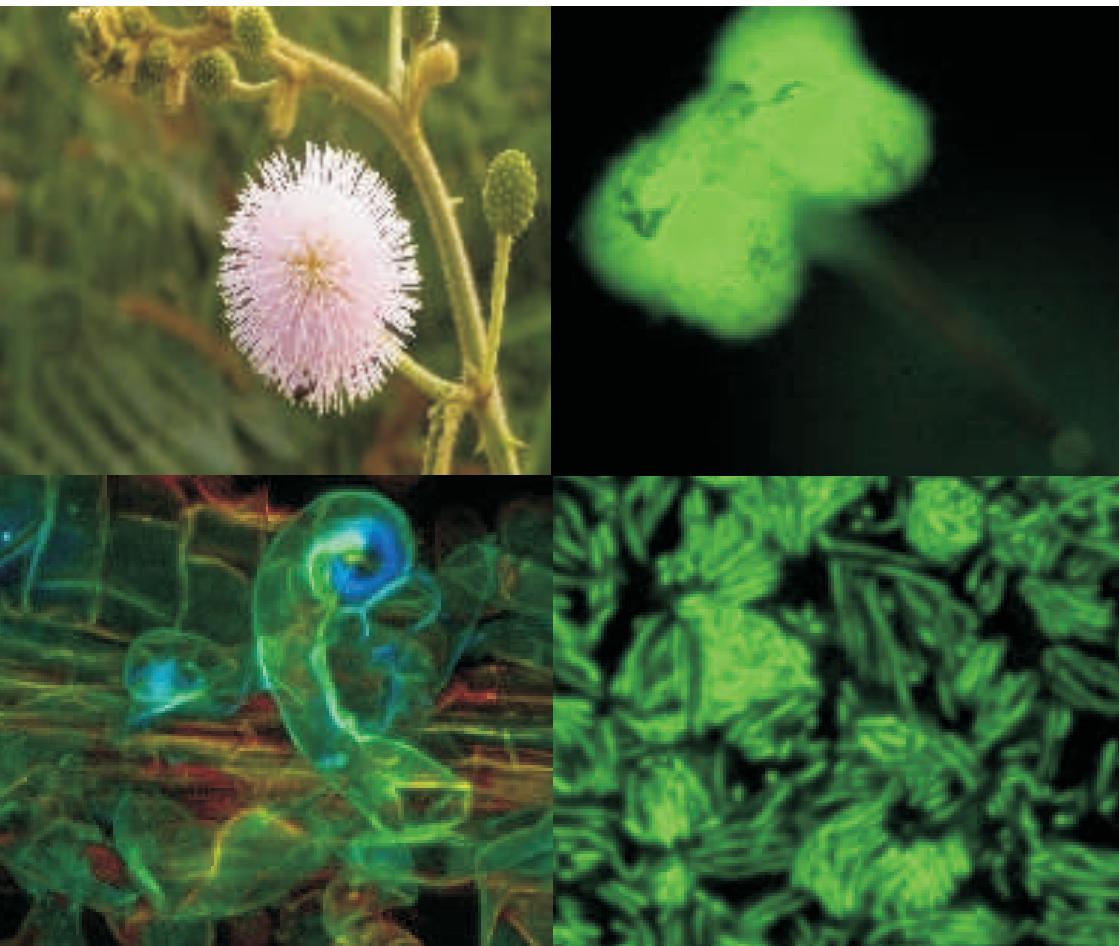


"Beta-Rizóbios": os novos simbiontes encontrados em espécies de *Mimosa*



Documentos 153

“Beta-Rizóbios”: os novos simbiontes encontrados em espécies de *Mimosa*

Fábio Bueno dos Reis Junior
Sérgio Miana de Faria
Ieda de Carvalho Mendes
Marcelo F. Simon
Maria de Fátima Loureiro
Geoffrey Nigel Elliot
Peter Young
Janet I. Sprent
Euan Kevin James

Planaltina, DF
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza
Caixa Postal 08223
CEP 73310-970 Planaltina - DF
Fone: (61) 3388-9898
Fax: (61) 3388-9879
<http://www.cpac.embrapa.br>
sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*
Secretária-Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Normalização bibliográfica: *Marilaine Schaun Pelufê*

Capa: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Fotos da capa: *Euan Kevin James*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Jaime Arbués Carneiro

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1^a edição

1^a impressão (2006): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação na publicação.
Embrapa Cerrados.

B562 "Beta-Rizóbios": os novos simbiontes encontrados em espécies de *Mimosa*/ Fábio Bueno dos Reis Junior ... [et al.]. Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2006.
20 p.— (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 153)

1. Leguminosa forrageira. 2. Simbiose. 3. *Rhizobium*.
I. Reis Junior, Fábio Bueno. II. Série.

633.3 - CDD 21

Autores

Fábio Bueno dos Reis Junior

D.Sc., Microbiologia do Solo - Pesquisador
Embrapa Cerrados
fabio@cpac.embrapa.br

Sérgio Miana de Faria

Ph.D., Microbiologia do Solo - Pesquisador
Embrapa Agrobiologia
Antiga Rodovia Rio/SãoPaulo, Km 47, Cx. Postal 74505
CEP 23851-970, Seropédica, RJ

Ieda de Carvalho Mendes

Ph.D., Microbiologia do Solo – Pesquisadora
Embrapa Cerrados
mendesi@cpac.embrapa.br

Marcelo F. Simon

M.Sc., Ecologia e Botânica - Pesquisador
Embrapa Sede
Parque Estação Biológica -PqEB S/N, Edifício Sede
Plano Piloto, Cx. Postal 040315

Maria de Fátima Loureiro

Ph.D., Microbiologia do Solo - Professora/Pesquisadora
Universidade Federal do Mato Grosso

Geoffrey Nigel Elliot

Ph.D., Genética - Bolsista de pós-doutorado da
Universidade de Dundee, Escócia

Peter Young

Ph.D., Genética - Professor/Pesquisador da
Universidade de York, Inglaterra

Janet I. Sprent

Ph.D., Biologia de Plantas - Professora Emérita da
Universidade de Dundee, Escócia

Euan Kevin James

Ph.D., Biologia de Plantas - Pesquisador da
Universidade de Dundee, Escócia

Apresentação

Neste documento são apresentados resultados de trabalhos recentes que mostram que as leguminosas do gênero *Mimosa*, de ampla distribuição e abundância no Cerrado, são capazes de nodular e formar simbiose com bactérias bem distintas daquelas que conhecemos como rizóbios. Esses estudos que desafiaram o velho dogma de que apenas *Rhizobium* e seus relativos poderiam nodular leguminosas são importantes para discussões sobre a ciclagem de N em ecossistemas como o Cerrado e também podem fornecer informações potencialmente relevantes sobre a diversidade de bactérias diazotróficas, a especificidade hospedeiro e a capacidade de fixação biológica de nitrogênio desses novos simbiontes.

Roberto Teixeira Alves
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

A importância e a diversidade da simbiose rizóbio-leguminosas	9
"Beta-rizóbios"	10
Mimosa e sua nodulação	12
Considerações Finais	15
Referências	15
Abstract	20

“Beta-Rizóbios”: os novos simbiontes encontrados em espécies de *Mimosa*

Fábio Bueno dos Reis Junior; Sérgio Miana de Faria; Ieda de Carvalho Mendes; Marcelo F. Simon; Maria de Fátima Loureiro; Geoffrey Nigel Elliot; Peter Young; Janet I. Sprent

A Importância e a Diversidade da Simbiose Rizóbio-leguminosas

O N₂ constitui 78% dos gases atmosféricos, difundindo-se, também, para o espaço poroso do solo. Apesar disso, nenhum animal ou planta consegue utilizá-lo como nutriente, devido à tripla ligação existente entre os dois átomos de N, ligação essa tida como uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza. A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) é considerada, após a fotossíntese, o mais importante processo biológico do planeta, e uma parte crucial do ciclo do nitrogênio baseia-se no fato de que alguns microrganismos especiais são capazes de transformar o nitrogênio atmosférico (N₂) em amônia (NH₃), uma substância assimilável pelas plantas. Essa reação é catalisada pela enzima nitrogenase. Essa enzima é encontrada em número limitado de espécies de microrganismos, conhecidos como microrganismos diazotróficos ou fixadores de nitrogênio ([YOUNG, 1992](#)). Dentre os microrganismos que possuem a nitrogenase, aquelas bactérias formadoras de nódulos nas raízes de várias leguminosas, conhecidas genericamente por rizóbios, são tidas como os principais fixadores de nitrogênio atmosférico ([CLEVELAND et al., 1999](#)).

As proteobactérias constituem o maior e o mais diverso grupo de bactérias cultivadas, sendo subdivididas em: alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ) e epsilon (ε) ([BROCK et al., 1994](#)). Há alguns anos, acreditava-se que as leguminosas eram noduladas exclusivamente por membros das α-proteobactérias. Essas bactérias seriam pertencentes a alguns gêneros relacionados à ordem Rhizobiales, incluindo *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* ([YOUNG, 1996](#); [VAN BERKUN; EARDLY, 1998](#)). Em

estudos recentes, entretanto, outras α -proteobactérias foram identificadas como noduladoras de leguminosas ([MOULLIN et al., 2002](#)) incluindo estirpes de *Methylobacterium* ([SY et al., 2001](#)), *Blastobacter* ([VAN BERKUN; EARDLY, 2002](#)) e *Devosia* ([RIVAS et al., 2002](#)).

“Beta-rizóbios”

Recentemente, membros das β -proteobactérias foram descobertos em nódulos de leguminosas tropicais e passaram imediatamente a ser conhecidos como os “ β -rizóbios” ([MOULIN et al., 2002](#)).

Dentre os “ β -rizóbios”, bactérias da espécie *Cupriavidus taiwanensis* ([VANDAMME; COENYE, 2004](#)), originalmente classificadas como *Ralstonia taiwanensis* ([CHEN et al., 2001](#)), foram isoladas de nódulos de *Mimosa pudica* e *M. diplosticha* nos trabalhos desenvolvidos por [Chen et al. \(2001\)](#) e [Verma et al. \(2004\)](#).

Em um trabalho com espécies vegetais coletadas na África do Sul e na Guiana Francesa, [Moulin et al. \(2001\)](#) também isolaram, a partir dos nódulos das leguminosas *Aspalathus carnosa* e *Machaerium lunatum*, estirpes de bactérias do gênero *Burkholderia*, incluído na subdivisão β das proteobactérias. Outras estirpes de *Burkholderia* também foram isoladas de nódulos de *Mimosa casta*, *M. pellita*, *M. pudica* e *Abarema macradenia* no Panamá ([BARRETT; PARKER, 2005](#)). [Chen et al. \(2005\)](#) apresentaram um estudo no qual 20 estirpes isoladas de nódulos de várias espécies de *Mimosa* na América do Sul foram classificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* e são intimamente relacionadas com outras espécies nodulantes desse gênero, como *B. caribensis*, *B. phymatum* e *B. tuberum*. Em um estudo taxonômico feito por [Vandamme et al. \(2002\)](#), confirmou-se que os isolados de nódulos obtidos por [Moulin et al. \(2001\)](#) pertenciam ao gênero *Burkholderia*, sendo classificados como as espécies recém-descritas, *B. tuberum* e *B. phymatum*, enquanto dois isolados de nódulos de *Mimosa diplosticha* e *M. pudica* pertenciam a *B. caribensis*.

A fixação de nitrogênio aparenta ser comum em *Burkholderia* ([ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001](#)) e várias espécies desse gênero têm sido encontradas em associação com diversas plantas, como *B. vietnamensis* ([GILLIS et al., 1995](#)) e as supostas endofíticas-diazotróficas, *B. brasiliensis* e *B. tropicalis*, isoladas respectivamente do arroz e cana-de-açúcar ([BODDEY et al., 2003](#)).

[Moulin et al. \(2001; 2002\)](#), [Chen et al. \(2001; 2005\)](#), [Vandamme et al. \(2002\)](#), [Verma et al. \(2004\)](#) e [Barrett e Parker \(2005\)](#) sugerem, em seus estudos, que os “ β -rizóbios”, possam ser comuns em nódulos de leguminosas tropicais. [Chen et al. \(2001\)](#), estudando bactérias isoladas de nódulos de *Mimosa diplotricha* e *M. pudica*, mostraram que 94% dos 190 isolados analisados foram classificados como “ β -rizóbios”, sendo a grande maioria pertencente à espécie *C. taiwanensis*.

Contudo, nenhum dos isolados de *Mimosa*, proveniente das Américas e avaliado por [Barrett e Parker \(2005\)](#) e [Chen et al. \(2005\)](#), foi classificado como sendo do gênero *Cupriavidus*. Entretanto, *C. taiwanensis* é altamente dominante em Taiwan ([CHEN et al., 2001; 2003 a, b](#)) e possivelmente na Índia ([VERMA et al., 2004](#)). Com base nessas informações, pode-se sugerir que *C. taiwanensis* seja uma espécie que ocorra apenas na Ásia e como essas plantas não são nativas de Taiwan poderiam ter-se utilizado de bactérias nativas do solo local para sua nodulação. [Chen et al. \(2005\)](#) sugerem que novos estudos devam ser feitos para confirmar hipóteses como essa, além de comparar os “ β -rizóbios” isolados nas Américas com aqueles de outros continentes.

Apesar de esses estudos desafiarem o velho dogma de que apenas *Rhizobium* e seus relativos poderiam nodular leguminosas, evidências conclusivas de que “ β -rizóbios” podem ser simbiontes ativos em seu hospedeiro já foram apresentadas em novos trabalhos. [Chen et al. \(2003a\)](#) mostraram, utilizando microscopia confocal de varredura laser (CLSM), microscópio óptico e microscópio eletrônico que uma estirpe transconjugante de *C. taiwanensis*, expressando a proteína verde fluorescente *gfp*, pode infectar, nodular e fixar N₂ em *Mimosa* spp. Esses autores também mostraram que a infecção foi via pêlos radiculares e que os nódulos foram desenvolvidos e estruturados similarmente àquelas leguminosas mimosoídeas infectadas por rizóbios convencionais. Trabalho semelhante foi realizado por [Chen et al. \(2005\)](#) que utilizaram duas variantes geneticamente modificadas de estirpes de *Burkholderia* isoladas de nódulos de *Mimosa* spp. da América do Sul. Essas estirpes foram marcadas com o gene marcador *gfp*, a fim de se comprovar, definitivamente, que bactérias do gênero *Burkholderia* são simbiontes funcionais de *Mimosa*.

[Moulin et al. \(2002\)](#) sugerem que os “ β -rizóbios” podem ter adquirido seus genes *nod* dos “ α -rizóbios”. Tendo em vista que as seqüências β caem em duas classes diferentes, é provável que essas estirpes de β -proteobacteria que nodulam com *Mimosa* spp. tenham obtido seus genes *nod* via múltiplas transferências horizontais de genes de “ α -rizóbios” ([MOULIN et al., 2002; CHEN et al., 2003a](#)).

Portanto, é possível que outras bactérias, que não sejam “ α -rizóbios” e sejam capazes de nodular, possam ser isoladas de nódulos de leguminosas ([SPRENT, 2001](#)). Imaginando que a preferência de espécies pantropicais como *M. diplosticha* e *M. pudica* ([CHEN et al., 2001; MOULIN et al., 2002](#)) seja pela simbiose com essas bactérias recentemente descobertas, acredita-se que sua abundância possa ser maior que a dos “ α -rizóbios” convencionais ([CHEN et al., 2003b](#)).

Em dois diferentes “ β -rizóbios”, isto é, *C. taiwanenses* estirpe LMG 19424 e *B. phymatum* estirpe STM 815, os genes *nodA* e *nifH* estão localizados em um plasmídeo de 500kb ([CHEN et al., 2003a](#)). Isso é similar ao que ocorre em “ α -rizóbios” em que os genes de simbiose são freqüentemente agrupados em um plasmídeo. Entretanto, todos os plasmídeos de simbiose conhecidos em “ α -rizóbio” pertencem ao tipo de replicação *repABC*, e os plasmídeos de simbiose desse tipo não foram encontrados ainda fora das α -proteobactérias.

Mimosa e sua nodulação

O gênero *Mimosa* é amplo e complexo, englobando aproximadamente 500 espécies, sendo a maioria encontrada nas Américas. O maior centro de diversidade desse gênero é o Brasil central onde muitas espécies podem ser observadas nas vegetações da Caatinga e do Cerrado, onde é o gênero mais rico em espécies ([MENDONÇA et al., 1998](#)). O Bioma Cerrado é também um importante centro de endemismo para plantas desse gênero ([SIMON; PROENÇA, 2000](#)).

O porte das plantas de *Mimosa* spp. varia de árvores altas, arbustos a ervas. Suas espécies ocupam grande variedade de *habitats*, do seco ao úmido, crescendo em muitos solos diferentes. [Barneby \(1991\)](#) agrupou as espécies encontradas nas Américas em cinco seções, quatro das quais são divididas em séries e subséries. Espécies noduladoras são encontradas em todas as seções do gênero ([BARNEBY, 1991; SPRENT, 2001](#)).

Não obstante o tamanho e a importância ecológica potencial dessa espécie como noduladora, existem ainda poucos estudos sobre o processo de nodulação e de fixação de N₂ no gênero *Mimosa*, exceto nas espécies arbóreas, *M. caesalpiniifolia* e *M. scabrella* as quais vêm sendo avaliadas para o uso em recuperação de áreas degradadas no Brasil, particularmente, em áreas que foram devastadas por atividades de mineração ([FRANCO; FARIA, 1997](#)).

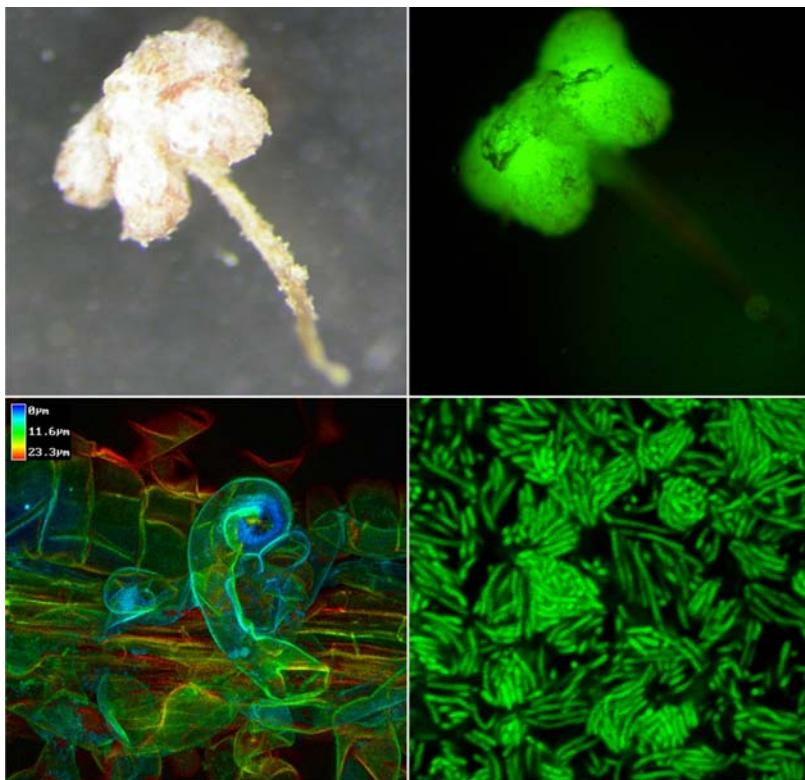
Apesar de já se saber que *Mimosa* pode nodular com uma variedade de rizóbios ([ALLEN; ALLEN, 1981](#); [TRINICK, 1980](#)), poucos foram classificados e até o ano 2000, todos eram considerados “ α -rizóbios”. Isso inclui estirpes oriundas de *M. invisa* e *M. pudica*, isoladas nas Filipinas, que foram relatadas como *R. leguminosarum*, *Rhizobium sp.* e *B. japonicum* ([OYAIU et al., 1993](#)), um novo biovar de *Rhizobium etli* (bv. *Mimosae*), isolado da *M. affinis* que cresce perto de campos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) no México ([WANG et al., 1999](#)) e outras estirpes de *Rhizobium sp.* isoladas de *M. foliculosa*, *M. malacocentra* e *M. polystachya* no Brasil ([MOREIRA et al., 1993](#)). Entretanto, foi observado que, mesmo apresentando propensão à nodulação, nenhuma *Mimosa* spp., testada nos trabalhos de [Pueppke e Broughton \(1999\)](#) e [Trinick \(1980\)](#), formou nódulos quando inoculada com a estirpe NGR234 de *Rhizobium sp.*, reconhecida por seu amplo espectro de planta hospedeira. Deve-se levar em conta, porém, que os critérios clássicos de identificação de bactérias, como taxa de crescimento e produção de ácidos, não distinguem claramente “ α -rizóbio” de outras bactérias. Por isso, acredita-se que seja comum que muitas coleções de culturas de rizóbio podem incluir, sem que sejam conhecidos, outros gêneros tanto de α - quanto de β -proteobactéria.

Recentemente, foi feito novo exame de quatro estirpes noduladoras de *Mimosa* da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia previamente catalogadas como *Rhizobium* sp. Utilizando-se de seqüências de 16S rRNA, foi mostrado que essas estirpes pertenciam de fato ao gênero *Burkholderia* ([CHEN et al., 2005](#)). Essas estirpes são: Br3454 de *M. scabrella*, Br3407 de *M. caesalpiniifolia*, Br 3467 de *M. camporum* e Br3461 de *M. bimucronata*. Essas quatro espécies de *Mimosa* spp. são encontradas no Cerrado e têm demonstrado grande habilidade de fixação de N₂ ([FRANCO; FARIA, 1997](#)). Além disso, como mostrado por [Faria et al. \(1988\)](#), a estirpe Br3454 pode infectar *M. scrabella* via processo epidermal, o que ainda não foi demonstrado em qualquer interação convencional entre leguminosas e “ α -rizóbio”.

Além do trabalho de [Sprent et al. \(1996\)](#), principalmente com o gênero *Chamaecrista*, poucos estudos avaliaram a contribuição de leguminosas para os reservatórios de N do Cerrado e, na maioria dos casos, a efetividade da simbiose entre leguminosas e seus microssimbiontes não foi testada. É importante avaliar esses aspectos por duas razões: (i) as simbioses de leguminosas são reconhecidas como as principais contribuidoras da fixação biológica de nitrogênio diante do ciclo de N em ecossistemas naturais ([CLEVELAND et al., 1999](#)), e a manutenção da sua diversidade é essencial para a

preservação e o manejo da vegetação nativa; (ii) no futuro, como tentativas de recuperação de áreas degradadas, presentes em grande parte do Cerrado, seria desejável utilizar-se de leguminosas que são nativas da região e que foram demonstradas como sendo eficientes fixadoras de nitrogênio sob condições de deficiência de nutrientes ([FRANCO; FARIA, 1997](#); [SPRENT; PARSONS, 2000](#)).

Na Figura 1, são apresentados alguns exemplos que comprovam a existência de simbiose entre as leguminosas do gênero *Mimosa* com os “ β -rizóbios”.



Fotos: Dr. Euan Kevin James

Figura 1. (A) Nódulos de *Mimosa pigra* (syn. *M. pellita*) inoculada com uma estirpe de *Burkholderia* sp. marcada com o gene *gfp*; (B) Nódulos de *Mimosa pigra* inoculados com uma estirpe de *Burkholderia* marcada com o gene *gfp* sob fluorescência; (C) Microscopia Confocal Laser mostrando o início do processo de nodulação (encurvamento do pelo radicular) em *Mimosa pudica* inoculada com *Cupriavidus (Ralstonia) taiwanensis*; (D) Microscopia Confocal Laser de bacterióides (*Burkholderia* sp.) expressando o gene *gfp* em nódulo de *Mimosa pigra*.

Considerações Finais

Baseado no conhecimento atual, trabalhos futuros envolvendo a associação entre leguminosas e os “ β -rizóbios” deveriam buscar respostas para algumas questões relevantes, como:

1. “ β -rizóbios” são comuns em nódulos de leguminosas tropicais, assim como no gênero *Mimosa*?
2. “ β -rizóbios” interagem com seus hospedeiros de maneira similar aos “ α -rizóbios”?
3. Leguminosas infectadas com “ β -rizóbios” contribuem significativamente com o montante de nitrogênio fixado em seus ecossistemas?
4. “ β -rizóbios” evoluíram como o resultado de transferência horizontal de genes de α -proteobactéria para β -proteobactéria?

A simbiose leguminosa-rizóbio é uma das interações mais estudadas entre eucaritos e procariotos. Contudo, a maior parte das informações deriva de estudos envolvendo plantas de clima temperado, produtoras de grãos, e seus simbiontes “ α -rizóbios”. Porém, novas avaliações em ecossistemas naturais, particularmente nos trópicos, têm demonstrado grande diversidade de simbiontes, alguns dos quais com propriedades bem distintas. Por meio da FBN, esses ecossistemas podem contribuir para uma fração significativa do fluxo global de nitrogênio. Esses estudos são importantes para o conhecimento da ciclagem de N nesses sistemas, da diversidade desses organismos, da especificidade hospedeira e da performance dos “novos rizóbios”.

Referências

- ALLEN, O. C.; ALLEN, E. K. **The leguminosae**: a source book of characteristics, uses and nodulation. Madison: The University of Wisconsin Press, 1981. 813 p.
- BARNEBY, R. **Sensitivae censitae**: a description of the genus *Mimosa* L. (Mimosaceae) in the New World. Bronx: The New York Botanical Garden, 1991. 835 p. (Memoirs of the New York Botanical Garden, 65).

- BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n.1, p. 57–65, 2005.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 139–149, 2003.
- BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microrganisms**. 7th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1994. 909 p.
- CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1729-1735, 2001.
- CHEN, W. M.; JAMES, E. K.; PRESCOTT, A. R.; KIERANS, M.; SPRENT, J. I. Nodulation of *Mimosa* spp. by the B-Proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 16, n. 12, p. 1051-1061, 2003a.
- CHEN, W. M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOIVIN-MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by B-proteobacteria is widespread in the nature. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 7266-7272, 2003b.
- CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; STRALIOTO, R.; PITARD, R. M.; ARAÚJO, J. L. S.; CHOU, J. H.; CHOU, Y. J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOT, G. N.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7461-7471, 2005.
- CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R.; SCHIMEL, D. S.; FISHER, H.; HOWARTH, R. W.; HEDIN, L. O.; PERAKIS, S. S.; LATTY, E. F.; VON FISCHER, J. C.; ELSEROAD, A.; WASSON, M. F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 13, p. 623-645, 1999.
- ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2790-2798, 2001.
- FARIA, S. M. de; HAY, G. T.; SPRENT, J. I. Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Bentham occurs between epidermal cells. **Journal of General Microbiology**, London, v. 134, p. 2291-2296, 1988.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. de. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 29, p. 897-903, 1997.

GILLIS, M.; VAN, T. V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 274-289, 1995.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T; SILVA, M. C.; REZENDE, A. R.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora Vascular do Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1998. p. 286-556.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, p. 135-146, 1993.

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

MOULIN, L.; CHEN, W. M.; BÉNA, G.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Rhizobia: the family is expanding. In: FINAN, T. M.; O'BRIAN, M. R.; LAYZELL, D. B.; VESSEY, J. K.; NEWTON, W. **Nitrogen fixation: global perspectives**. Oxon: CAB International, 2002. p. 61-65.

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.

PUEPPKE, S. G.; BROUGHTON, W. J. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 12, p. 293-318, 1999.

RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 5217-5222, 2002.

- SIMON, M. F.; PROENÇA, C. Phytoogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? **Biological Conservation**, Essex, v. 96, p. 279-296, 2000.
- SPRENT, J. I. **Nodulation in legumes**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2001. 158 p.
- SPRENT, J. I.; GEOGHEGAN, I. E.; WHITTY, P. W.; JAMES, E. K. Natural abundance of ^{15}N and ^{13}C in nodulated legumes and other plants in the cerrado and neighbouring regions of Brazil. **Oecologia**, Berlin, v. 105, p. 440-446, 1996.
- SPRENT, J. I.; PARSONS, R. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 183-196, 2000.
- SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylotrophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 214-220, 2001.
- TRINICK, M. J. Relationships among the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* sp., *Acacia farnesiana*, and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobia groups. **Journal of Applied Bacteriology**, London, 49: 39-53, 1980.
- VAN BERKUM, P.; EARDLY, B. D. Molecular Evolutionary Systematics of the Rhizobiaceae. In: SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. (Ed.). **The rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 1-24.
- VAN BERKUM, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1132-1136, 2002.
- VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 54, p. 2285-2289, 2004.
- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, p. 507-512, 2002.
- VERMA, S. C.; CHOWDHURY, S. P.; TRIPATHI, A. K. Phylogeny based on 16S rDNA and *nifH* sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing

nodules of *Mimosa pudica*, in India. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 313–322, 2004.

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

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 43-86.

YOUNG, J. P. W. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. **Plant & Soil**, The Hague, v. 186, p. 45-52, 1996.

“Beta-Rhizobia”: the new symbionts found with *Mimosa* specie

Abstract - *The fixation and transformation of atmospheric dinitrogen into ammonia and hence into organic compounds is a crucial part of the nitrogen cycle. Nitrogenase, the enzyme responsible, has a wide taxonomic distribution in the bacteria and archaea, but is confined to a limited number of species. Among these, rhizobia, which form nodules on the roots of legumes, are recognised as the main contributors of biologically-fixed nitrogen. Until recently, it has been generally accepted that legumes are nodulated exclusively by members of the α-proteobacteria belonging to a number of related genera in the family Rhizobiaceae. In this document we review some results from recent studies that presents the newly-discovered β-rhizobia which challenge the accepted century-old dogma that only *Rhizobium* and its relatives can nodulate legumes and provide a biodiversity dimension that was totally unexpected 6 years ago.*

Index terms: biological nitrogen fixation, microbial diversity, *Burkholderia* spp.