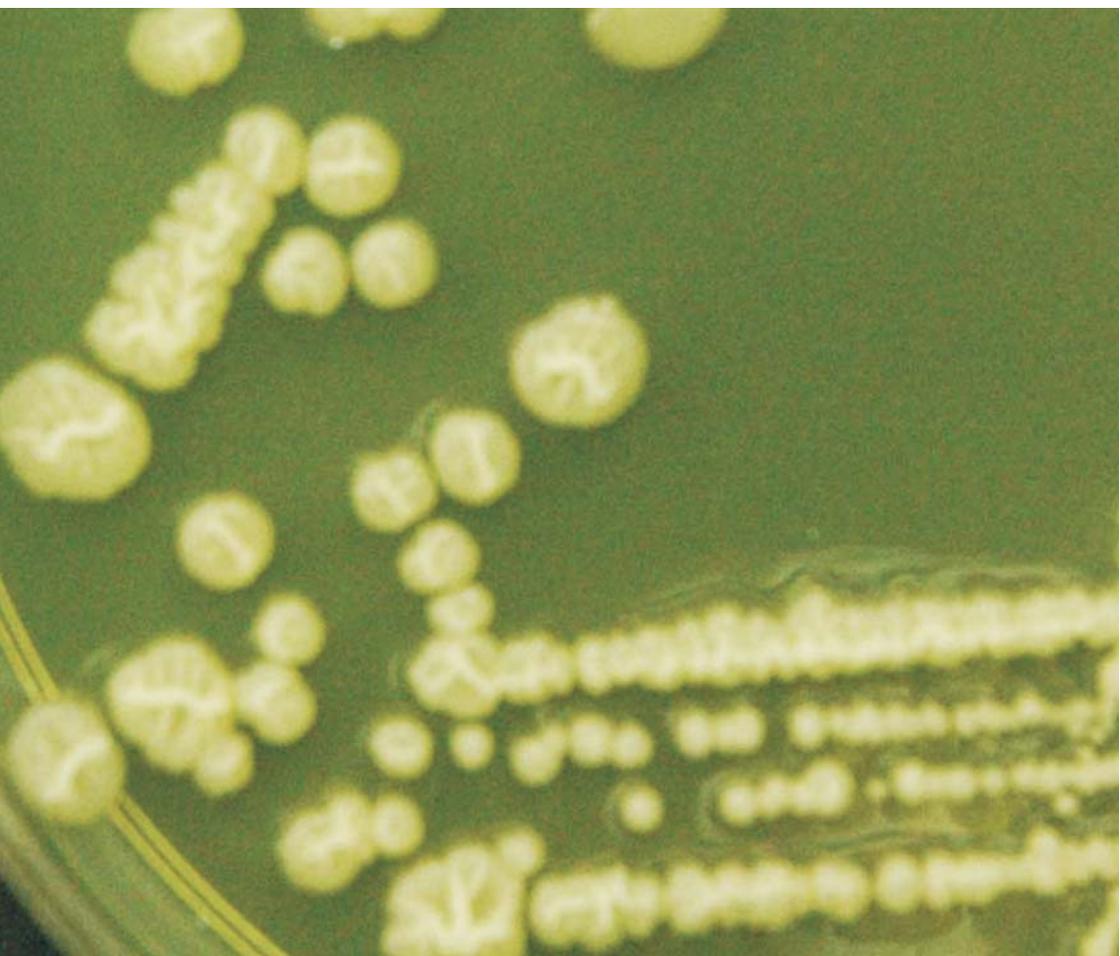


Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum*



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 273

Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum*

*Veronica Massena Reis
Raúl Osvaldo Pedraza
Kátia Regina dos Santos Teixeira*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.851-970, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executivo: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Bruno José Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme

Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Rosa Maria Pitard

1ª edição

1ª impressão (2010): 50 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).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

R375d REIS, Veronica Massena

Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum*. / Veronica Massena Reis, Raúl Osvaldo Pedraza e Kátia Regina dos Santos Teixeira. / Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 20 p. Embrapa Agrobiologia. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 273).

ISSN: 1980-3075

1. *Azospirillum*. I. Pedraza, Raúl Osvaldo. II. Teixeira, Kátia Regina dos Santos. III. Título. IV. Embrapa Agrobiologia. V. Série.

579.323 CDD 23. Ed.

Autores

Veronica Massena Reis

Embrapa Agrobiologia

BR 465, Km 7, CEP 23890-000. Seropédica, RJ.

E-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

Raúl Osvaldo Pedraza

Faculdade de Agronomia e Zootecnia.

Universidade Nacional de Tucumán.

Av. Roca 1900 (4000) Tucumán, Argentina.

E-mail: rpedraza@herrera.unt.edu.ar

Kátia Regina dos Santos Teixeira

Embrapa Agrobiologia

BR 465, Km 7, CEP 23890-000. Seropédica, RJ.

E-mail: katia@cnpab.embrapa.br

Apresentação

As atitudes de usar com responsabilidade os recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia), de preservar e conservar a natureza são cada vez mais necessárias para a sociedade moderna acarretando em uma busca constante por sistemas de produção agropecuários apoiados em princípios ecológicos e naturais.

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia construiu o seu atual plano diretor de pesquisa, desenvolvimento e inovação, com a seguinte missão: “gerar conhecimentos e viabilizar tecnologias e inovação apoiados nos processos agrobiológicos, em benefício de uma agricultura sustentável para a sociedade brasileira”.

A série documentos nº 273 descreve as principais espécies de bactérias do gênero *Azospirillum* relacionando aspectos ambientais que limitam o crescimento destes microrganismos com as técnicas de cultivo *in vitro*. A diversidade de espécies descritas que ocorrem em diferentes regiões do mundo, o uso potencial destas bactérias na agricultura e as relações entre os diferentes grupamentos genéticos que compõe as espécies do gênero *Azospirillum*, também são alguns dos aspectos abordados e revistos neste trabalho. Esta publicação tem a finalidade de informar estudantes, técnicos, professores e pesquisadores interessados no assunto.

Eduardo Francia Carneiro Campello
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

Sumário

Introdução	9
Descrição do gênero <i>Azospirillum</i> e suas espécies	10
Variabilidade no uso de fontes de carbono	12
Diversidade e relações filogenéticas	13
Considerações finais	16
Referências Bibliográficas	17

Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum*

Veronica Massena Reis

Raúl Osvaldo Pedraza

Kátia Regina dos Santos Teixeira

Introdução

A descoberta da primeira espécie de bactérias fixadoras de nitrogênio pertencente ao gênero *Azospirillum* foi devido ao uso de um meio semissólido contendo diversos sais, fonte de carbono, porém sem adição de nitrogênio. A aplicação desta condição de microaerofilia tem sido utilizada até hoje como estratégia para o isolamento e caracterização de diversas bactérias dessa e outras espécies que são consideradas capazes de fixar nitrogênio em condições que se adapta para a melhor taxa de dissolução de O_2 . Esta característica permite que certo número de bactérias use o oxigênio necessário para o seu crescimento sem que este elemento seja limitante para que ocorra a síntese da nitrogenase e que a atividade desta enzima não seja reprimida. Neste caso, é possível observar a formação de um biofilme (chamado comumente de película) que se move em direção à superfície do meio ao mesmo tempo em que o número de indivíduos é multiplicado e a demanda de oxigênio aumenta. O ajuste entre o número de células e a demanda de oxigênio ocorre pela migração desta película ao longo do gradiente de oxigênio no meio semissólido, sendo este fenômeno conhecido como aerotaxia. Após esta descoberta, diversos gêneros e outras espécies de bactérias capazes de fixar nitrogênio foram descritos após isolamento com uso da mesma estratégia, ou seja, desenvolvimento de outros meios de cultivo do tipo semissólido.

Descrição do gênero *Azospirillum* e suas espécies

Para sumarizar podemos dizer que o gênero *Azospirillum* engloba bactérias Gram-negativas que pertencem à subdivisão - proteobacteria. São bactérias aeróbicas, não-fermentativas, vibróides, e que em sua grande maioria atuam como promotores de crescimento vegetal, seja pela sua capacidade de fixar nitrogênio, produzir diversos fitohormônios (especialmente auxinas), produzir sideróforos e realizar outros processos que promovem o uso mais eficiente de nutrientes pelos vegetais (ex. solubilização de fosfato, produção de ácidos orgânicos, etc). Até o momento, 15 espécies de *Azospirillum* foram descritas, mas em termos de fisiologia e genética, as mais estudadas são *A. lipoferum* e *A. brasilense* descritas por Tarrand et al. em 1978. Estas duas espécies são abundantes, normalmente encontradas em áreas tropicais, associadas com forrageiras, cereais como milho, arroz, trigo, sorgo além de outras poaceas como a cana-de-açúcar e de diversas plantas de outras famílias (HARTMAN e BALDANI, 2006; ZAMBRANO et al., 2007). Embora normalmente encontrado colonizando plantas, existem relatos de isolamento de espécies de *Azospirillum* associadas com diversos ambientes e em condições extremas de temperatura, concentrações de sais e ou áreas com histórico de contaminação ambiental (NOSKO et al., 1994; ECKFORD et al., 2002; YOUNG et al., 2008).

A terceira espécie descrita foi *A. amazonense* cujos isolados foram obtidos a partir de amostras de forrageiras plantadas na região amazônica, mas também é encontrada em associação com a rizosfera de arroz, milho e sorgo, além de outras gramíneas utilizadas como pastagens em áreas localizadas na região do Cerrado e Mata Atlântica (MAGALHÃES et al., 1983; REIS JR. et al., 2006). A seguir, foi descrita outra espécie denominada de *A. halopraeferans*. Esta foi isolada de uma gramínea plantada no Paquistão, o kallar grass (*Leptochloa fusca*) plantada em condições Salinas e parece ser específica para esta planta, desde que esforço foram feitos para se isolar esta espécie de outras plantas crescendo em condições salinas não foram frutíferas (REINHOLD et al., 1987, 1988). Uma nova espécie foi descrita a partir de amostras de arroz cultivado no Iraque, sendo denominada

de *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989). Em 1997, estudos conduzidos na Austrália, usando análise da sequência da 16S rDNA de *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis*, mostraram que esta bactéria era um parente próximo de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, mas suficientemente distante para garantir uma classificação de nova espécie. Baseado em evidências filogenéticas, Ben Dekhil et al. (1997) propuseram a transferência da sub-espécie *C. largomobilis* subsp. *largomobilis* para o gênero *Azospirillum* descrevendo a nova espécie *Azospirillum largomobile* sendo posteriormente corrigido para *A. largimobile* (SLY and STACKEBRANDT, 1999). Novos grupos de *Azospirillum* continuaram a ser descritos pelo mundo. Em 2001, uma nova espécie foi denominada de *A. dobereineriae* em homenagem a cientista brasileira Johanna Döbereiner que iniciou os estudos deste gênero no Brasil (ECKERT et al., 2001). A seguir, uma nova espécie foi descrita a partir de amostras de arroz inundado coletadas na China, o *A. oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005). Em 2006, usando amostras de forrageiras cultivadas também na China, uma nova espécie foi descrita a partir de amostras de raízes e colmos esterilizados de *Melinis minutiflora* Beauv, e neste caso foi utilizada uma modificação do meio semi-sólido para se obter 15 novas estirpes de *A. melinis* (PENG et al., 2006). Em 2007, usando o mesmo meio com pH 7,2-7,4 descrito por Xie e Yokota (2005), duas novas estirpes foram identificadas por um grupo do Canadá e partir de amostras de rizosfera de milho plantado em Ontario, sendo chamadas de *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007a) e *A. zae* (MEHNAZ et al., 2007b). *A. canadense* utiliza outras fontes de carbono que não são normalmente usadas na descrição de espécies deste gênero (Tab. 1). Esta espécie usa sais de ácidos orgânicos como o malato, pirúvico, acético, succínico, cítrico e fórmico.

Uma nova espécie de *Azospirillum* foi isolada de solo contaminado por um grupo em Taiwan usando agar nutritivo. Esta espécie foi denominada de *A. rugosum* por suas colonias apresentarem aparência rugosa e ser diferente das espécies mais próximas, *A. canadense*, *A. brasilense* e *A. dobereineriae* com base no uso de fontes de carbono, hidrólise de gelatina, redução de nitrato e atividade da arginina dihidrolase (YOUNG et al., 2008). Em 2009, duas novas espécies foram descritas: *A. palatum* (ZHOU et al., 2009) e *A. picis* (LIN et al., 2009). De acordo com a

descrição dessas espécies, *A. palatum* foi isolada de amostras de solo na China e não apresenta atividade detectável quando avaliada para redução de acetileno, não produz índoles e não reduz nitrato e/ou nitrito, por outro lado, *A. picis* fixa nitrogênio, é positivo para atividade de redução de nitrato, mas a produção de índoles não foi observada. Representante dessa última espécie foi isolada em Taiwan a partir dos restos de piche de estradas, que geralmente contém, entre outras coisas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outras substâncias venenosas e carcinogênicas. Em 2010 mais uma nova espécie de *Azospirillum* foi isolado de fontes sulfurosas na Rússia e descrito como *A. thiophilum*, devido a sua peculiaridade de usar substratos orgânicos e tiosulfato como doador de elétron para conservação de energia e formar glóbulos de enxofre no interior da célula (LAVRINENKO et al., 2010).

Variabilidade no uso de fontes de carbono

De acordo com a descrição do gênero, as espécies de *Azospirillum* são caracterizadas por utilizar os ácidos tricarbóxicos (malato, citrato, -cetoglutarato, succinato) e outros ácidos orgânicos como única fonte de carbono conforme revisado em Bergey's manual of systematic bacteriology (2005). Alternativamente, para o cultivo de *Azospirillum brasilense*, principalmente quando se pretende obter maior biomassa em menor tempo de cultivo podemos utilizar o meio LB e DYGS modificado, os quais apresentam pH em torno de 6,8 e consistem de um meio rico em nutrientes contendo extrato de levedura e glicose como uns dos itens presentes em sua composição. O comportamento dessa estirpe em meios de cultivo semi-sólido depende da fonte de carbono e do pH para a formação e a migração do biofilme de células (película), em geral as condições ótimas são observadas na presença de ácido málico e em pH inicial de 6,5.

Em geral, além dos ácidos tricarbóxicos, as duas fontes de carbono do tipo açúcares mais utilizadas pela maioria das espécies de *Azospirillum* descritas, como *A. amazonense* e *A. lipoferum*, são D-frutose e D-glicose.

No caso de *A. amazonense* estirpe CBAmc (BR11145), recomendada como uma das bactérias fixadoras de nitrogênio para inocular cana-de-açúcar, o meio LGI sólido e semissólido contendo 5g/L de açúcar cristal e pH inicial 6,0 é o mais recomendado. Cabe salientar que para esta espécie a fonte de nitrogênio utilizada em substituição ao cloreto de amônio é o nitrato de potássio (1 g/L) pois a utilização desta fonte de N não interfere com o pH do meio garantindo as condições ótimas para o crescimento desta espécie (DÖBEREINER et al., 1995).

Representantes do gênero *Azospirillum* são conhecidos, em geral, por utilizar ácidos tricarbóxicos como única fonte de carbono, porém dentre as espécies deste gênero pode ser observado variabilidade no uso de açúcares e açúcares-álcoois (Tab. 1) sendo estas fontes utilizadas na discriminação das espécies.

Outros açúcares como mio-inositol, lactose e L-ramnose são utilizadas por apenas três das espécies descritas até o momento, enquanto que *A. canadense* é a única espécie que não utiliza nenhuma das fontes de carbono testadas e apresentadas na Tab. 1.

Diversidade e relações filogenéticas

A história evolutiva dos membros descritos do gênero *Azospirillum* inferida usando sequencia do gene 16S ribossomal revela claramente a separação entre as espécies *A. amazonense*, *A. irakense* e *A. halopraeferans* e delas com as outras espécies descritas. Conforme observado na Fig. 1 e previamente demonstrado por outros autores, as relações filogenéticas entre as outras espécies são mais estreitas. As primeiras espécies descritas, *A. lipoferum* e *A. brasilense*, estão agrupadas em um grande grupo onde também está a maioria das outras espécies descritas ou reclassificadas nas últimas décadas.

As espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* estão separadas em dois grupos filogeneticamente distintos. Representantes de *A. brasilense* isolados de amostras ambientais e associados a diversas plantas, tal como gramíneas e

Tabela 1. Comparação do uso de diferentes fontes de carbono utilizadas para a separação fisiológica das espécies de *Azospirillum*.

<i>Azospirillum</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>A. lipoferum</i>	+	+	-	+	v	+	-	v	+	+	v	-	-	+	v	-	+	-	-	-
<i>A. brasilense</i>	-	v	-	+	-	v	-	+	v	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. amazonense</i>	v	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	v	+	-	+	v	+	-	+	+
<i>A. halopraeferens</i>	nd	v	+	+	nd	-	nd	nd	-	+	nd	nd	+	+	+	+	+	-	-	nd
<i>A. irakense</i>	+	+	+	v	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	v	+	+	+
<i>A. largimobile</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	nd
<i>A. dobereineriae</i>	-	nd	-	+	nd	v	-	v	v	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>A. oryzae</i>	nd	+	-	+	nd	+	nd	nd	+	nd	-	-	-	-	nd	+	+	-	-	nd
<i>A. melinis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	+
<i>A. canadense</i>	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-
<i>A. zeae</i>	v	+	-	+	+	+	-	nd	v	+	-	-	-	+	-	-	nd	+	-	-
<i>A. rugosum</i>	-	-	nd	+	nd	nd	+	+	+	nd	nd	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>A. palatum</i>	v	v	+	+	nd	nd	nd	nd	+	-	nd	nd	+	+	nd	nd	nd	-	+	+
<i>A. picis</i>	+	+	-	nd	-	+	-	+	+	nd	nd	nd	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>A. thiophilum</i>	nd	+	+	+	nd	+	nd	nd	+	+	nd	-	nd	+	-	-	nd	+	+	-

Fontes de carbono: 1. N-acetylglucosamina, 2. L-arabinose, 3. D-celobiose, 4. D-frutose, 5. L-fucose, 6. D-galactose, 7. Gentiobiose, 8. D-gluconato, 9. D-glucose, 10. Glycerol, 11. Mio-inositol, 12. Lactose, 13. Maltose, 14. D-mannitol, 15. D-mannose, 16. L-ramnose, 17. D-ribose, 18. D-sorbitol, 19. sacarose, 20. D-trehalose.

Dados obtidos a partir de Eckert et al. (2001), Sly & Stackebrandt (1999), Ben Dekhil et al. (1997), Khammas et al. (1989), Reinhold et al. (1987), Xie & Yokota (2005), Peng et al. (2006), Mehnaz et al. (2007a, b) e Lavrinenko et al. (2010).

Símbolos: +, positivo; -, negativo; v, variável ou inconsistente; nd, não determinado.

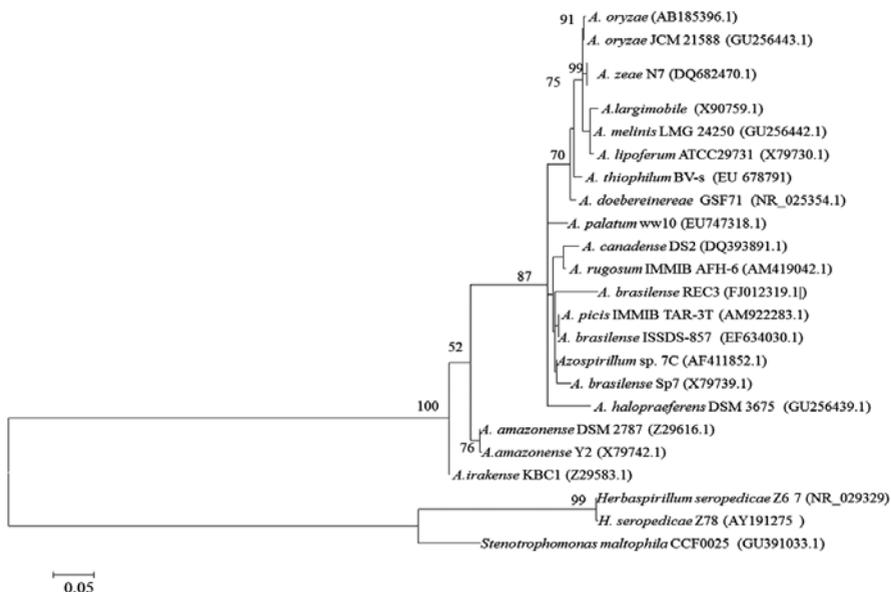


Fig. 1. Relação evolucionária baseada na sequencia do gene 16S de diversas bactérias do gênero *Azospirillum* e outras espécies utilizadas como grupo externo pelo método da máxima verossimilhança. Análise foi realizada utilizando o modelo descrito por Kimura (1980) e a árvore inicial foi gerada automaticamente. Quando o número de posições comuns foi < 100 ou menos de 1/4 do número total de sítios, o método de máxima parcimônia foi usado, caso contrário foi aplicado o método BIONJ com matriz de distâncias MCL. A distribuição Gama foi utilizada para modelar diferenças das taxas evolutivas entre sítios considerando 2 categorias (+ G, parâmetro = 0,5189). O comprimento do ramo foi definido pelo número de substituições por sítio. Todas as posições correspondentes a lacunas e dados perdidos foram eliminadas nas 24 sequencias, totalizando 1129 posições na sequencia final. O valor próximo aos ramos corresponde a percentagem de árvores que apresentaram os mesmos ramos utilizando o programa MEGA5 (TAMURA et al., 2007).

morango, formam um grupo mais relacionado filogeneticamente com uma sequência representante de *A. picis*, a qual foi descrita após isolamento de bactérias a partir de amostras de restos de asfalto (pixe) na China. As espécies *A. lipoferum*, *A. melinis* e *A. largimobile* formam outro grupo filogeneticamente relacionado. *A. orizae* e *A. zae* formam um grupo com elevada similaridade separado de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, assim como das espécies *A. doebereinerae* e *A. palatum*. E, finalmente, durante a descrição de *A. rugosum* foi revelado que esta espécie forma uma linhagem mais relacionada com *A. canadense*, sendo de 17% o valor de reassociação de DNA-DNA entre o isolado IMMIB AFH-6T e *A. canadense* LMG 23617T (YOUNG et al., 2008).

Considerações finais

Considerando o crescente número de espécies descritas no gênero *Azospirillum* e suas relações filogenéticas, é importante considerarmos a existência de um processo evolutivo constante. Os fatores que permitem este processo evolutivo estão diretamente associados ao potencial funcional do genoma desses organismos e indicam sua grande adaptabilidade a condições ambientais. Apesar de diversos genomas estarem disponíveis em bancos de dados nos dias de hoje, ainda é grande o número de regiões codificadoras de funções desconhecidas na maioria desses genomas. Isto significa que é necessário estimular estudos que permitam caracterizar funcionalmente estes organismos. A era da biologia molecular tem favorecido muito os estudos em larga escala, porém não podemos negligenciar os estudos de caracterização ecológica e fisiológica dos isolados durante o processo de descrição ou após a identificação da espécie. As coleções de culturas, como a da Embrapa Agrobiologia, abrigam muitos acessos deste gênero que precisam ser explorados para diversas funções em relação à promoção de crescimento, não só direcionado ao processo biológico de fixar nitrogênio, mas também de novas funções que podem estar presentes em seu genoma.

Referências Bibliográficas

BALDANI, J. I.; KRIEG, N. R.; BALDANI, V. L. D.; HARTMANN, A.; DÖBEREINER, J. Genus *Azospirillum*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. *Bergey's manual of systematic bacteriology*: New York: **Springer**, v. 2, p. 7-26, 2005.

BEN DEKHIL, S.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **System Applied Microbiology**, v. 20, p. 72-77, 1997.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa - SPI: Itaguaí, Embrapa CNPAB, 1995. 60 p.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 17-26, 2001.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

HARTMAN, A.; BALDANI, J. I. The genus *Azospirillum*. In: DWORKIN, M.; FLAKNOW, S.; ROSEMBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKERBRANDT, E.; (Ed.). **The Prokaryotes**. 3. ed. New York : Springer, v. 5.; p. 115-140.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research Microbiology**, v. 140, p. 679-693, 1989.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

LAVRINENKO, K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E.; DUBININA, G.; AKIMOV, V.; KUEVER, J.; LYSENKO, A.; GRABOVICH, M. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 15 jan. 2010. In press.

LIN, S-Y.; YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; ARUN, A. B.; CHEN, W-M.; LAI, W-A.; SHEN, F-T.; REKHA, P. D.; YASSIN, A. F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 761-765, 2009.

MAGALHÃES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 55, n. 4, p. 417-430, 1983.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 620-624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zea* sp. nov., diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2805-2809, 2007b.

NOSKO, P.; BLISS, L. C.; COOK, F. D. The association of free-living nitrogen-fixing bacteria with the roots of high Arctic graminoids. **Arctic and Alpine Research**, v. 26, p.180-186, 1994.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1263-1271, 2006.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov. a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 43-51, 1987.

REIS, F. B. dos; REIS, V. M., TEIXEIRA, K. R. S. Restriction of 16S-23S intergenic rDNA for diversity evaluation of *Azospirillum amazonense* isolated from different *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 431-438, 2006.

SAITOU, N. ; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing; phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425. 1987.

SLY, L. I.; STACKEBRANDT, E. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. parooensis following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 541-544, 1999.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) com nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967-980, 1978.

TINDALL, B. J. Are the concepts of legitimate and illegitimate names necessary under the current International Code of Nomenclature of Bacteria? A proposal to make changes to the Code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p. 1979-1986, 2008.

XIE, C.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1343-1438, 2005.

YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M.-J.; ARUN, A. B.; LAI, W.-A.; REKHA, P. D.; SHEN, F.-T.; HUNG, M.-H.; CHEN, W.-M.; YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 959-963, 2008.

YOUNG, J. M. Legitimacy is an essential concept of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes - a major revision of the Code is called for. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1252-1257, 2009.

ZAMBRANO, E. R.; JIMÉNEZ SALGADO, T.; TAPIA HERNÁNDEZ, A. Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). **Lankesteriana**, n. 71-2, p. 322-325, 2007.

ZHOU, Y.; WEI, W.; WANG, X.; XU, L.; LAI, R. *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from Forest soil in Zhejiang province, China. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 55, p. 1-7, 2009.



Agrobiologia

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**