA, de acordo com perfis de amplificação gerados por BOX-PCR dos isolados de *Rhizobium* sp.

CARELLI, M.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; MENGONI, A.; PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; BAZZICALUPO, M. Genetic Diversity and Dynamics of *Sinorhizobium meliloti* Populations Nodulating Different Alfalfa Cultivars in Italian Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.11, p. 4785-4789, 2000.

CARVALHO, F.G. Variabilidade de Isolados de Estirpes de *Bradyrhizobium* spp Recomendadas para a Cultura da Soja. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 104 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das Estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* Utilizadas em Inoculantes Comerciais para as Culturas da Soja e do Feijoeiro pela Técnica de PCR com Primers Aleatórios ou Específicos. **Agricultura Tropical**, Cuiabá, v. 4, p. 80-95, 2000.

CRISCI, J. V.; ARMENGOL, M.F.L. **Introducción a la Teoría Práctica de la Taxonomía Numérica**. Washington: Secretaria General de la Organización de los Estados da Americanos, 1983. 131 p.

JARVIS B. D. W.; VAN BERKUM P.; CHEN W. X.; NOUR S. M.; FERNANDEZ M. P.; CLEYET MAREL J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 895-898, 1997.

KWON, S. W. ; PARK, J. Y.; CHO, Y. H.; LEE, G.B.; KIM, J. S.; KANG, J.W. ; LIM, C. K.; PARKER, M. A. Phylogenetic Analysis of the Genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the Basis of 16S rRNA Gene and Internally Transcribed Spacer Region Sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 55, n.1, p. 263-270, 2005.

LAGUERRE, G. et al. Typing of Rhizobia by PCR DNA Fingerprinting and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Chromosomal and Symbiotic Gene Regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its Different Biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2029-2036, 1996.

LUNGE, V. R.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S. K.; HIRIGROYEN, D.; STOLL, M.; BONATTO, S.; OZAKI, L.S. Identification and Inter-Re-

lationship Analysis 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.

OLIVEIRA, A. M. R.; BANGEL, E. V.; SÁ, E. S. de; et. al. Caracterização Genética de Rizóbios da Coleção de Culturas SEMIA. In: FERTBIO 2002, REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 25.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 9.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 7.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 4., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2002. 1 CD-ROM.

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, n.7, p. 2279-2285, 1996.

PEREIRA, J. C.; VIDOR, C.; LOVATO, P. E.; PENTEADO, A.F. Simbiose entre *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* Resistentes e Sensíveis a Antibióticos e Fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n.7, p.1097-1105, 1991.

PERES, J. R. R.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. Eficiência e Competitividade de Estirpes de Rizóbio para a Soja em Solos de Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 17, p. 357-363, 1993.

PEREZ, N. B.; DALLAGNOL, M.; DALBOSCO, M.; OLIVEIRA, A. M. R.; BANGEL, E. V.; MEYER, J. V.; SILVA, G. da. Caracterização e Seleção de Estirpes de Rizóbio em Plantas de Cornichão. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: INFOVIA, 2003. CD-ROM.

PEREZ, N.B. **Melhoramento Genético de Leguminosas de Clima Temperado**: Alfafa (*Medicago sativa* L.) e Cornichão (*Lotus corniculatus* L.) – para Aptidão ao Pastejo. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 175 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

RAO, J. R.; FENTON, M.; JARVIS, B. D. W. Symbiotic Plasmid Transfer in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and Competition Be-

tween the Inoculant Strain ICMP2163 and Transconjugant soil Bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 26, p. 339- 351, 1994.

ROHLF, F. J.; NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.02. Exeter Software, New York, N.Y. 1990.

RUVKUN, G. B.; AUSUBEL, F. M. Interspecies Homology of Nitrogenase Genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United State America**, Washington, v. 78, p. 229-233, 1980.

SCHEFFER-BASSO, S.M.; VENDRÚSCULO, M.C.; BAREA, K. et al. Comportamento de Leguminosas (*Adesmia*, *Lotus*, *Trifolium*) em Misturas com Festuca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.6, p.2197-2203, 2002.

SOSTER, M. T. B.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; DALL'AGNOL, M. Caracterização Morfofisiológica de Genótipos de Cornichão (*Lotus corniculatus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1654-1661, 2004.

SULLIVAN, J. T.; PATRICK, H. N.; LOWTHER, W. L.; SCOTT, D. B.; RONSON, C. W. Nodulating Strains of *Rhizobium loti* Arise Through Chromosomal Symbiotic Gene Transfer in the Environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United State America**, Washington, v. 92, p. 8985-8989, 1995.

_____; BERTRAND, D. E.; VAN BERKUM, P.; RONSON, C. W. Four Unnamed Species of Nonsymbiotic Rhizobia Isolated from the Rhizosphere of *Lotus corniculatus* **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 8, p. 2818-2825, 1996.

VANCE, C.P.; GRAHAM, P.H. Nitrogen Fixation in Agriculture: Application and Perspectives. In: TIKHONOVICH, I. A.; PROVOROV, N. A.; ROMANOV, V. I.; NEWTON, W.E. (Eds.). **Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications**. Netherlands: Kluwer, 1995. p.77-86.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p.

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.