

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM)**  
**Instituto de Biociências**

**Estudo da comunidade microbiana diazotrófica de plantas de *Lupinus albescens* crescidas em áreas arenizadas e não arenizadas do sudoeste do Rio Grande do Sul.**

**Camille Eichelberger Granada**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para o grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

**Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia**

**Co-orientador: Dr. Luciano Kayser Vargas**

**Porto Alegre, abril de 2014.**

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Microbiologia Agrícola do Departamento de Genética desta Universidade e nas instalações e áreas de experimentação agronômica da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO). O projeto foi subvencionado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) da Fixação Biológica de Nitrogênio.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, agradeço.

A minha família, dedico.

## Agradecimentos

---

À minha orientadora Prof. Dra Luciane Maria Pereira Passaglia e ao meu co-orientador  
Luciano Kayser Vargas.

À toda minha família, em especial meu pai Luiz Carlos da Luz Granada, minha mãe  
Rita Eichelberger Granada, meu irmão Jonas Eichelberger Granada, minha cunhada  
Paola Gonçalves e a sobrinha/afilhada mais lida do mundo Nanda Gonçalves Granada.

À minha dinda Eunice Eichelberger de Oliveira e ao meu dindo Mário Pepo Santarém.

Ao meu marido Raul Antônio Sperotto.

A todos os meus amigos que me acompanharam nesta jornada.

Ao Bruno Britto Lisboa e ao Pedro Beschoren da Costa pela companhia no longo  
caminho até as áreas arenizadas.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Agrícola e de Genética de Molecular  
Vegetal do PPGBM-UFRGS.

Ao Elmo.

Aos órgãos financiadores CAPES e CNPq

## Sumário

---

<b>Resumo</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Introdução Geral</b> .....	<b>8</b>
1.1. O Pampa Brasileiro.....	<b>8</b>
1.2. Núcleos de Arenização do Pampa Brasileiro.....	<b>10</b>
1.3. O gênero <i>Lupinus</i> .....	<b>12</b>
1.4. O Solo e as Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (PGPB)..	<b>13</b>
1.4.1. Fixação Biológica do Nitrogênio.....	<b>15</b>
1.4.2. Outros mecanismos relacionados à promoção de crescimento de plantas.....	<b>17</b>
1.5. <i>Lupinus</i> e os micro-organismos diazotróficos de vida-livre.....	<b>20</b>
1.6 <i>Lupinus</i> e os micro-organismos diazotróficos simbiontes.....	<b>21</b>
1.7 Filogenia Molecular do gênero <i>Bradyrhizobium</i> .....	<b>23</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>26</b>
2.1 Objetivo Geral.....	<b>26</b>
2.2 Objetivos Específicos.....	<b>26</b>
<b>3. Capítulo I: Comparison among bacterial communities present in arenized and adjacent areas subjected to different soil management regimes.....</b>	<b>27</b>
<b>4. Capítulo II: Multilocus sequence analysis reveals taxonomic differences among <i>Bradyrhizobium sp.</i> symbionts of <i>Lupinus albescens</i> plants grown in arenized and non-arenized areas.....</b>	<b>28</b>
<b>5. Consideração Finais</b> .....	<b>69</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>72</b>
<b>7. Anexo 1: Trabalhos complementares publicados</b> .....	<b>87</b>

## Resumo

---

O Pampa brasileiro é um conjunto de diferentes ecossistemas com flora e fauna de grande biodiversidade. Em algumas partes desta região, o solo é extremamente pobre, arenoso e altamente susceptível à erosão causada pela água e ventos. A exploração desregrada destas áreas, pela produção agrícola baseada no preparo convencional do solo e a criação de animais acima da capacidade de lotação, faz com que esta região esteja sob intenso processo de degradação. Esta degradação transforma expressivas porções de terra em areia, à semelhança de um verdadeiro deserto. Plantas de *Lupinus albus*, nativas da região, vem sendo utilizadas como alternativa para o recobrimento destes solos, a fim de conter a expansão dos areais e recuperá-los. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a comunidade microbiana de áreas arenizadas e não arenizadas do sudoeste do Rio Grande do Sul (RS), através da aplicação de técnicas microbiológicas e moleculares, e selecionar micro-organismos eficientes na promoção de crescimento de plantas de *L. albus*. Nossos estudos mostraram que os solos arenizados, com pH extremamente ácido, são pobres em nutrientes. A biomassa e a diversidade microbiana está reduzida em relação as suas áreas adjacentes. Consequentemente, a diversidade de micro-organismos diazotróficos de vida livre também está reduzida nas áreas arenizadas. A associação destes micro-organismos com plantas de *L. albus* mostrou-se eficiente na promoção de crescimento desta planta. O estudo filogenético dos micro-organismos diazotróficos simbiotes de plantas de *L. albus* demonstrou que *Bradyrhizobium* sp. isolados dos nódulos radiculares são geneticamente diferentes quando esta planta é crescida em solo arenizado e não arenizado, e que possivelmente constituem novas espécies do gênero *Bradyrhizobium*. A inoculação de plantas de *L. albus* com isolados de *Bradyrhizobium* selecionados (maiores produtores de compostos indólicos) mostrou que os isolados de solos arenizados são mais eficientes na promoção de crescimento, sugerindo que o solo pobre seleciona os micro-organismos mais eficientes na promoção de crescimento de plantas. Nossos resultados mostraram que o processo de arenização no sudoeste do RS afeta diretamente a comunidade microbiana destes locais e que a associação de micro-organismos diazotróficos, simbiotes e de vida livre, com plantas de *L. albus* pode ser uma boa alternativa para estimular o crescimento desta planta nos areais.

## Abstract

---

The Brazilian Pampa is a set of different ecosystems with high diversity of animals and plants. In this region, the soil is extremely poor, sandy and highly susceptible to water and wind erosion. The poorly planned agriculture and livestock intensify the degradation process, which form arenized zones. Native plants, such as belonging to *Lupinus albus* species, have been used as cover crops in arenized areas aiming to hold the spread by the wind and their recovery. Thus, the aims of this work were to characterize the microbial communities from arenized and adjacent areas in the southwest region of Rio Grande do Sul (RS) state by microbiological and molecular techniques and to select efficient microorganisms in the growth promotion of *L. albus* plants. Our data showed that arenized soils with pH extremely acidic are scarce of nutrients. The microbial biomass and community were reduced in arenized area when compared to adjacent areas. Consequently, the diversity of free-living nitrogen fixing bacteria was also reduced in these areas. The inoculation of these microorganisms in *L. albus* plants showed a pronounced growth promotion effect. The phylogenetic study of nitrogen fixing *Bradyrhizobium* sp. symbiont of *L. albus* plants showed that bacterial isolates from root nodules of plants that grown in arenized area were genetically different from those isolated from plants that grown in non-arenized area. These genetics differences suggest that they may belong to new *Bradyrhizobium* species. The inoculation of *L. albus* plants with selected *Bradyrhizobium* isolates, which were the best indolic compounds producers, showed that isolates from arenized area were more efficient in the plant growth promotion, which suggests that the poor arenized soil select the best plant growth promoters in order to assist plant development. Our results allow us to conclude that the arenization process in the southwest region of RS state reduce and modify the microbial community in these areas. The association of *L. albus* plants with nitrogen fixing bacteria, symbiotic and free living, may be an alternative to promote the growth of these plants in arenized areas.

## **1. Introdução Geral**

---

### **1.1. Pampa Brasileiro**

O pampa brasileiro está localizado no sudoeste do estado do Rio Grande do Sul (RS), ocupando aproximadamente 63% da área total deste Estado (176.496 Km<sup>2</sup> – IBGE, 2004) e 2,07% do território brasileiro. Esta área está localizada na zona temperada do sul, entre as latitudes 28° 00' e 34° 00' sul e longitudes 49° 30' e 58° 00' oeste.

Por ser um conjunto de diferentes ecossistemas, o Pampa apresenta flora e fauna próprias com uma grande biodiversidade, que ainda não foi completamente descrita pela ciência (Roesch et al., 2009). Estimativas indicam valores em torno de 3.000 espécies de plantas, com notável diversidade de gramíneas (mais de 450 espécies), de leguminosas (150 espécies) e muitas espécies de cactáceas, as quais podem ser encontradas nas áreas de afloramentos rochosos (Ministério do Meio Ambiente, 2013).

Um misto de vegetação campestre e arbustiva (Campos Nativos – Fig. 1A) é predominante nesta região (Berreta et al., 2001). Em algumas partes dos Campos Nativos, o solo é extremamente arenoso, com origem em rochas sedimentares, altamente sensível à erosão causada pela água e ventos. Essa fragilidade natural, combinada com as condições climáticas, faz com que o manejo do solo (plantio direto) seja um fator determinante para o desenvolvimento da agricultura e pecuária da região, caso contrário, estas práticas propiciariam uma intensa degradação (Pillar et al., 2012).

Historicamente, a população residente nessas áreas usa um sistema extrativista dos recursos naturais como única fonte de subsistência. A intensa degradação dos Campos Nativos provocada pelo sistema extrativista e de monoculturas sob plantio convencional fez com que, após um curto período de tempo (em meados da década de 70), este sistema entrasse em declínio (Roesch et al., 2009). A fragilidade natural destes solos, juntamente



com a progressiva introdução e expansão das monoculturas e das pastagens com espécies exóticas têm levado a uma rápida degradação e descaracterização das paisagens naturais do Pampa, com a formação de núcleos de arenização. Como consequência, estimativas de perda de hábitat relatam que em 2002 restavam apenas 41,32% da vegetação nativa do bioma Pampa brasileiro; já em 2008 essa porcentagem diminuiu ainda mais, caindo para 36,03% (CSR/IBAMA, 2010).



**Figura 1:** Área de estudo. **A** = Campos Nativos; **B** = Início da formação de um areal; **C** = areal já estabelecido; **D** = Plantas de *Lupinus albescens* crescidas em um areal; **E** = Plantas de *Lupinus albescens* crescidas fora do areal; **F** = Nódulos radiculares de plantas de *Lupinus albescens* (Lupinoide).

## **1.2. Núcleos de Arenização do Pampa Brasileiro**

A região sudoeste do RS caracteriza-se por uma extensa faixa de solos de origem arenítica, altamente suscetíveis à degradação por processos erosivos. Estes solos possuem textura arenosa, baixos teores de argila e matéria orgânica, níveis de fertilidade reduzidos, baixa capacidade de troca de cátions (CTC), pouco ou nenhum grau de agregação das partículas e pH baixo (Rovedder, 2003). A degradação destes solos ocorre de forma natural, uma vez que a formação arenítica e a escassa cobertura vegetal desta área formam um ecossistema extremamente frágil, suscetível a qualquer fator de desequilíbrio (Eltz e Rovedder, 2005).

Na década de 50, um relato feito por Avé-Lallemant já indicava a existência de núcleos de degradação (Suertegaray, 2011). Esse processo de degradação, no entanto, foi acelerado na década de 70, onde a exploração desregrada, o intenso desenvolvimento de uma agricultura baseada no preparo convencional do solo e a pecuária intensiva acima da capacidade de lotação dos Campos Nativos, fez com que este frágil ecossistema regional intensificasse os processos erosivos. A situação de extrema vulnerabilidade do solo, em alguns locais da fronteira sudoeste do RS, provocou a transformação de expressivas porções de terra em areia, à semelhança de um verdadeiro deserto (Roesch et al., 2009).

Apesar das semelhanças com desertos, este conceito não se aplica ao sudoeste do RS, visto que as regiões desérticas são áridas e apresentam precipitação, na maioria dos casos, inferior a 50 mm anuais. Na região do sudoeste do RS a precipitação alcança 1400 mm anuais (Souto, 1985). Assim, essa região é caracterizada pelo retrabalhamento dos depósitos areníticos pouco ou nada consolidados, promovendo mobilidade aos sedimentos não protegidos pela cobertura vegetal (Martini, 1979; Suertegaray, 1987; Suertegaray, 1998). Devido a isto, Suertegaray, em 1987, denominou este fenômeno de arenização (Fig. 1B e C).

Em um areal já estabelecido (Fig. 1C), o núcleo se destaca pela extensão de areia com cobertura vegetal incipiente ou inexistente com um constante transporte pluvial ou eólico de substrato arenítico, que avança sobre o manto de vegetação ao entorno. Na borda limítrofe entre a vegetação e o núcleo de arenização se observa a constante expansão do núcleo e o seu efeito sobre a vegetação natural do entorno, onde ocorrem as deposições eólicas de arenito formando “montes de areia” (Ab’Saber, 1995).

Segundo Suertegaray (2011), as áreas arenizadas ocorrem em 1.634 manchas comprometendo 3.027,41 ha. Estas manchas localizam-se nos municípios de Alegrete, Cacequi, Itaqui, Maçambará, Manoel Viana, Quaraí, São Borja, São Francisco de Assis e Unistalda. Este fenômeno ganha dimensões maiores a cada ano e, caso não se encontre uma solução definitiva para o problema, os prejuízos gerados ao ambiente local podem vir a intensificar-se com reflexos não só sobre a economia dos municípios afetados, mas da região como um todo, em função da provável diminuição do potencial produtivo a que os mesmos estão sujeitos.

A adoção de sistemas de manejo, que visem a manutenção da vegetação natural e/ou a sua recuperação, é fundamental para impedir, ou mesmo reverter, o processo de arenização. Assim, devem ser priorizadas as práticas conservacionistas ou recuperadoras. Rovedder e Eltz (2008) desenvolveram um método de revegetação com culturas de cobertura, utilizando as espécies aveia-preta (*Avena strigosa*) e um tremoço nativo da região, *Lupinus albus*. Os autores observaram redução de mais de 90% no transporte de sedimentos em decorrência da cobertura do solo, indicando que a técnica de revegetação com plantas de cobertura pode ser usada para contenção e recuperação de areais. Parece especialmente promissora a utilização do tremoço nativo, espécie leguminosa capaz de realizar uma associação simbiótica com rizóbios, e, assim, possibilitar, também, a ocorrência do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN).

### 1.3. O gênero *Lupinus*

O gênero *Lupinus* pertence à subfamília Papilionoideae da família Fabaceae, apresentando entre 300 a 500 espécies. Este gênero vegetal é subdividido em espécies do “Novo Mundo” (Continente Americano – exemplos: *L. paraguariensis*, *L. multiflorus*, *L. villosus* e *L. albescens*) e “Velho Mundo” (algumas regiões da África e Mediterrâneo – exemplos: *L. albus*, *L. hispanicus* e *L. angustifolius*) (Wolko et al., 2011). No Mediterrâneo, a agricultura sustentável com espécies de *Lupinus* contribui para o suprimento proteico a baixo custo na alimentação de animais e também para nutrição humana (Campos-Andrada et al., 2005). Entretanto, quando cultivadas em condições de estresse abiótico (como calor, seca, frio, sal e altas concentrações de alumínio), as plantas de *Lupinus* produzem alguns tipos de alcaloides, que, muitas vezes, são tóxicos para animais (Wolko, 2011). As plantas pertencentes a este gênero são popularmente conhecidas como tremoços e as espécies mais importantes e estudadas são: *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius*, *L. pilosus* e *L. atlanticus* (Pearse et al., 2006; Turner e Rartung, 2012).

Os tremoços dificilmente crescem em solos com pH superior a 6.8 (Fernandez-Pascual et al., 2007). Essas plantas apresentam a capacidade de crescer em solos pobres em nutrientes e são altamente tolerantes à seca e contaminações por metais pesados (Castaldi et al., 2005; Shen et al., 2005 e Martínez-Alcalá et al., 2010). Por isso, elas vêm sendo utilizadas como plantas de cobertura para melhoria de solos degradados (Mihailovic et al., 2008). Os principais fatores que ajudam na adaptação destas plantas às condições adversas do ambiente são: a excreção de ácidos orgânicos pelas raízes que ajudam na solubilização de nutrientes (Schulze et al., 2006) e a associação feita com bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio atmosférico (West et al., 2005). Esta

associação faz com que as plantas produzam uma quantidade elevada de massa seca e nitrogênio acumulado na parte aérea.

A espécie *Lupinus albens* (Fig. 1D e E) é nativa do bioma Pampa encontrado da parte leste da América do Sul (Região do Atlântico) e um estudo filogenético evidenciou que ela possui uma estreita relação com a espécie *L. aureonitens* (Merino et al., 1999). Plantas de *L. albens* já foram encontradas no noroeste da Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil (Planchuelo e Dunn, 1984). Planchuelo (1999) relatou que *L. albens* é a espécie de *Lupinus* mais encontrada no lado oriental da Argentina, mas que a intensa urbanização ocorrida entre os anos de 1995 e 1998 reduziu consideravelmente sua abundância. Nas áreas arenizadas do sudoeste do RS, este tremoço nativo também é muito encontrado (Rovedder, 2007; Stroschein, 2010).

Fuentes e Planchuelo (1999) mostraram que *L. albens* é a primeira espécie de *Lupinus* a colonizar bancos de areia em uma pequena ilha do rio Paraná, podendo, assim, ser utilizada para fixação de dunas. No caso das áreas arenizadas do sudoeste do RS, plantas de *L. albens* podem conter o espalhamento dos areais pelos ventos e aumentar a quantidade de matéria orgânica nestes solos (Rovedder e Eltz, 2008).

#### **1.4. O Solo e as Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (PGPB).**

O solo é uma mistura de diferentes organismos, substâncias orgânicas e minerais presentes em três fases: sólida, líquida e gasosa (Kabata-Pendias, 2004). Os micro-organismos são ubíquos no solo e o uso de tecnologias microbianas em solos para agricultura vem mostrando seu efeito benéfico na produção de alimentos. (Singh et al., 2011). Os micro-organismos são efetivos, principalmente, quando estão providos de condições adequadas para o funcionamento de seu metabolismo (como, por exemplo: disponibilidade adequada de água, oxigênio, pH e temperatura do ambiente - Singh et al.,

2011). Devido à dinâmica e complexidade do solo, muitas variáveis podem afetar a distribuição e o estabelecimento das diferentes populações de micro-organismos, tais como condições edafoclimáticas (Pulleman et al., 2012), sistemas de manejo (Singh et al., 2011; Ding et al., 2013), a interação com diferentes micro-organismos (Barea et al., 2005; Fernández, 2005) e espécies de plantas (Eisenhauer et al., 2010; Mao et al., 2011).

A rizosfera, região do solo imediatamente próxima às raízes, é de fundamental importância para o desenvolvimento vegetal, uma vez que este é o ambiente circundante para a captação de água e nutrientes pelas plantas (Alami et al., 2000). Os exsudatos liberados pelas raízes vegetais são fonte de energia e nutrientes para a microbiota, que podem selecionar a mesma, resultando em uma comunidade de micro-organismos mais abundante nas proximidades da raiz (Dennis et al., 2010).

Um estudo feito por Marschner e colaboradores (2004) mostrou que diferenças no pH, na concentração de nutrientes como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), e o tipo de solo são fatores determinantes para estrutura e composição da comunidade microbiana. Contudo, o tipo de planta cultivada e seus exsudatos radiculares exercem o maior efeito seletivo dos micro-organismos. Granada e colaboradores (2013) mostraram diferenças na comunidade microbiana da rizosfera de plantas de *L. albescens* cultivadas em solos arenizados e não arenizados do sudoeste do RS/Brasil, mas, apesar das diferenças encontradas, o gênero *Burkholderia* foi predominante em ambos os tratamentos.

A ocorrência de associações entre bactérias e raízes vegetais pode ser benéfica, nociva ou neutra para as plantas (Lynch, 1990). As bactérias promotoras de crescimento vegetal (ou PGPB – do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria*) formam um grupo benéfico e heterogêneo de micro-organismos, os quais podem ser encontrados na rizosfera, superfície das raízes ou em associação com as mesmas (Botelho, 1996). Pode-

se caracterizar PGPBs endofíticas (intercelular – que vivem nos espaços entre as células do córtex radicular; intracelular - que encontram-se em estruturas especializadas denominadas de nódulos) e PGPBs extracelulares (podem colonizar a superfície radicular ou simplesmente viver próximas a ela).

A promoção do crescimento vegetal por PGPBs pode ocorrer direta ou indiretamente (Glick, 1995). Pela forma direta, há várias maneiras pelas quais as PGPBs podem afetar o desenvolvimento das plantas, tais como: FBN; solubilização de nutrientes (tais como P, ferro (Fe) e K); produção de sideróforos (quelantes de Fe) e produção de reguladores de crescimento vegetal (hormônios) (Selosse et al., 2004; Vega, 2007). A promoção indireta de crescimento ocorre quando a bactéria diminui ou impede os efeitos deletérios de um ou mais micro-organismos fitopatogênicos, o que pode ocorrer pela produção de substâncias antagonistas, ou pela indução de resistência da planta a patógenos (Glick, 1995). Dessa forma, muitas bactérias são capazes de utilizar a combinação de diferentes habilidades para promover o crescimento da planta associada em vários estágios do seu ciclo de vida (Glick et al., 1999).

#### **1.4.1. Fixação Biológica do Nitrogênio**

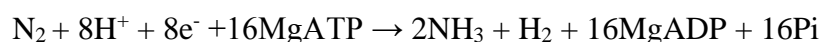
Cineticamente, a molécula de  $N_2$  não é reativa para oxidação e redução, e a maioria dos organismos não consegue metabolizar diretamente o nitrogênio no formato de  $N_2$ . Consequentemente, a aquisição de uma forma de nitrogênio que seja metabolizado é essencial para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos organismos (Howard e Rees, 1996).

Os micro-organismos fixadores de N atmosférico (diazotróficos) são PGPBs extensivamente estudadas devido à importância do N como um nutriente indispensável ao desenvolvimento vegetal e frequentemente limitante para a produção agrícola. Estes

micro-organismos podem ser do tipo de vida-livre (fixam nitrogênio sem necessitar da associação com plantas e obtêm energia de compostos orgânicos do solo) ou simbiontes (fixam nitrogênio somente em simbiose com leguminosas, e a planta oferece os compostos orgânicos necessários como fonte de energia). Os micro-organismos diazotróficos são capazes de converter o nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) à amônia (NH<sub>3</sub>), através do complexo enzimático denominado “Complexo da Nitrogenase”.

O Complexo da Nitrogenase consiste em duas metaloproteínas, a ferro (Fe) proteína e a molibdênio ferro (MoFe) proteína. Em condições de falta de molibdênio, uma nitrogenase alternativa, homóloga a MoFe proteína, mas dependente de Fe ou vanádio (V) pode ser induzida (Leigh et al., 2002). A nitrogenase catalisa não somente a redução do N<sub>2</sub> à amônia, mas também a redução de prótons a hidrogênio e diversos outros substratos alternativos como acetileno, azida e cianeto (Howard e Rees, 1996).

A redução do substrato pela enzima nitrogenase envolve três etapas básicas de transferência de elétrons: (1) a redução da Fe-proteína por carreadores de elétrons (como ferredoxinas e flavodoxinas); (2) transferência de elétrons da Fe-proteína para MoFe-proteína em um processo dependente de MgATP e (3) transferência de elétrons ao substrato (quebrando as ligações químicas do N<sub>2</sub>) pelo sítio ativo da MoFe-proteína (Rees e Howard, 2005). Em condições ótimas, a estequiometria da reação de redução do N<sub>2</sub> é:



No contexto de agentes de FBN, a associação rizóbio-leguminosa é a mais importante, sendo responsável por aproximadamente 21,45 milhões de toneladas de N<sub>2</sub> fixado por ano (Heridge et al., 2008). A produção de soja (*Glicine max*) é dominante, já que se calcula que nas quatro maiores regiões produtoras do mundo (Estados Unidos, Brasil, Argentina e China) o N<sub>2</sub> fixado nesta cultura chega a 16,4 milhões de toneladas



por ano, o que representa aproximadamente 77% de todo N fixado em leguminosas cultivadas (Heridge et al., 2008).

Hardason e Atkins (2003) agruparam as leguminosas de grão pela sua habilidade de absorver o N fixado. O feijão comum apresentou a menor capacidade de fixação de nitrogênio (aproximadamente 40% do nitrogênio absorvido é derivado da FBN); um segundo grupo inclui a soja, amendoim e o grão de bico (aproximadamente 50% do N é derivado da FBN); e o terceiro grupo, com maior capacidade de absorção de N da fixação, é composto pela fava e *Lupinus* spp. (aproximadamente 80% do N é derivado da FBN). Ainda neste mesmo trabalho, foi ressaltado que o percentual de nitrogênio fixado em leguminosas forrageiras é muito maior, podendo variar de 70% em *Centrosema pubescens* a 90% em *Lupinus* spp.

No caso de não-leguminosas, Roper e Ladha (1995) concluíram que a quantidade de N fixado por micro-organismos de vida livre é de grande significância. Boddey e colaboradores (2001) em seu estudo com 11 variedades comerciais de cana de açúcar no Brasil concluíram que a porcentagem de N fixado nesta cultura pode variar de 25 a 60%. Reis e colaboradores (2001) relataram que a porcentagem de N fixado pode variar de 25-40% em *Pennisetum purpureum*, e de 2-26% em cinco espécies de *Brachiaria*. Souza e colaboradores (2012) mostraram que a adubação nitrogenada de plantas de arroz pode ser reduzida em 50% quando estas plantas forem inoculadas com isolados eficientes de *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia* sp. e *Pseudacidovorax* sp..

#### **1.4.2. Outros mecanismos relacionados à promoção de crescimento de plantas**

O uso de fertilizantes químicos aumenta a fertilidade do solo e a produtividade das culturas, mas, frequentemente, o uso destes produtos está diretamente relacionado a problemas ambientais, como lixiviação do nitrato em águas subterrâneas, escoamento

superficial de N e P e eutrofização de ambientes aquáticos (Adesemoye e Kloepper, 2009). Inoculantes microbianos são promissores para a solução deste problema, já que os micro-organismos selecionados podem aumentar a disponibilidade e a captação de nutrientes nas plantas (Adesemoye et al., 2008).

Muitos micro-organismos potenciais biofertilizantes produzem fito-hormônios que são conhecidos pela sua atividade promotora de crescimento de plantas. Na maioria dos casos, estes fito-hormônios afetam os padrões de crescimento das raízes das plantas resultando em raízes maiores, mais ramificadas e com maior área de absorção de nutrientes (Vessey et al., 2003).

O ácido indol-acético (AIA) é um fito-hormônio de crescimento vegetal altamente difundido nas PGPBs. Este hormônio é produzido predominantemente pela via do triptofano, através da produção de ácido indol-pirúvico (Patten e Glick, 2002). O AIA ajuda no rápido estabelecimento das raízes, com a alongação das raízes primárias e pela proliferação das raízes secundárias. A produção de AIA torna-se vantajosa por ancorar jovens plântulas ao substrato e aumentar a absorção de água e nutrientes.

Muitos trabalhos relatam a promoção de crescimento de plantas por PGPBs produtoras de AIA. Tsavkelova e colaboradores (2007) relataram que isolados de *Sphingomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Mycobacterium* sp. e *Microbacterium* sp. produtores de AIA estimularam a germinação de sementes de *Dendrobium moschatum* (Orchidaceae). Patten e Glick (2002) mostraram que os sistemas radiculares de plantas de canola inoculadas com um isolado de *Pseudomonas putida* produtor de AIA foram de 35-50% mais desenvolvidos que os das plantas controles (sem inoculação). O mesmo foi observado por Gravel e colaboradores (2007) em plantas de tomate. Ali e colaboradores (2009) também mostraram o aumento de 45-55% do sistema radicular de plantas de feijão-mungo (*Vigna radiata*) inoculadas com espécies de *Bacillus* produtores de AIA.

Outra característica de promoção de crescimento muito comum entre os isolados bacterianos é a produção de sideróforos. Estes compostos podem solubilizar ou sequestrar o ferro insolúvel do solo provendo as plantas deste elemento (Shoda, 2000; Glick, 2003). Sharma e Johri (2003) mostraram um aumento na massa seca de plantas de milho, crescidas em um ambiente contendo somente  $\text{Fe}^{3+}$  (insolúvel), e inoculadas com isolados de *Pseudomonas* sp. produtores de sideróforos. Os sideróforos bacterianos também podem atuar como supressores de doenças fúngicas, uma vez que o sideróforo fúngico tem menor afinidade pelo ferro que o bacteriano, o que deixa o fungo em privação deste elemento (Compant et al., 2005). Sessitsch e colaboradores (2004) mostraram que bactérias endofíticas isoladas de raízes de batata reduziram o desenvolvimento de *Xanthomonas campestris* e *Streptomyces scabies* pela produção de sideróforos.

Rajkumar e colaboradores (2010) salientaram outra aplicação positiva para os sideróforos bacterianos. Em solos contaminados por metais pesados, a inoculação de plantas com bactérias resistentes à contaminação e produtoras de sideróforos têm fundamental importância para o crescimento e sobrevivência da planta. Os sideróforos bacterianos podem ligar-se a metais como ferro (Fe), cromo (Cr), chumbo (Pb), alumínio (Al), cádmio (Cd), cobre (Cu) e zinco (Zn) (Neubauer et al., 2000) aumentando a disponibilidade destes elementos na rizosfera das plantas e, conseqüentemente, aumentando a efetividade de tratamentos de fitorremediação de solos contaminados. Braud e colaboradores (2009) mostraram que em solos contaminados por Cr e Pb, a inoculação de espécies de *Pseudomonas* produtoras de sideróforos em plantas de milho, aumentou a bioacumulação destes metais na parte aérea da planta.

O fósforo é um dos macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Este elemento é um dos mais abundantes no solo (aproximadamente 400-1200 mg Kg de solo<sup>-1</sup>), entretanto uma quantia muito baixa está

complexada de uma maneira solúvel e disponível para as plantas (aproximadamente 1 ppm) (Rodriguez e Fraga, 1999). A habilidade de solubilizar fosfato é frequentemente encontrada nas PGPBs. Estes micro-organismos podem liberar fosfatases e/ou acidificar o solo, o que pode solubilizar fosfato mineral insolúvel, liberando íons solúveis que podem ser captados pelas plantas (Jones, 1998). Os principais gêneros bacterianos solubilizadores de fosfatos e promotores de crescimento de plantas relatados foram: *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Delftia*, *Chryseobacterium*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (Rodrigues et al., 2004; Chen et al., 2006; Hameeda et al., 2008; Poonguzhali et al., 2008; Hariprasad e Niranjana, 2009; Collavino et al., 2010; Park et al., 2011, Yu et al., 2011; Estrada et al., 2013; Granada et al., 2013).

### **1.5. *Lupinus* e os micro-organismos diazotróficos de vida-livre**

Por ser uma espécie leguminosa e estabelecer relações simbióticas com bactérias fixadoras de N, poucos exemplos na literatura relatam associação entre bactérias diazotróficas de vida livre e plantas do gênero *Lupinus*.

As bactérias diazotróficas de vida livre incluem espécies do gênero *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, entre outros (Baudoin et al., 2009; Cummings, 2009; Gholami et al., 2009; Haghghi et al., 2011; Bhattacharyya e Jah, 2012; Monteiro et al., 2012). Em associação com plantas, este tipo de micro-organismo é capaz de suprir aproximadamente 50% do nitrogênio necessário para o pleno desenvolvimento da planta que está em associação (Souza et al., 2012). Mas a promoção de crescimento da planta, neste caso, ocorre principalmente pela interação entre FBN e várias outros fatores como: produção de AIA (Ali et al., 2008; Shoebitz et al., 2009), de ACC deaminase (Yim et al., 2009; Karthikeyan et al., 2012), de sideróforos (Kraepiel et al., 2009), solubilização de

nutrientes (Jilani et al., 2007; Intorne et al., 2009) e a supressão do desenvolvimento de patógenos (Compant et al., 2005; Han et al., 2005; Shoebitz et al., 2009).

Garcia e colaboradores (2001) mostraram que as PGPBs diazotróficas mais abundantes da rizosfera de quatro espécies de *Lupinus* (*L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* e *L. hispanicus*) foram as representantes dos gêneros: *Bacillus* sp., *Aureobacterium* sp., *Cellulomonas* sp., *Pseudomonas* sp. e *Arthrobacter* sp.. Já Weisskopf e colaboradores (2011) e Granada e colaboradores (2013) mostraram que linhagens pertencentes ao gênero *Burkholderia* foram as mais abundantes na rizosfera de *L. albus* e *L. albus*, respectivamente. Giongo e colaboradores (2010) isolaram bactérias do gênero *Enterobacter* sp. e *Serratia* sp. das raízes de plantas *L. albus*, e a inoculação destas bactérias na planta resultou em um efeito significativo na promoção de crescimento da mesma.

Dary e colaboradores (2004) mostraram que a FBN por micro-organismos de vida livre em plantas de *L. luteus* não é afetada quando os solos apresentam uma contaminação moderada por metais pesados como Cu, Cd e Pb. Garcia e colaboradores (2004) mostraram que a co-inoculação de PGPBs diazotróficas de vida livre do gênero *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. alguns dias antes da inoculação com bactérias simbióticas pertencentes à espécie *Bradyrhizobium japonicum* estimulou a FBN em plantas de *L. albus*.

### **1.6. *Lupinus* e os micro-organismos diazotróficos simbiotes**

Bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas, popularmente conhecidas como rizóbios, são aquelas que invadem as raízes da espécie vegetal (leguminosa) levando a uma gradual e coordenada diferenciação celular e ajuste fisiológico do metabolismo até à formação de estruturas especializadas denominadas nódulos (Garg e Geetanjali, 2007).

São nestes nódulos que ocorre a FBN. Esta interação leguminosa-rizóbio é altamente específica, sendo que a planta deve reconhecer a bactéria (sinal lipooligosacarídeo – fatores Nod – emitido pela bactéria, Geurts e Bisseling, 2002) e a bactéria reconhecer a planta (pela emissão de flavonoides das raízes da leguminosa - Hartwig e Phillips, 1991).

Uma das primeiras descrições feitas de uma bactéria isolada a partir de nódulos de uma espécie de *Lupinus* foi realizada por Eckhardt e colaboradores (1930). Este estudo relata a presença de bactérias de multiplicação lenta, que não se enquadravam em outros grupos de nodulação cruzada, sendo classificadas como *Rhizobium lupini*. Após a publicação de Jordan (1982), esta espécie foi alocada dentro da espécie *Bradyrhizobium japonicum* por apresentar características semelhantes em meio de cultura. Além deste gênero bacteriano, outra espécie foi descrita como sendo simbiote com *L. albus*. Os isolados bacterianos simbiotes dessa planta apresentavam características que os distinguiam de *Bradyrhizobium* sp. em meios de cultura e tinham estreita relação filogenética com o gênero *Ochrobactrum*, sugerindo tratar-se de uma nova espécie: *Ochrobactrum lupini* (Trujillo et al., 2005). Fernandez- Pascual e colaboradores (2007) relataram que plantas de *Lupinus* são promiscuas, sendo noduladas por vários genótipos e espécies de *Bradyrhizobium*. Estes genótipos estão estreitamente relacionados com *B. japonicum* mas, na sua maioria, são novas espécies. Já foi relatada a nodulação de plantas de *Lupinus* por bactérias de vários gêneros, os mais encontrados foram: *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Ochrobactrum* sp. e *Phyllobacterium* sp. (Jarabo-Lorenzo et al., 2003; Trujillo et al., 2005; Valverde et al., 2005; Stepkowski et al., 2007).

Os primeiros estágios da nodulação de *Lupinus* por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são diferentes do padrão conhecido em leguminosa-*Rhizobium*. Enquanto a interação leguminosa-*Rhizobium* ocorre através da infecção dos pelos radiculares, a interação *Lupinus-Bradyrhizobium* spp. ocorre em rachaduras na epiderme

da raiz (Gonzalez-Samá et al., 2004). O resultado é o desenvolvimento de um nódulo radicular indeterminado que é chamado de “lupinoide” (Fig. 1F). Este tipo de nódulo é resultado de um crescimento ramificado do meristema, onde o nódulo envolve, fazendo uma circunferência em torno da raiz, parecendo um “colar” (Fernandez- Pascual et al., 2007).

A literatura relata que este tipo de nodulação é altamente resistente a estresses abióticos, como alta concentração de sais, pesticidas, metais pesados e alta acidez do solo (Fernandez-Pascual et al., 2007). Mas, devido à existência desses tipos de estresses, Simms e colaboradores (2005) relataram que a inoculação de plantas de *L. alboreus* submetidas à seca com isolados de *Bradyrhizobium* resultou, na maioria das amostras, em nódulos muito pequenos e ineficientes na FBN. Por isso, a seleção de novas estirpes bacterianas, resistentes a estresses abióticos para inoculação em plantas de *Lupinus* parece ser uma boa alternativa para o aumento da FBN (Abd-Alla, 1999; Raza et al., 2001; Fernandez- Pascual et al., 2007). Um experimento de seleção de bactérias diazotróficas simbiotes de plantas de *L. angustifolius* e *L. albus* mostrou que a contribuição do N fixado pode chegar a 200 e 330 Kg N ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Wolko et al., 2011).

### **1.7.Filogenia molecular do gênero *Bradyrhizobium***

Filogenia é o estudo da relação evolutiva entre grupos de organismos (espécies ou populações), que é descoberto por meio de sequenciamento de dados moleculares e matrizes de dados morfológicos. Os resultados dos estudos filogenéticos são a história evolutiva dos grupos taxonômicos, ou seja, sua filogenia. O estudo da filogenia é uma importante ferramenta de abordagem de diversas questões biológicas, como relações entre espécies ou genes, a origem e a disseminação de uma infecção viral e mudanças na demografia e migração das espécies (Yang e Rannala 2012).

Para a determinação da taxonomia bacteriana, a inferência filogenética baseada na comparação das sequências *rrs* tem sido amplamente utilizada, principalmente no estudo da taxonomia e classificação de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio, conhecidas como rizóbios. O gene *rrs* é um importante marcador para construir filogenias de linhagens em nível de domínio, subdivisão e gênero, mas em nível de espécie este gene não é suficientemente resolvido pelo seu alto grau de conservação (Martínez-Romero e Caballero-Mellado, 1996). Por isso, a partir da década de 90, outros genes constitutivos conservados começaram a ser utilizados para refinar os estudos filogenéticos dos genes *rrs* (*dnaK*, *atpD*, *recA*, *glnII*, *rpoB* e *gyrB* – Lloret e Martínez-Romero, 2005). O agrupamento filogenético dos rizóbios por estes genes cromossômicos coincide com a filogenia inferida pelo gene *rrs* na topologia dos principais clados (Lloret e Martínez-Romero, 2005). No entanto, análises filogenéticas dos genes de nodulação (*nodABC*) podem mostrar incongruências com a topologia dos genes citados anteriormente (Boivin e Giraud, 1999).

Estirpes de *Bradyrhizobium* têm sido isoladas de nódulos radiculares de diferentes tribos de leguminosas, tanto de espécies de herbáceas, como de lenhosas, de origem tropical e temperada, incluindo leguminosas aquáticas, como espécies de *Aeschynomene* e não leguminosas, como *Parasponia andersonii* (Sprenst, 2001). Isolados deste gênero bacteriano possuem os mais diversos estilos de vida, podendo ser encontrados em simbiose com leguminosas do solo e aquáticas, solo rizosférico das mais variadas plantas e endofíticos de muitas não leguminosas, como o arroz (Vinuesa et al., 2005). Como consequência, este gênero bacteriano vem sendo muito estudado, e, nos últimos anos, muitas espécies novas de *Bradyrhizobium* foram descritas, totalizando 20 espécies.

Tendo como base sequências do 16S rRNA (*rrs*), o gênero *Bradyrhizobium* forma um clado na classe  $\alpha$ -proteobactérias, juntamente com bactérias oligotróficas do solo ou



aquáticas, como *Rhodopseudomonas* spp., *Nitrobacter* spp., *Blastobacter* spp. (Sawada et al., 2005). Mesmo com a grande quantidade de espécies já descritas, muitos estudos mostram que o gênero *Bradyrhizobium* contém muitos isolados que ainda não foram classificados. Atualmente, quando a posição taxonômica da bactéria é incerta, costuma-se usar o nome da planta hospedeira após o nome do gênero bacteriano, como, por exemplo, *Bradyrhizobium* sp. (*Acácia*), *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) (KuyKendall, 2003).

Trabalhos de filogenia de *Bradyrhizobium* utilizam muitos genes constitutivos (Vinuesa et al., 2005; Stepkowski et al., 2007; Delamuta et al., 2013; Durán et al., 2013) e genes de nodulação (Stepkowski et al., 2007; Menna e Hungria, 2011; Durán et al., 2013) em suas análises. Estes trabalhos utilizam análises de Máxima Verossimilhança, Neighbor-joining e Baiesiana para o embasamento dos seus resultados. Todos estes trabalhos relatam uma alta diversidade entre os isolados de *Bradyrhizobium* estudados, que podem ser encontrados em associação com diferentes leguminosas nos mais variados nichos ecológicos, e que não se encaixam nos grupos taxonômicos já existentes.

## **2. Objetivos**

---

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a comunidade microbiana de diazotróficos de vida livre e simbiontes de plantas de *Lupinus albescens* (nativas da região) e selecionar as melhores linhagens com características de promoção de crescimento vegetal, a fim de favorecer o crescimento destas plantas nas áreas arenizadas.

### **2.2. Objetivos específicos**

**I.** Caracterização da microbiota total e micro-organismos diazotróficos de vida livre em associação com plantas de *Lupinus albescens* crescidas em áreas arenizadas e áreas adjacentes que não estão sob processo de arenização.

**II.** Avaliar a diversidade taxonômica de isolados de *Bradyrhizobium* sp. simbiontes de plantas de *L. albescens* crescidos em áreas arenizadas e não arenizadas.

## Capítulo I

---

Granada C, Costa PB, Lisboa BB, Vargas LK and Passaglia LMP (2013) Comparison among bacterial communities present in arenized and adjacent areas subjected to different soil management regimes. *Plant Soil* 373: 339-358.

## Capítulo II

---

**Multilocus sequence analysis reveals taxonomic differences among *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *Lupinus albescens* plants grown in arenized and non-arenized areas**

Artigo em preparação

**Multilocus sequence analysis reveals taxonomic differences among *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *Lupinus albescens* plants grown in arenized and non-arenized areas**

Camille E. Granada<sup>1</sup>, Anelise Beneduzi<sup>2</sup>, Bruno B. Lisboa<sup>2</sup>, Andreia C. Turchetto-Zolet<sup>1</sup>, Luciano K. Vargas<sup>2</sup> and Luciane M. P. Passaglia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Rua Gonçalves Dias 570, 90130-060, Porto Alegre, RS, Brazil.

**ABSTRACT**

*Lupinus albescens* is a leguminous plant that belongs to “New World” Lupine species, which is native to the south of Brazil. This Brazilian region is characterized by poor degraded soils with low organic matter, called arenized areas. The symbiosis between *Lupinus* plants and nitrogen-fixing bacteria belonging to the *Bradyrhizobium* genus may help the plant establish itself in these areas. To characterize the bradyrhizobial population symbiont of *L. albescens* plants grown in arenized and non-arenized areas in the South of Brazil, a multilocus phylogenetic analysis was conducted. Seventy-four bradyrhizobial isolates were analyzed, 38 coming from *L. albescens* plants grown in an arenized area and 36 from a non-arenized area. The *Bradyrhizobium* spp. isolates symbionts of *L. albescens* plants were different among arenized and non-arenized areas. Analysis of the 16S rRNA, *dnaK*, *atpD*, *recA*, *glnII*, *rpoB*, *gyrB*, *nodA*, *nodB*, and *nodZ* nucleotide sequences showed that strains from the non-arenized area presented higher genetic variability. Phylogenetic study reported the existence of three supported clades,

which are most likely three different new *Bradyrhizobium* species: one species from the arenized area and two from the non-arenized area. An *in vivo* inoculation experiment with *L. albescens* plants grown under optimal conditions indicated that *Bradyrhizobium* sp. isolated from an extreme environment (the arenized area) were more efficient at promoting plant growth than those that were isolated from the non-arenized area. This result suggested that the environment affects the selection of more efficient plant growth promoters to sustain plant growth.

*Key words:* *Lupinus* sp.; taxonomic diversity; *Bradyrhizobium* sp.; arenized areas.

## INTRODUCTION

Plants from the *Lupinus* genus belong to the subfamily Papilionoideae of the Fabaceae family. The genus *Lupinus* is comprised of approximately 300 species of annual herbs, perennial herbaceous or woody shrubs [16]. This genus is divided into “Old world” and “New World” species, which are able to grow in various climates and environmental conditions [45]. Native species from the “Old world” (some places in the Mediterranean and northern Africa) were introduced into Australia and South Africa near the end of 19<sup>th</sup> century [68] and include the most studied species of *Lupinus albus*, *Lupinus hispanicus*, *Lupinus luteus*, and *Lupinus angustifolius* [19]. “New world” species are spread across the American continent, where they are distributed over a wide range of climates, including alpine, temperate, and subtropical [80], and consist of various species such as *Lupinus paraguariensis*, *Lupinus multiflorus*, *Lupinus villosus*, *Lupinus mexicanus*, and *Lupinus albescens* [21, 9]. Plants belonging to this genus rarely develop in soils with a pH higher than 6.8 [19]. However, they have the ability to grow in poor nutrient soils in addition to being highly tolerant to dry conditions, salt excess, and heavy metal

contamination [4, 62, 37]. Because of these characteristics, *Lupinus* plants have been used as cover crops aiming to recover degraded soils [43].

The association of *Lupinus* plants with symbiotic diazotrophic bacteria results in the accumulation of more dry matter and nitrogen in the plant's shoot. Fernández-Pascual et al. [19] reported that *Lupinus* plants exhibit a promiscuous behavior as these plants are nodulated by many species and genotypes of *Bradyrhizobium* strains. These species are closely related to *Bradyrhizobium japonicum* but they present some differences as they are acidic-tolerant and able to grow in soil with higher levels of free aluminum [26]. Thus, most of them are classified as new *Bradyrhizobium* species [these species are called *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)]. Currently, the most frequent symbiotic diazotrophic bacteria isolated from *Lupinus* were *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Ochrobactrum* sp., *Mesorhizobium* sp., and *Phyllobacterium* sp. [28, 73, 75, 67, 69].

*L. albescens* is a “New World” species closely related to *L. aureonitens* [42]. Symbiotic bradyrhizobia isolated from root nodules of this Lupine species exhibited a *nodA* phylogeny grouped with rhizobia species isolated from *Machaerium milleflorum* (Panama), *Desmodium axillare* (Panama), *Inga pavoniana* (Mexico), *Rhynchosia pyramidalis* (Panama) and *Inga oersterdiana* (Mexico) [67]. *L. albescens* plants were found in the northwest region of Argentina as well as in Uruguay, Paraguay and Brazil [49]. In most of these countries, these plants have been used as cover crops aiming to improve the soil [3, 76, 37]. Due to its ability to grow in sandy soils, Fuentes and Planchuelo [20] reported that *L. albescens* was the first Lupine species to colonized sandbanks, and it is possible to recommend it as a useful plant for dune fixation. This plant species is native to the south of Brazil where arenized areas occur [55, 69].

Arenized areas in the south of Brazil occur as a consequence of dissolution of arenitic rocks, erosion, and reworking of non-consolidated surface sands, which cause

sand deposition [38, 71, 70]. The fragility of the soil in these areas promotes losses of clay, silt, and organic matter and, consequently, soil degradation, which is very difficult to reverse [53]. In these areas, revegetation technique performed with *L. albescens* plants demonstrated that this plant species was able to hold the spread of sand by the wind and increase the organic matter content in the soil [54].

Despite its environmental importance, there are few reports studying *L. albescens* plants. Symbiotic nitrogen-fixing bacteria isolated from root nodules of this plant species have not yet been characterized. Phylogenetic analysis with a larger number of genes could be an important tool to study these bacterial isolates. Thus, the aims of this work were to characterize bradyrhizobial communities isolated from root nodules of *L. albescens* plants cultivated in arenized and non-arenized areas in the south of Brazil and to study their taxonomic diversity through multilocus phylogenetic analysis.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Site description and sampling**

The arenized areas in the south of Brazil are located between the latitudes of 29°00' S to 31°00' S and longitudes of 54°30' W to 58°45' W. For this study, samples of roots and rhizospheric soil of *L. albescens* plants were collected in a perimeter of 50 m from arenized (29°42'31" S and 55°32'45" W) and non-arenized (29°30'52" S and 55°08'40" W) areas. All samples were collected in November 2012. During this period, *L. albescens* were in the flowering stage. We defined rhizospheric soil as the soil adhered to the roots. Rhizospheric soil from 20 *L. albescens* plants grown in arenized or non-arenized areas were separately mixed, and 0.5 kg of fresh weight from each area were analyzed to determine pH, organic matter (OM), clay, phosphorous (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), and aluminum (Al) contents using standard methods [65].



### **Bradyrhizobia isolation from *L. albescens* root nodules**

All of the root nodules from the 40 *L. albescens* plants sampled were removed and surface sterilized by washing them in 70% ethanol for 1 min, followed by a 2% sodium hypochlorite (v/v) wash for 1 min, and finally five serial washes with sterilized distilled water. Bradyrhizobia isolation was performed according to standard procedures and purified by repeated streaking [64]. Individual slow-growing colonies were cultured in yeast mannitol (YM) medium [77] for 7 days at 28°C and stored at -20°C in 50% glycerol.

### **Evaluation of indolic compounds production**

Bradyrhizobia isolates were grown in YM medium supplemented with tryptophan ( $2.4 \times 10^{-3}$  M) for 5 days at 28°C. The analysis of indolic compounds (ICs) production was performed according to the method described by Glickmann and Dessaux [22]. This methodology uses the Salkowski reagent ( $7.2 \times 10^{-2}$  M of  $\text{FeCl}_3$  + 7.9 M of  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) in solution with the bacterial supernatant. The pink coloration of this solution indicates the bacterial production of ICs. The samples were spectrophotometrically measured at 550 nm using a standard curve for calibration.

### **Molecular techniques**

Each bradyrhizobia isolate was grown in King B medium for 7 days at 28° C. The bacterial cultures were subjected to DNA extraction according to Sambrook and Russel [58]. To confirm the bacterial genus, the obtained DNA was PCR amplified with primers BacpaeF [66] and Bac1542R [18] (Table 1). These primers amplify a fragment of approximately 1,534 base pairs (bp) between nucleotides 8 and 1,542 of the prokaryotic 16S rRNA gene. The primers and PCR conditions used to amplify a fragment of *recA*, *glnII*, *atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *rpoB*, *nodAB*, and *nodZ* genes are also listed in Table 1.

**Table 1:** Primers for each targeted gene and PCR amplification conditions.

Primer	Sequence (5' - 3')	TG* (Position)	PCR conditions	References
BRdnaKf	TTCGACATCGACGCSAACGG	<i>dnaK</i> (1411–1430)	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	[41]
BRdnaKr	GCCTGCTGCKTGATACATGGC	<i>dnaK</i> (1905–1885)		
TsrecAf	CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG	<i>recA</i> (8-32)	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	[68]
TsrecAr	CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG	<i>recA</i> (620-594)		
TSatpDf	TCTGGTCCGYGGCCAGGAAG	<i>atpD</i> (189-208)	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	[68]
TSatpDr	CGACACTTCCGARCCSGCCTG	<i>atpD</i> (804-784)		
TSglnIIf	AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG	<i>glnII</i> (13-38)	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 58°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C	[68]
TSglnIIr	SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG	<i>glnII</i> (681-660)		
gyrB343F	TTCGACCAGAAATCCTAYAAGG	<i>gyrB</i> (343-364)	5 min 95°C, 5 X (2 min 94°C, 2 min 58°C, 1 min 72°C), 28 X (30 s 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C), 5 min 72°C	[36]
gyrB1043R	AGCTTGTCCTTSGTCTGCG	<i>gyrB</i> (1061-1043)		
rpoB83F	CCTSATCGAGGTTACAGAAGGC	<i>rpoB</i> (83-103)	5 min 95°C, 3 X (2 min 94°C, 2 min 58°C, 1 min 72°C), 30 X (30 s 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C), 5 min 72°C	[36]
rpoB1061R	AGCGTGTTGCGGATATAGGCG	<i>rpoB</i> (1081-1061)		
TSnodD1	CAGATCNAGDCCBTTGAARCGCAT	<i>nodD</i> (24–1)	2 min 95°C, 35 X (45 s 95°C, 30 s 53°C, 2.5 min 72°C), 7 min 72°C.	[68]
TSnodA2b	GATTCCVWGBCCYTCVAGATC	<i>nodA</i> (345–325)		
TSnodB2N	CTGTGRTTHGCRACTYRTGYCC	<i>nodB</i> (239–217)		
TSnodZ3	GGTTTCGGYGAYTGCTBTGGTC	<i>nodZ</i> (40–62)	2 min 95°C, 35 X (45s 95°C, 30 s 53°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C.	[44]
TSnodZ4	AATRTCTTCGCCRTTRCCRTGCC	<i>nodZ</i> (552–530)		
BacpaeF	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rDNA (1-20)	2 min 94°C, 35 X (1 min 94°C, 1 min 55°C, 1.5 min 72°C), 7 min 72°C.	[66]
Bac1542R	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	16S rDNA (1549-1530)		[18]

\*TG = Target gene.

PCR products were sequenced using a Megabace 1000 automatic sequencer using the DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Health Care). The DNA sequences were analyzed with BioEdit version 7.0.9.0 software [25] to verify their quality and to check for possible chimeric origins. The sequences from 16S rRNA genes were compared with sequences from the EzTaxon-e Server, which is an extension of the EzTaxon database [8] (available at <http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>). Other sequences were compared with those from the GenBank database using BLASTN software [1] (available at <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). The nucleotide sequences obtained in this work were deposited in the GenBank database under accession numbers: XXXXX to XXXXX for the 16S rRNA gene, YYYYY to YYYYY for *recA*, ZZZZZZ to ZZZZZZ for *glnII*, KKKKKK to KKKKKK for *atpD*, LLLLLL to LLLLLL for *dnaK*,BBBBBB toBBBBBB for *gyrB*, RRRRRR to RRRRRR for *rpoB*, AAAAAA to AAAAAA for *nodAB*, and NNNNNN to NNNNNN for *nodZ*.

### **Phylogenetic Analyses**

Phylogenetic analyses were performed after sequence alignments using both the Neighbor-joining (NJ) and Bayesian methods. The alignments were performed using MUSCLE [17], implemented in MEGA 6.0 [72]. The NJ analyses were performed in MEGA 6.0 using a Kimura 2-parameters with 1,000 bootstrap replications. The Bayesian analyses were performed using BEAST1.7 software [14]. The model of nucleotide evolution used in all analyses was the GTR+I+G, selected by the jModelTest software [10]. The Yule process was selected as a tree prior to Bayesian analysis; 10,000,000 generations were performed for the 16S rRNA, *nodZ*, and *nodAB* analyses and 20,000,000 for the concatenated housekeeping genes analyses using Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithms. The trees were visualized and edited using FIGTREE version 1.3.1 software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

The phylogenetic analyses were performed with four different datasets. The first dataset comprised of 1,207 bp fragments from the 16S rRNA genes from the 74 *Bradyrhizobium* sp. isolates. For this analysis, we used the following reference strains: *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303 [85], *B. iriomotense* EK 05 [27], *B. cytisi* CTAW 11 [6], *B. canariense* BTA 1 [78], *B. japonicum* USDA 6 [30], *R. lupine* DSM 30140 [34], *B. daqingense* CCBAU 15774 [79], *B. liaoningense* 228 [81], *B. elkanii* USDA 76 [32], *B. pachyrhizi* PAC 48 [51], *B. lablabi* CCBAU 23086 [7], *B. jicamae* PAC68 [51], and the out-group *Ochrobactrum lupini* LUP21 [73].

The second dataset comprised of 2,238 bp fragments from six concatenated housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, *recA*, *glnII*, *rpoB*, and *gyrB*) from 24 *Bradyrhizobium* sp. isolates that were previously selected based on the analysis of their 16S rRNA gene sequences and on their ICs production activity. Due to the large number of housekeeping genes analyzed, a different set of reference strains was used: *B. lablabi* CCBAU 23086, *B. pachyrhizi* PAC 48, *B. elkanii* LMG 6135 [15], *B. rifense* CTAW 71 [5], *B. canariense* LMG 22265 [78], *B. japonicum* USDA 6, *B. diazoefficiens* USDA 110 [11], *B. daqingense* CCBAU 15774, *B. huanghuaihaiese* CCBAU 23303, and the out-group *Rhizobium etli* CFN 42 [60].

The third and fourth datasets were composed of nodulation genes. The third dataset comprised the 435 bp fragment of the nodulation gene *nodZ*. Reference strains used in this analysis were as follows: *Bradyrhizobium* sp. CH 2506 [67], *B. yuanmingense* SEMIA 6319 [40], *Bradyrhizobium* sp. FTA 6 [67], *B. diazoefficiens* USDA 110, *Bradyrhizobium* sp. USDA 135 (USDA), *Bradyrhizobium* sp. CH 2493 [67], *Bradyrhizobium* sp. Pop 367 [33], *B. elkanii* WUR 3 [12], *B. jicamae* PAC 68 [46], and the out-group *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 [31]. The fourth and last dataset was comprised of the 1,245 bp fragment of concatenated nodulation genes *nodAB*. Reference

strains used in this analysis were *B. japonicum* USDA 6, *B. yuanmingense* CCBAU 10071 [83], *Bradyrhizobium* CH 2490 [67], *Bradyrhizobium* C 8 [67], *Bradyrhizobium* WU 8 [63], *Mesorhizobium* CCBAU 1123 [82], and *Bradyrhizobium* AEKY 10 [50].

All the sequences used as reference strains were obtained from the GenBank database with the accession numbers cited in their respective Figure (Fig. 1 and 3) with the exception of Figure 2 due to the high number of genes analyzed.

### **Growth chamber inoculation experiment**

Five bradyrhizobia isolates were selected according to their ability to produce ICs: Riz38, Riz44, Riz96, Riz124, and Riz151. These isolates were inoculated in *L. albescens* plants in a growth chamber experiment to evaluate their potential to promote the growth of *L. albescens* plants.

The growth chamber experiment included five repetitions for each bradyrhizobia isolate plus two control treatments without bacterial inoculation, one with nitrogen [35 mg of nitrogen as  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  per pot – positive control (T+)] and another without nitrogen [negative control (T-)]. The experiment was carried out in plastic pots with 500 g of sterile vermiculite. *L. albescens* seeds were previously scarified and surface sterilized by washing them in 70 % ethanol for 3 min, followed by washing with 2 % sodium hypochlorite (v/v) for 3 min and five serial rinses with sterilized distilled water. These seeds were pre-germinated under sterile conditions for 3 days at 21°C. One seed per pot was planted 2 cm below the vermiculite surface, and each seed was immediately inoculated with one bradyrhizobia isolate [5 ml of bradyrhizobia suspension in a saline solution (0.85% NaCl) containing  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>]. A 50 ml volume of Sarruge nutrient solution [59] without nitrogen and diluted to 25 % was added to each pot every week.

Substrate moisture was verified every day. After a period of 50 days, the plants were harvested and root and shoot lengths were determined. The plant material was dried

for four days at 65°C, and the plant dry weights were then evaluated. Then, 0.2 g of plant dry shoots was utilized for analyzing the nitrogen (N), phosphorus (P), and potassium (K) contents. The obtained data were used to compare plant growth among the different bacterial treatments and non-inoculated controls. A statistical analysis was performed via an ANOVA test, with means compared using the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS

Samples of the rhizospheric soil and the roots of *L. albescens* plants were collected from arenized and non-arenized areas in south Brazil. The soil nutrient analysis (Table 2) showed that both areas present low nutrient levels, but arenized soil presented even lower levels of phosphorous (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), organic matter (OM), and clay, and higher levels of toxic aluminum. The soil pH was considered strongly acidic in the arenized area (pH = 4.9) and moderately acidic in the non-arenized area (pH = 5.5). An important difference among the two studied areas was that in the non-arenized area, the soil had dense vegetation coverage (grasslands) while the soil in the arenized area did not have vegetation coverage and only a few *L. albescens* plants (Fig. S1).

**Table 2:** Soil nutrient analysis of arenized and non-arenized areas.

Sampling sites*	P --- mg dm <sup>-1</sup> ---	K	Clay	OM	pH H <sub>2</sub> O	Al	Ca	Mg
			%			---	cmol <sub>c</sub> (dm <sup>3</sup> ) <sup>-1</sup> ---	
AS	1.4	24.0	8	0.5	4.9	0.4	0.5	1.1
NAS	21.9	83.2	16	1.0	5.5	0.12	3.18	2.8

\*Sampling sites: AS = arenized soil; NAS = non-arenized soil. OM = Organic matter content

Seventy-four different bradyrhizobia strains were isolated from root nodules of *L. albescens*. Among these, 38 were isolated from plants that grown in the arenized area (AS) and 36 from the non-arenized area (NAS - Table 3). The evaluation of indolic compounds (ICs) production showed that the majority of these isolates was able to produce an intermediary amount of ICs (50 – 100  $\mu\text{g}$  of IC  $\text{mL}^{-1}$ ) and only one isolate, from the non-arenized area (NAS151), produced more than 100  $\mu\text{g}$  of IC  $\text{mL}^{-1}$  (Table 3). The ICs data did not reveal significant differences among *Bradyrhizobium* sp. isolates from arenized and non-arenized areas.

**Table 3:** Number of Bradyrhizobia isolated from root nodules of *Lupinus albescens* grown in arenized and non-arenized areas and their ability to produce indolic compounds.

Site:	Bacterial species*	number of isolates	IC production ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
			0 - 50	50 - 100	> 100
AS	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	38	17	21	0
NAS	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	36	17	18	1
Total:		74	34	49	1

\* Bacterial genus was identified by sequencing the 16S rRNA gene. IC = Indolic Compounds. AS = *Bradyrhizobium* sp. isolated from arenized soil. NAS = *Bradyrhizobium* sp. isolated from non-arenized soil.

After the characterization of the studied area, the isolation of the microorganisms and the evaluation their ICs production, we performed a phylogenetic study. First, we studied the 16S rRNA genes of the 74 bacterial isolates. Because we were interested in isolates that promote plant growth, based on the 16S rRNA phylogeny we selected the best ICs producers from each clade. We identified 24 isolates to study by multilocus

phylogenetic analyses. Thereafter, the multilocus phylogenetic analyses were composed of three datasets: the first dataset with six concatenated housekeeping genes (*dnaK*, *atpD*, *recA*, *glnII*, *gyrB*, and *rpoB*); the second with the *nodZ* gene; and the third with concatenated *nodAB* genes.

### Sequences Characterization

The analysis of 1,207 bp of 16S rRNA genes from the 74 isolates showed a high sequence similarity with the *Bradyrhizobium* genus. The nucleotides of these sequences were 90.55% conserved; the 38 sequences from isolates from the arenized area were 91.30% conserved and the 36 sequences from isolates from the non-arenized area were 92.46% conserved. The most variable regions were observed among nucleotides 915 – 966 and 1173 – 1198.

From each of the six housekeeping genes selected, the sizes of the fragments analyzed were as follows: *dnaK* (70 kDa chaperone protein – 245 bp), *recA* (recombination protein RecA – 381 bp), *atpD* (ATP synthase beta-chain – 333 bp), *glnII* (glutamine synthetase II – 603 bp), *gyrB* (subunit B protein of DNA gyrase – 199 bp), and *rpoB* ( $\beta$  subunit of RNA polymerase – 477 bp). The more conserved nucleotide sequences were *gyrB* (84.9% conserved), *atpD* (82.8%), and *recA* (82.7%), while the less conserved sequences were *glnIII* (65.8%), *dnaK* (77.5%) and *rpoB* (79.2%). Analyzing all the housekeeping genes together, the *Bradyrhizobium* sp. isolates from the arenized area presented more conserved sequences (90.4% of conservation) than isolates from the non-arenized area (83.2%).

When analyzed together, the segment of the 435 bp from *nodZ* (synthesizes a fucosyl transferase) and the segment of the 1,167 bp from concatenated *nodAB* nodulation genes of isolates from arenized and non-arenized areas were conserved only 53.7% and 46.2%, respectively. This low level of nucleotide sequence conservation may be a



consequence of the low conservation observed among *Bradyrhizobium* sp. sequences isolated from the non-arenized area. The *nodZ* gene from these *Bradyrhizobium* isolates was only 53.7% conserved, and the concatenated *nodAB* genes were only 46.5% conserved. *Bradyrhizobium* isolates from the arenized area had highly conserved *nodZ* and concatenated *nodAB* sequences (90.6% and 98.5%, respectively).

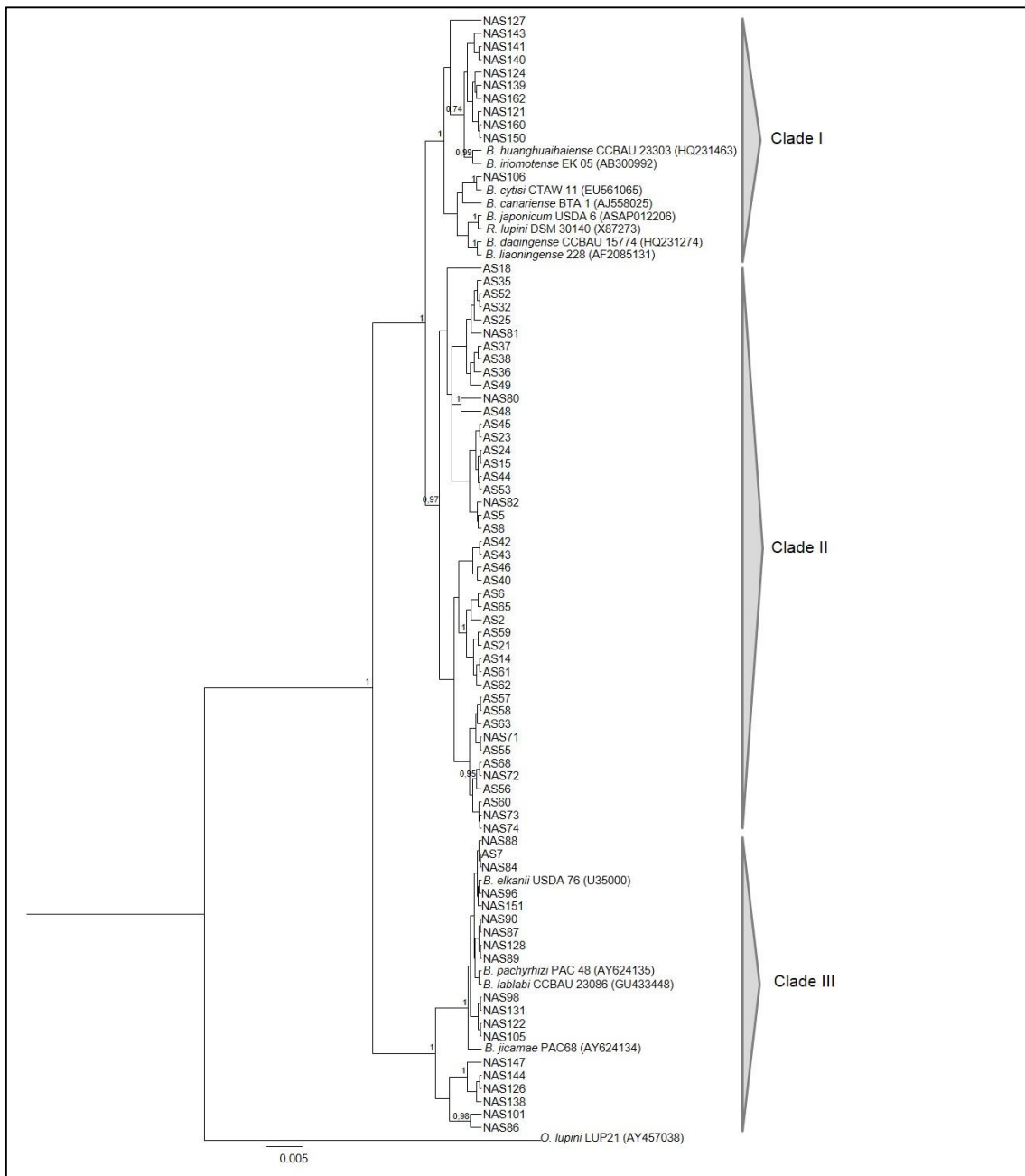
All the analyzed sequences from our *Bradyrhizobium* sp. isolates showed no significant differences in their content of A, T, G, and C bases.

### **Phylogenetic Analysis**

Phylogenetic analyses were performed using both the NJ and Bayesian methods. Although the bayesian and NJ analyses have showed similar topologies, the posterior probabilities in the bayesian analysis were better than bootstrap values in the NJ. Therefore, we chose only bayesian trees to discuss the phylogenetic results in this work. The NJ trees can be found in the supplementary material (Fig. S2, S3, and S4).

This study starts with the analysis of the 16S rRNA gene sequences from 74 *Bradyrhizobium* isolates. This analysis resulted in three different clades (Fig. 1 and Fig. S2). The first clade (Clade I) included 11 *Bradyrhizobium* isolates from the non-arenized area. These isolates were closely related to the majority of *Bradyrhizobium* spp. reference strains used in this analysis. The second clade (largest clade - Clade II) included 44 isolates, and most of them (37) were isolated from the arenized area. No *Bradyrhizobium* spp. sequence from reference strains were observed in this clade. The third clade (Clade III) included 19 *Bradyrhizobium* sp. isolates, and only one of them was isolated from the arenized area (AS7). The *Bradyrhizobium* spp. isolates included in these clade were closely related to *B. elkanii* strain USDA 76 (isolated from soybean), *B. pachyrhizi* strain PAC 48 (isolated from *Pachyrhizus erosus*), *B. lablabi* strain CCBAU 23086 (isolated

from *Lablab purpureus*), and *B. jicamae* strain PAC 68 (also isolated from *Pachyrhizus erosus*).



**Figure 1:** Phylogenetic tree of the 74 bradyrhizobial isolates from arenized (AS) and non-arenized (NAS) areas and 13 reference strains inferred by Bayesian analysis using 1,207 bp of the 16S rRNA gene. The significance of each branch is indicated at the branching points by posterior probability  $\geq 0.90$ .

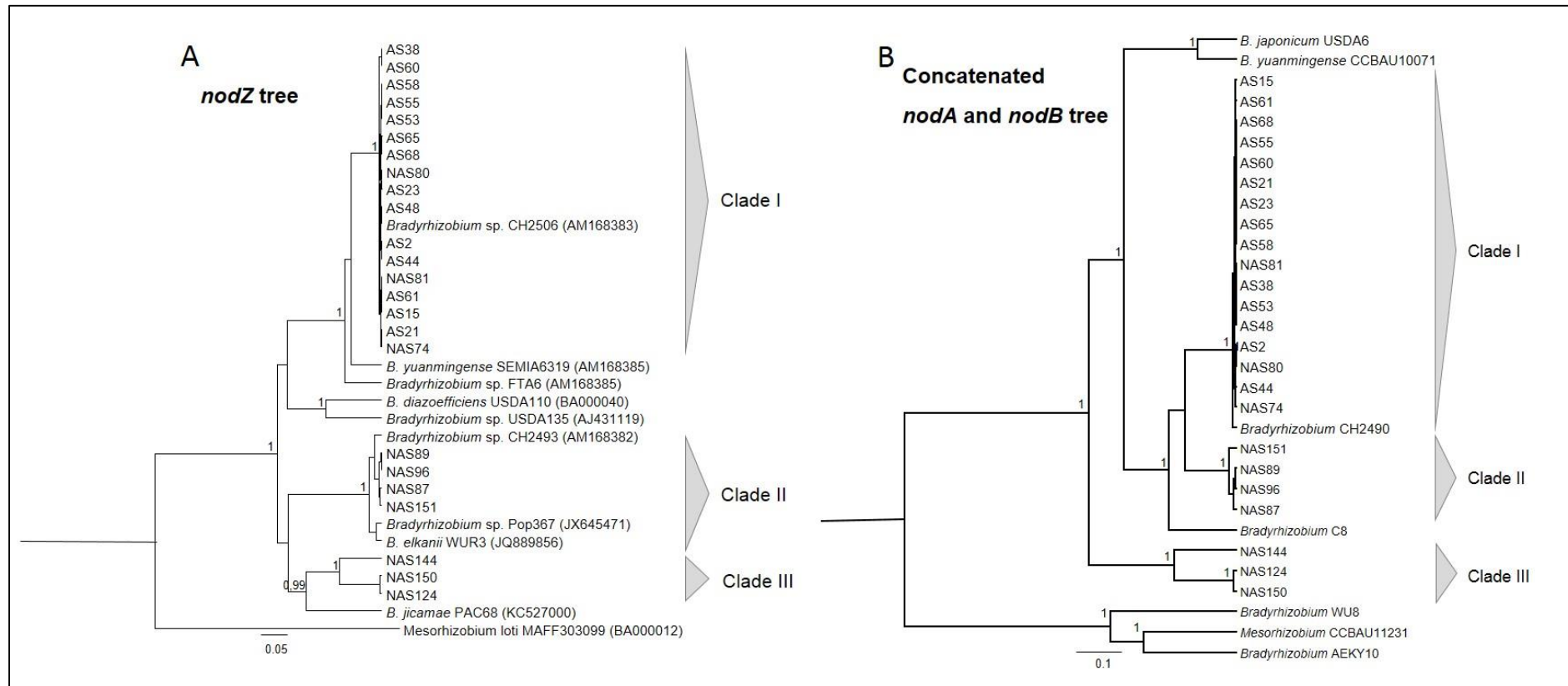
The analysis of the six housekeeping genes (Fig. 2 and Fig. S3) also resulted in three different clades. These clades corroborate with those observed in the 16S rRNA gene tree. The first clade (Clade I) included four *Bradyrhizobium* sp. isolates from the non-arenized areas, which were closely related to *B. elkanii* strain LMG 6135 (isolated from soybean), *B. pachyrhizi* strain PAC 48, and *B. lablabi* strain CCBAU 23086. The second clade (Clade II) included all *Bradyrhizobium* sp. isolated from the arenized area (14 isolates) and three isolates from non arenized area (NAS74, 80, and 81). The third clade (Clade III) included four isolates from the non-arenized area. The second and third clades did not have a phylogenetic relationship with the *Bradyrhizobium* spp. reference strains used in this analysis. Most of the reference strains used in this analysis clustered in a separated group.



**Figure 2:** Phylogenetic tree of the 24 bradyrhizobial isolates from arenized (AS) and non-arenized (NAS) areas and 10 reference strains inferred by Bayesian analysis using 2,238 bp of six housekeeping concatenated genes (*atpD*, *dnaK*, *recA*, *glnII*, *rpoB*, and *gyrB*). The significance of each branch is indicated at the branching points by posterior probability  $\geq 0.90$ .

The phylogenetic tree based on the *nodZ* gene (Fig. 3.A and Fig. S4.A) showed the same topology as the concatenated tree of housekeeping genes, also resulting in three different clades. The first clade (Clade I) included all isolates from the arenized area and three from the non-arenized area (NAS74, 80, and 81). These *Bradyrhizobium* sp. isolates were closely related to the *Bradyrhizobium* sp. strain CH2506 (isolated from *Lupinus uleanus* root nodules in Brazilian soils). The second clade (Clade II) included four isolates from the non-arenized areas (NAS87, 89, 96, and 151), which were closely related to *Bradyrhizobium* sp. CH2493 (isolated from *L. paraguariensis* in Brazil), *Bradyrhizobium* sp. Pop367 (from *Phaseolus lunatus* in Mexico), and *B. elkanii* WUR 3 (from *Chamaecrista fasciculata* in Europe). The third clade included three *Bradyrhizobium* sp. isolates from the non-arenized area (NAS124, 144 and 150), which were closely related to *B. jicamae* PAC 68 (isolated from *Pachyrhizus erosus* in Honduras).

Similarly to the results from the analysis of concatenated housekeeping genes and *nodZ*, the phylogenetic tree for *nodAB* also grouped the *Bradyrhizobium* sp. isolates into three different clades (Fig. 3.B and Fig. S4.B). Clade I included all *Bradyrhizobium* sp. isolates from the arenized area and three from the non-arenized area (NAS74, 80, and 81). These isolates were closely related to *Bradyrhizobium* sp. CH2490 isolated from *Lupinus paranensis* in Brazilian soils. Clades II and III included only *Bradyrhizobium* sp. isolates from the non-arenized area and were not related to reference strains used in this work.



**Figure 3:** Phylogenetic tree of the 24 bradyrhizobial isolates from arenized (AS) and non-arenized (NAS) inferred by Bayesian analysis using 435 bp of the nodulation gene *nodZ* (A) and 1,245 bases pairs of concatenated nodulation genes *nodAB* (B). The significance of each branch is indicated at the branching points by posterior probability  $\geq 0.90$ .

### **Inoculation experiment with *L. albescens* plants**

When five *Bradyrhizobium* sp. isolates (two from the arenized area – AS38 and AS44; three from the non-arenized area - NAS96, NAS124 and NAS151) were inoculated in *L. albescens* plants, *Bradyrhizobium* isolates from the arenized area were most effective in the promotion of plant growth (Table 4). Plants inoculated with these isolates showed the best results of root dry matter, shoot length and dry matter, and shoot nutrient content (N, P, K). These values were statistically similar to or higher than the non-inoculated positive control that received 35 mg of N (T+). Plant inoculation with *Bradyrhizobium* sp. from the non-arenized area showed results statistically similar to the non-inoculated negative control (T-) that not received N.

### **DISCUSSION**

It is known that soil is the basis of all life on earth. Soil erosion ranks as one of the most serious environmental problems in the world [47]. This problem occurs as a consequence of poorly managed natural and human ecosystems, including agriculture and forestry. As a result, the diversity of plants, animals, and microbes is diminished [48]. In the south of Brazil, the soil is naturally fragile and, together with a poorly planned agriculture, results in losses of the organic matter and erosion, forming sand banks called arenized zones [24]. Our results confirm that the south of Brazil presents poor soils with low nutrient levels, but this problem is seriously worsened in the arenized area (Table 2). The absence of vegetal coverage, an extremely acidic soil pH, and a high content of toxic aluminum make the arenized area a severe environment for development and establishment of microbial communities [13, 24].

**Table 4:** Growth-promoting effects of *L. albescens* plants 50 days after their inoculation with the five selected Bradyrhizobia isolates.

Treatment	Root	Root	Shoot	Shoot	amount of N per	amount of P per	amount of K per
	length (mm)	dry matter (mg)	Length (mm)	dry matter (mg)	plant (mg)	plant (mg)	plant (mg)
T+	178.2±9.6abc	211.4±19.6b	131.2±8.5b	741.5±33.2b	14.2±0.1b	1.3±0.3bc	4.4±0.4a
AS38	195.5±21.3a	376.2±8.7a	170.7±14.6a	1400.9±54.4a	53.9±4.7a	1.9±0.4a	3.6±0.3 a
AS44	173.2±13.5abc	379.1±17.6a	164.2±4.3a	1298.9±14.9a	50.8± 3.7a	1.8±0.3ab	3.4±1.0a
NAS96	141.5±10.6c	134.9±18.9c	73.0±5.6c	322.4±13.9c	4.3± 0.9c	1.1±0.2cd	1.4±0.2b
NAS124	139.5±16.1c	133.1±16.8c	92.7±4.3c	294.1±7.4c	4.6±0.5c	0.7±0.2d	1.3±0.4b
NAS151	186.2±18.9ab	130.2±17.6c	88.2±15.9c	288.5±7.6c	4.9±1.4c	0.4±0.1d	0.9±0.3b
T-	156.25±11.1bc	118.9±13.3c	85.0±3.3c	307.1±19.2c	2.7±1.7c	0.6±0.2d	1.1±0.2b

AS = Bradyrhizobia isolated from Arenized soil; NAS = Bradyrhizobia isolated from Non-Arenized Soil. N = Nitrogen, P = Phosphorous, K = Potassium. The means followed by different letters differ by using Tukey test ( $P < 0.01$ ). T- control treatment without nitrogen fertilization; T+ control treatment with 30 mg of N (given as  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) per pot. The assay was conducted in plastic pots with sterile vermiculite. Substrate moisture was verified every day, and each pot receive 50 mL of Sarruge nutritive solution every week (diluted 25 % [59]) without N.

The characterization of the 74 *Bradyrhizobium* sp. isolates showed that most of them are low (0-50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) or intermediate (50-100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) indolic compounds (ICs) producers. Phytohormones of indolic group stimulate seed germination, increase the rate of root formation, control processes of vegetative growth, tropism, florescence, and fructification of plants, affect the biosynthesis of various metabolites, and provide plant resistance to stress factors [74]. Association of ICs producers *Bradyrhizobium* sp. with *L. albescens* plants in arenized areas might be very important for the plant's adaptation to this extreme environment. Therefore, the study of the diversity of *Bradyrhizobium* sp. in these areas and their phylogenetic relationships is important in understanding how the arenization process affects the microbial community, especially symbiotic nitrogen fixers.

The phylogenetic analyses performed with the four different datasets showed similar topologies, grouping the *Bradyrhizobium* sp. isolates from *L. albescens* root nodules into three supported clades. One clade grouped bacterial isolates from the arenized area with a few isolates from the non-arenized area. The other two clades grouped only isolates from the non-arenized area. Interestingly, the 16S rRNA gene sequences from isolates from the non-arenized area were more conserved than those from isolates from arenized area. However, analysis of the housekeeping and nodulation genes showed otherwise, that *Bradyrhizobium* sp. sequences from the non-arenized area were more diverse than sequences from the arenized area.

The low concentration of nutrients [56], high concentration of toxic aluminum [23] and absence of vegetal coverage (extreme soil temperatures are reached [35]) make arenized areas a severe environment for the establishment of *Bradyrhizobium*-legume symbiosis [84]. These factors may be selecting a few resistant and efficient *Bradyrhizobium* sp. strains, which were capable of forming nodules in *L. albescens* plants



that grown in the arenized area. Analysis of 16S rRNA genes showed that the *Bradyrhizobium* sp. isolated from the arenized area were closely related to *B. japonicum*, but phylogenetic analysis grouped these isolates separately. These data may indicate that these bacterial isolates are a new *Bradyrhizobium* species. Jarabo-Lourenzo et al. [28] obtained similar results in their work with bradyrhizobial populations isolated from seven *Lupinus* species (*L. luteus*, *L. angustifolius*, *L. hispanicus*, *L. consentinii*, *L. micranthus*, *L. albus*, and *Lupinus* sp.). In this work, the authors studied some *Bradyrhizobium* sp. isolates that were closely related to *B. japonicum*, but they concluded that the majority of them were new species.

The isolates from the non-arenized area displayed similarities with some *Bradyrhizobium* reference strains studied in this work. These *Bradyrhizobium* sp. isolates are genetically different from the *Bradyrhizobium* sp. isolated from the arenized area; however, a more in-depth investigation is needed to establish their phylogenetic relationships. Nevertheless, all the data obtained up until now indicate that they could also belong to two new species.

The Clade III formed in the phylogenetic tree of 16S rRNA gene and Clade I formed in the analysis of housekeeping genes showed that *B. elkanii*, *B. lablabi*, and *B. pachyrhizi* are closely related species. When Chang et al. [7] described the new species *B. lablabi*, they reported a close relationship of this species with *B. elkanii* and *B. pachyrhizi*. Other phylogenetic analysis performed by Durán et al. [16] also found a relationship between these three species and their *Bradyrhizobium* sp. symbiont of *Lupinus mariae-josephae* isolated from alkaline-limited soils in eastern Spain. The *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *L. albescens* isolated in this work were isolated from Brazilian acidic soils and were also phylogenetically related to *B. lablabi*, *B. elkanii*, and *B. pachyrhizi*. Raza et al. [52] found a *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) symbiont of *L. albus*

that was able to grow in acidic (pH = 4) and alkaline (pH = 8) media. However, there are no studies reporting that the same *Bradyrhizobium* sp. could be isolated from soils from alkaline and acidic environments.

One main aspect of leguminous nodulation by rhizobia is the presence of Nod factors. Rhizobial genes involved in the biosynthesis of the Nod factor core are the common *nodABC* genes [2]. However, other *nod* genes confer plant specificity. For example, the *nodZ* gene determines the fucosylation of glucosamine at the reducing end [29]. Thus, we performed our phylogenetic analysis with concatenated *nodAB* and separated *nodZ* genes. The phylogenetic analysis of Nod factors used in this work resulted in three distinct clades. In the analysis of *nodAB* genes, Clade I grouped all *Bradyrhizobium* sp. isolates from the arenized area, three from the non-arenized area and the *Bradyrhizobium* sp. strain CH2490 isolated from *L. paranensis* in Brazilian soils. The other two clades, which were comprised only of non-arenized *Bradyrhizobium* sp. isolates, did not show similarity to the reference strains. Stepkowski et al. [67] showed that the *nodA* gene tree had a strong geographical structure (*Bradyrhizobium* isolates from “New World” Lupine species grouped separately from “Old World” Lupine species). The same result was confirmed in the present work, as the *Bradyrhizobium* sp. isolates showed similarity only with American bradyrhizobia isolates.

The three supported clades formed by *nodZ* gene analysis showed that one clade (Clade I) grouped all *Bradyrhizobium* sp. isolates from the arenized area and three from the non-arenized area, which were similar to *Bradyrhizobium* sp. strain CH2506 isolated from *L. uleanus* in Brazilian soils. The other two clades, which included only non-arenized *Bradyrhizobium* sp. isolates, showed phylogenetic similarity with bradyrhizobia isolates from different legumes in American Continent, as exception of *B. elkanii* strain

WUR3 isolated from European soils. Kalita et al. [29] also showed high similarity among *nodZ* genes from *Bradyrhizobium* spp. symbiont of several different legumes.

The concatenated *nodAB* tree and the *nodZ* tree had a congruent topology. The validity of this data is supported by Stepkowski et al. [68] and Moulin et al. [44], who showed that *nodA* and *nodZ* trees are congruent. Analysis of *nodAB* and *nodZ* showed that *Bradyrhizobium* sp. isolated from the arenized area were similar to reference strains CH2490 and CH2506, respectively, both symbionts of *Lupinus* spp. in Brazilian soils. Stepkowski et al. [67] showed that these both strains belong to *nodA* Clade III.2, which grouped *Bradyrhizobium* isolates that are symbionts of *Lupinus* spp. from the American continent, more specifically from the lowlands of Texas, Brazil, Argentina, Paraguay, Uruguay, and the Bolivian Andes. However, the same study grouped these strains separately when analyzing the *atpD* gene; *Bradyrhizobium* sp. strain CH2506 was related to *B. japonicum* USDA6 and *Bradyrhizobium* sp. strain CH2490 was not related to the reference strains used.

The *Bradyrhizobium* sp. isolates from the arenized area selected for the inoculation experiment of *L. albescens* plants were highly efficient in promoting plant growth for several parameters analyzed when compared to the effects of the other isolates and the controls. Some reports already showed that there are some *Bradyrhizobium* spp. isolates resistant to environmental stresses such as salt [52, 61], temperature [86, 57], and pH [52, 39], and were therefore efficient plant growth promoters. The arenized area is characterized by pH extremely acidic soil, low nutrient content, and a high content of toxic aluminum, which makes this environment extremely stressful for plant development [24]. Therefore, our data suggest that the environment selects for *Bradyrhizobium* sp. strains according to plant needs. Knowing that the arenized area is an unfavorable environment for plant growth, the best plant growth promoter *Bradyrhizobium* sp. isolates

seem to have been selected for symbiosis with *L. albescens* plants, which helps the plant's adaptation and development. The phylogenetic analysis performed in this work showed that *Bradyrhizobium* sp. isolates from root nodules of *L. albescens* grown in the arenized area are different from those isolated from the non-arenized area. The potential of plant growth also confirmed these results. Meghvansi et al. [39] reported that *Bradyrhizobium* sp. isolated from alkaline soils and resistant to acid environments were more efficient in promoting plant growth and fixing nitrogen in soybean (*Glicine max*).

## CONCLUSION

The *Bradyrhizobium* spp. isolates that are symbionts of *L. albescens* plants were different in the arenized and non-arenized areas. Analysis of 16S rRNA, *dnaK*, *atpD*, *recA*, *glnII*, *rpoB*, *gyrB*, *nodA*, *nodB*, and *nodZ* nucleotide sequences showed that strains from the non-arenized area have higher variability. Phylogenetic study displayed the existence of three distinct clades, which most likely are three different new *Bradyrhizobium* species, one species from the arenized area and two from the non-arenized area. *In vivo* inoculation experiment with *L. albescens* plants indicated that *Bradyrhizobium* sp. isolated from an extreme environment (the arenized area) were more efficient in promoting plant growth than those isolated from the non-arenized area. This result suggested that the environment is affecting the selection of the more efficient plant growth promoters to sustain plant growth.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Drs. Flávio Eltz and Sandro Giacomini from the Universidade Federal de Santa Maria, RS for the *Lupinus* samples. This work was financed by a grant and fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) da Fixação Biológica do Nitrogênio (Brazil).

## REFERENCES

- [1] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaeffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Ac. Res.* 25, 3389–3402.
- [2] Atkinson, E.M., Palcic, M.M., Hindsgaul, O., Long, S.R. (1994) Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acetyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 8418–8422.
- [3] Barrera, L.L., Trujillo, M.E., Goodfellow, M., García, F.J., Hernández-Lucas, I., Dávila, G., van Berkum, P., Martínez-Romero, E. (1997) Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1086–1091.
- [4] Castaldi, P., Santona, L., Melis, P. (2005) Heavy metal immobilization by chemical amendments in a polluted soil and influence on white lupin growth. *Chemosphere* 60, 365–371.
- [5] Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Barrijal, S., Velázquez, E., Bedmar, E.J. (2012) *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 302–305.
- [6] Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., Bedmar, E.J. (2011) *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2922–2977.

- [7] Chang, Y.L., Wang, J.Y., Wang, E.T., Liu, H.C., Sui, X.H., Chen, W.X. (2011) *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2496–2502.
- [8] Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W. (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2259–2261
- [9] Conterato, I.F., Schifino-Wittmann, M.T. (2006) New chromosome numbers, meiotic behaviour and pollen fertility in American taxa of *Lupinus* (Leguminosae): contributions to taxonomic and evolutionary studies. *Bot. J. Linn. Soc.* 150, 229–240
- [10] Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772–772.
- [11] Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I.S., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* Group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3342–3351.
- [12] den Camp, R.O., Polone, E., Fedorova, E., Roelofsen, W., Squartini, A., den Camp, H.J.M., Bisseling, T., Geurts, R. (2012) Nonlegume *Parasponia andersonii* deploys a broad *rhizobium* host range strategy resulting in largely variable symbiotic effectiveness. *Am. Phytopathol. Soc.* 25, 954–963.
- [13] Deng, H., Zhang, B., Yin, R., Wang, H., Mitchell, S.M., Griffiths, B.S., Daniell, T.J. (2010) Long-term effect of re-vegetation on the microbial community of a severely eroded soil in sub-tropical China. *Plant Soil.* 328, 447–458.
- [14] Drummond, A.J., Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214–218.

- [15] Dupuy, N., Willems, A, Pot, B., Dewettinck, D., Vandenbruaene, I., Maestrojuan, G., Dreyfus, B., Kersters, K., Collins, M. D., Gillis, M. (1994) Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 461–73.
- [16] Durán, D., Rey, L., Sánchez-Cañizares, C., Navarro, A, Imperial, J., Ruiz-Argueso, T. (2013) Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 128–36.
- [17] Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Ac. Res.* 32, 1792–1797.
- [18] Edwards, U., Rogall, T., Blockerl, H., Emde, M., Bottger, E.C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucl. Ac. Res.* 17, 7843-7853.
- [19] Fernández-Pascual, M., Pueyo, J.J., Felipe, M.R., Golvano, M.P., Lucas, M.M. (2007) Singular features of the *Bradyrhizobium-Lupinus* symbiosis. *Dyn. Soil, Dyn. Plant.* 1, 1-16.
- [20] Fuentes, E., Planchuelo, A.M. (1999) Wild lupins as pioneers on riverside sand banks. *Proceedings of the 9th International Lupin Conference.* p 30 - 33.
- [21] Gladstones, J.S., Atkins, C.A., Hamblin, J. (1998) Lupins as crop plants: biology, production and utilization. Ln: Distribution, origin, taxonomy, history and importance. pp. 1-37.
- [22] Glickmann, E., Dessaux, Y. (1995) A critical examination of the specificity of the Salkowski Reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ. Microbiol.* 61, 793–796.

- [23] Grahan, P.H. (1992) Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38, 475–484
- [24] Granada, C., Costa, P.B., Lisboa, B.B., Vargas, L.K., Passaglia, L.M.P. (2013) Comparison among bacterial communities present in arenized and adjacent areas subjected to different soil management regimes. *Plant Soil.* 373, 339–358.
- [25] Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Ac. Symp. Ser.* 4, 95–98.
- [26] Howieson, J.G., Fillery, I.R.P., Legocki, A.B., Sikorski, M.M., Stepkowski, T., Minchin, F.R., Dilworth, M.J. (1998) Nodulation, nitrogen fixation and nitrogen balance. In: Gladstones JS, Atkins CA, Hamblin J (eds) *Lupins as crop plants: biology, production and utilization*. CABI, Oxon, pp 149–180.
- [27] Islam, M.S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., Seki, T. (2008) *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote island in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1416–1429.
- [28] Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Donate-Correa, J., Rivas, R., Velázquez, E., Hernández, M., Temprano, F., Martínez-Molina, E., Ruiz-Argüeso, T., León-Barrios, M. (2003) Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. *Syst. App. Microbiol.* 26, 611–623.
- [29] Kalita, M., Stepkowski, T., Łotocka, B., Małek, W. (2006). Phylogeny of nodulation genes and symbiotic properties of *Genista tinctoria* bradyrhizobia. *Arch. Microbiol.* 186, 87–97.



- [30] Kaneko, T., Maita, H., Hirakawa, H., Uchiike, N., Minamisawa, K., Watanabe, A., Sato, S. (2011) Complete Genome Sequence of the Soybean Symbiont *Bradyrhizobium japonicum* Strain USDA6<sup>T</sup>. *Genes*. 2, 763–787.
- [31] Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A. et al. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7, 381–406.
- [32] Kuykendall L.D., Saxena B., Devine T.E., Udell S.E. (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp.nov. *Can. J. Microbiol.* 38, 501-505.
- [33] López-López, A., Negrete-Yankelevich, S., Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez, J., Martínez-Romero, E. (2013). Native bradyrhizobia from Los Tuxtlas in Mexico are symbionts of *Phaseolus lunatus* (Lima bean). *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 33–38.
- [34] Ludwig, W., Rossellö-Mora, R., Aznar, R., Klugbauer, S., Spring, S., Reetz, K., Beimfohr, C., Brockmann, E., Kirchhof, G., et al. (1995) Comparative Sequence Analysis of 23S rRNA from Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 18, 164–188.
- [35] Marsh, L.E., Baptiste, R., Marsh, D.B., Trinklein, D., Kremer, R. (2006) Temperature effects on *Bradyrhizobium* spp. growth and symbiotic effectiveness with Pigeonpea and Cowpea. *J. Plant Nutr.* 29, 331-346.
- [36] Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., Willems, A. (2008) Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 200-214.

- [37] Martínez-Alcalá, I., Walker, D.J., Bernal, M.P. (2010) Chemical and biological properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* alter soil heavy metal fractionation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 595–602.
- [38] Martini, J.E.J. (1979) Karst in Black Reef Quartzite near Kaapsehoop, Eastern Transvaal. *Ann. South Afr. Geol. Surv.* 13, 115-128.
- [39] Meghvansi, M.K., Prasad, K., Mahna, S.K. (2005). Identification of pH tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains and their symbiotic effectiveness in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] in low nutrient soil. *Af. J. Biotechnol.* 4, 663–666.
- [40] Menna, P., Hungria, M. (2011). Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 3052–3067.
- [41] Menna, P., Barcellos, F.G., Hungria, M. (2009) Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2934–2950.
- [42] Merino, E.F., Planchuelo, A.M., Wink, M. (1999) Phylogenetic analysis of *Lupinus*. *Proceeding of the 9<sup>th</sup> International Lupin conference.* pp: 287-290.
- [43] Mihailovi, V., Hill, G.D., Lazarevi, B., Eickmeyer, F., Miki, A., Dugali, G. (2008) Performance of blue lupin (*Lupinus angustifolius* L.) cultivars on a pseudogley soil in Serbia. *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Lupin Conference.* pp: 51-54.
- [44] Moulin, L., Béna, G., Boivin-Masson, C., Stepkowski, T. (2004). Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30, 720–732.

- [45] Naganowska, B., Wolko, B.S., Liwinska, E., Kaczmarek, Z., Schifino-Wittmann, M.T. (2006) 2C DNA variation and relationships among new world species of the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Plant Syst. Evol.* 256, 147–157.
- [46] Ormeño-Orrillo, E., Servín-Garcidueñas, L.E., Imperial, J., Rey, L., Ruiz-Argueso, T., Martínez-Romero, E. (2013) Phylogenetic evidence of the transfer of *nodZ* and *nolL* genes from *Bradyrhizobium* to other rhizobia. *Mol. Phylogenet. Evol.* 67, 626–630.
- [47] Pimentel, D., Kounang, N. (1998) Ecology of Soil Erosion in Ecosystems. *Ecosystems*. 1, 416–426.
- [48] Pimentel, D., Harvey, C., Resosudarmo, P., Sinclair, K., Kurz, D., McNair, M., Crist, S., Sphpritz, L., Fitton, L., Saffouri, R., Blair, R. (1995) Environmental and economic costs of soil erosion and conservation benefits. *Science*. 267, 1117–1123.
- [49] Planchuelo, A.M., Dunn, D.B. (1984) The simple leaved lupines and their relatives in Argentina. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 71, 92 – 103.
- [50] Qian, J., Kwon, S.W., Parker, M.A. (2003). *rRNA* and *nifD* phylogeny of *Bradyrhizobium* from sites across the Pacific Basin. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 159–165.
- [51] Ramírez-Bahena, M.H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Willems, A., Velázquez, E. (2009) *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1929–1934.
- [52] Raza, S., Jornsgard, B., Abou-Taleb, H., Christiansen, J.L. (2001) Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Lett. App. Microbiol.* 32, 379–383.

- [53] Roesch, L.F.W., Vieira, F.C.B., Pereira, V.A., Schünemann, A.L., Teixeira, I.F., Senna, A.J.T., Stefenon, V.M. (2009) The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. *Diversity*. 1, 182 – 198.
- [54] Rovedder, A.P., Eltz, F. (2008) Revegetação com plantas de cobertura em solos arenizados sob erosão eólica no Rio Grande do Sul. *R. Bras. Ci. Solo*. 32, 315 - 321.
- [55] Rovedder, A.P.M., Eltz, F.L.F., Drescher, M.S., Schenato, R.B., Antonioli, Z.I. (2007) Organismos edáficos como bioindicadores da recuperação de solos degradados por arenização no Bioma Pampa. *Cienc. Rural*. 39, 1061-1068.
- [56] Sadowsky, J.M. (2005) Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In: *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*. Springer pp. 89-112.
- [57] Saeki, Y., Ozumi, S., Yamamoto, A., Umehara, Y., Hayashi, M., Sigua, G.C. (2010) Changes in population occupancy of *Bradyrhizobia* under different temperature regimes. *Microb. Environ.* 25, 309–312.
- [58] Sambrook, J., Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [59] Sarruge, J.R. (1975) Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba 1, 231–234
- [60] Segovia, L., Young, J.P., Martínez-Romero, E. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 374–177.
- [61] Shamseldin, A., Werner, D. (2005) High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. *Curr. Microbiol.* 50, 11–16.

- [62] Shen, J., Li, H., Neumann, G., Zhang, F. (2005) Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in *Lupinus albus* as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. *Plant. Sci.* 168, 837–845.
- [63] Smart, J.B., Dilworth, M.J., Robson, A.D. (1984) Effect of phosphorus supply on phosphate uptake and alkaline phosphatase activity in Rhizobia. *Arch. Microbiol.* 140, 281-286.
- [64] Somasegaram, P., Hoben, M.J. (1985) Methods in legume-rhizobium technology. NIFTAL, Hawaii, p 367.
- [65] Sparks, D.L. (1996) Methods of soil analysis: chemical methods. SSSA Book Series, Madison, WI.
- [66] Stackebrandt, E., Liesack W. (1993) Nucleic acids and classification, p.151–194. In M. Goodfellow and A. O’Donnell (ed.), Handbook of new bacterial systematics. Academic Press, London;
- [67] Stepkowski, T., Hughes, C.E., Law, I.J., Markiewicz, T., Gurda, D., Chlebicka, A., Moulin, L. (2007) Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3254 – 3264.
- [68] Stepkowski, T., Moulin, L., Krzyzanska, A., Mcinnes, A., Law, I.J., Howieson, J., Law, I.J., Howieson, J. (2005) European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting Lupins and Serradella in soils of western Australia and South Africa. *App. Environ. Microbiol.* 71, 7041-7052.
- [69] Stroschein, M.R.D., Eltz, F.L.F., Antonioli, Z.I., Lupatini, M., Vargas, L.K., Giongo, A., Pontelli, M.P. (2010) Symbiotic efficiency and genetic characteristics of *Bradyrhizobium* sp. strain UFSM LA 1.3 isolated from *Lupinus albus* (H. et Arn). *Sci. Agric.* 67, 702 - 706.

- [70] Suertegaray, D.M.A. (1998) *Deserto grande do sul: controvérsia*. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 130p.
- [71] Suertegaray, D.M.A. (1987) *A trajetória da natureza: um estudo geomorfológico sobre as areias de Quaraí, RS*. São Paulo, Universidade de São Paulo. 243p - Phd tesis.
- [72] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Pilipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA 6: Molecular Evolucionary Genetics Analysis version 6.0. *Molec. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- [73] Trujillo, M.E., Willems, A., Abril, A., Luden, D., Mateos, P.F., Martí, E. (2005) Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp . nov . *App. Environm. Microbiol.* 71, 1318–1327.
- [74] Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A., Netrusov, A.I. (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *App. Biochem. Microbiol.* 42, 117–126.
- [75] Valverde, A., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Vizcaíno, N., Rivas, R., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Igual, J.M., Willems, A. (2005) *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1985–1989.
- [76] Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M.J., Esteban, E., Peñalosa, J.M., Carpena, R.O. (2006) Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Wat. Air Soil Poll.* 177, 349–365.
- [77] Vincent, J.M. (1970) *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook, n. 15, Blackwell, Oxford.
- [78] Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Werner, D., Martínez-Romero, E. (2005) *Bradyrhizobium canariense*

- sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 569–575.
- [79] Wang, J.Y., Wang, R., Zhang, Y.M., Liu, H.C., Chen, W.F., Wang, E.T., Sui, X.H., Chen, W.X. (2013) *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 616-624.
- [80] Wolko, B., Clements, J.C., Naganowska, B., Nelson, M.N., Yang, H. (2011) Lupinus. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Legume Crops and Forrage. Ed. Springer, New York – DOI: 10.1007/978-3-642-14387-8.
- [81] Xu, L.M., Ge C., Cui Z., Li J., Fan H (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. Int. J. System. Bacteriol. 45, 706-711.
- [82] Yan, X.R., Chen, W.F., Fu, J.F., Lu, Y.L., Xue, C.Y., Sui, X.H., Li, Y., Wang, E.T., Chen, W.X. (2007) *Mesorhizobium* spp. are the main microsymbionts of *Caragana* spp. grown in Liaoning Province of China. FEMS Microbiol. Lett. 271, 265–273.
- [83] Yao, Z.Y., Kan, F.L., Wang, E.T., Wei, G.H., Chen, W.X. (2002) Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 2219–2230.
- [84] Zahran, H.H. (1999) *Rhizobium* -Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. Microbiol. Molec. Biol. Ver. 63, 968–989.
- [85] Zhang, I.M., Li Jr, Y., Chen, W.F., Wang, E.T., Sui, X.H., Li, Q.Q., Zhang, Y.Z., Zhou, Y.G., Chen, W.X. (2012) *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an

effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1951-1957.

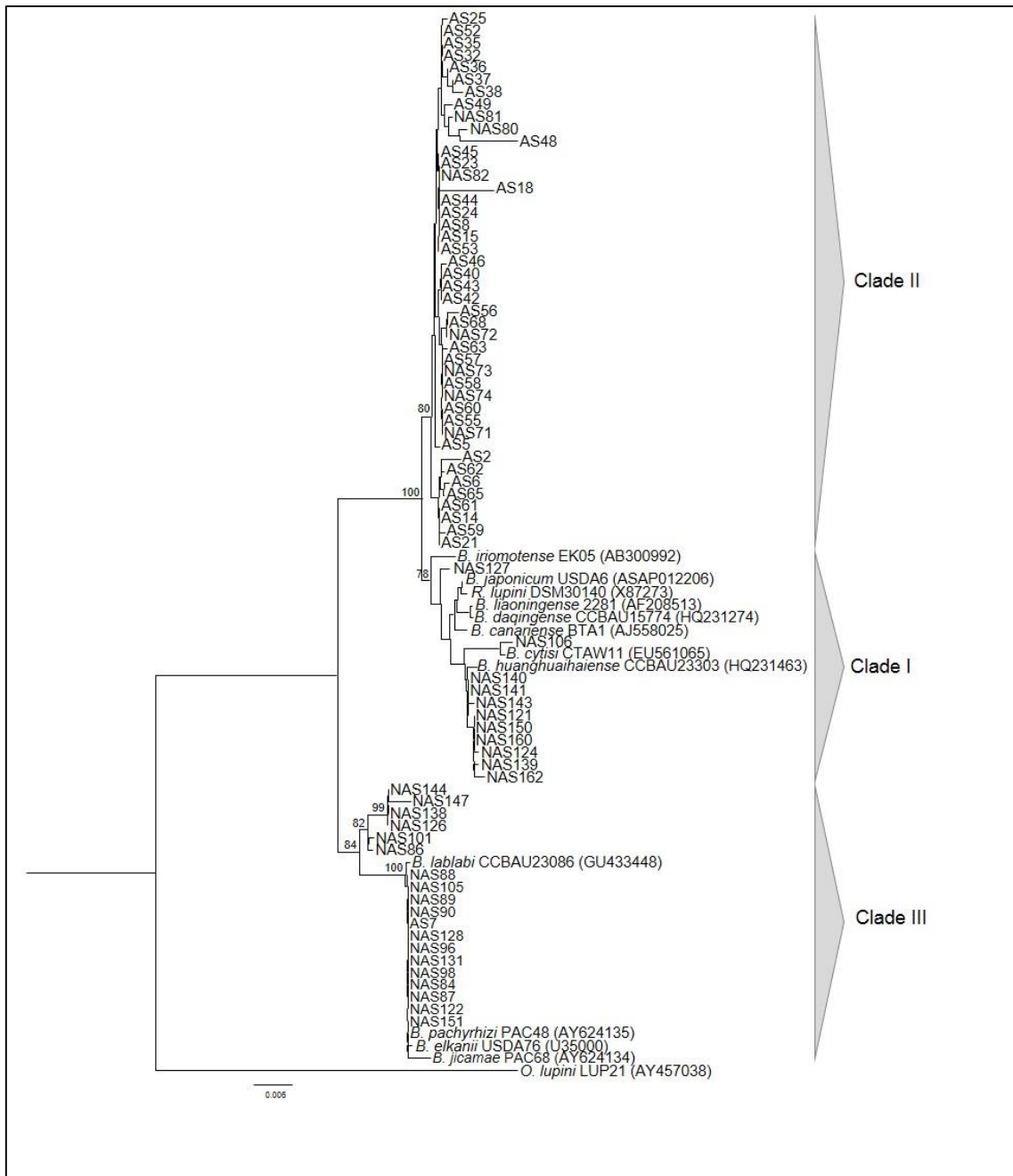
- [86] Zhang, H., Prithi, B., Charles, T.C., Driscoll, B.T., Smith, D.L. (2003) Low temperature tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains allowing improved nodulation and nitrogen fixation of soybean in a short season (cool spring ) area. *Europ. J. Agro.* 19, 205–213.



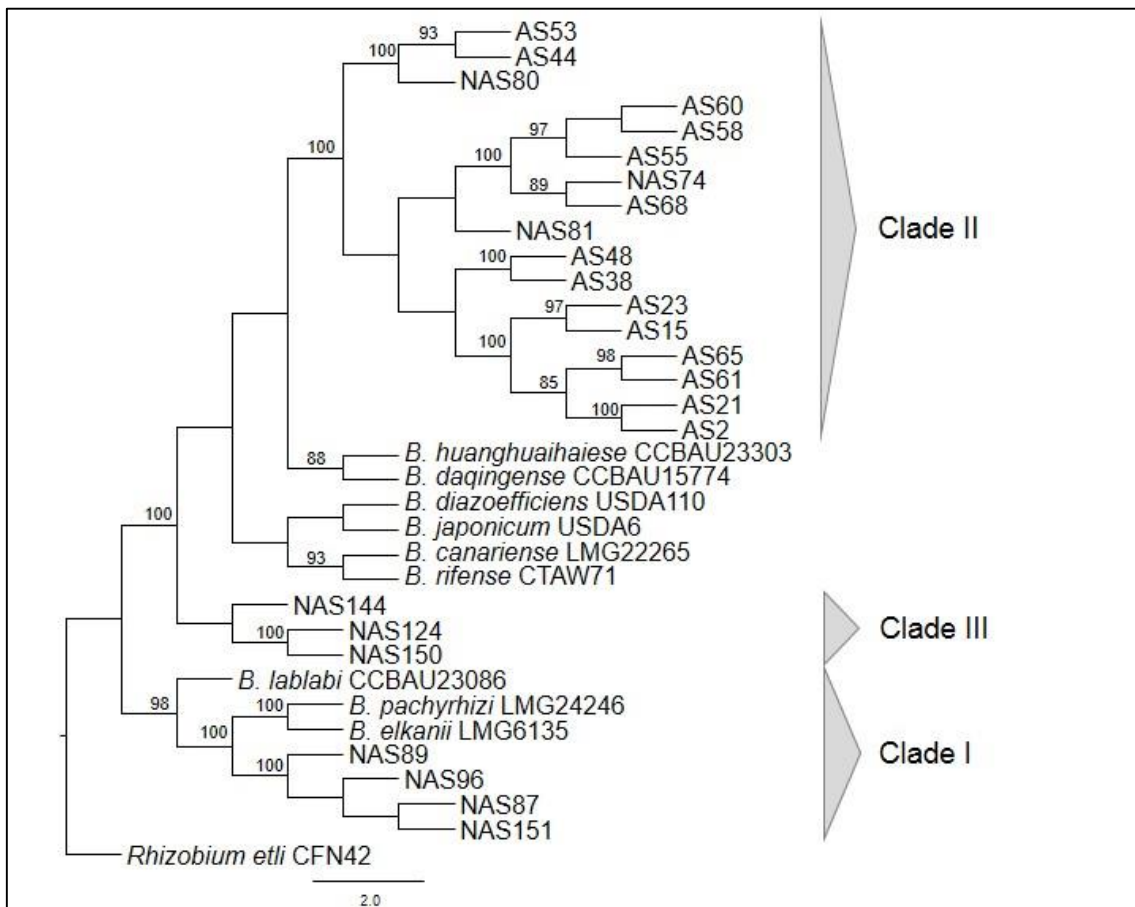
## Supplementary Material



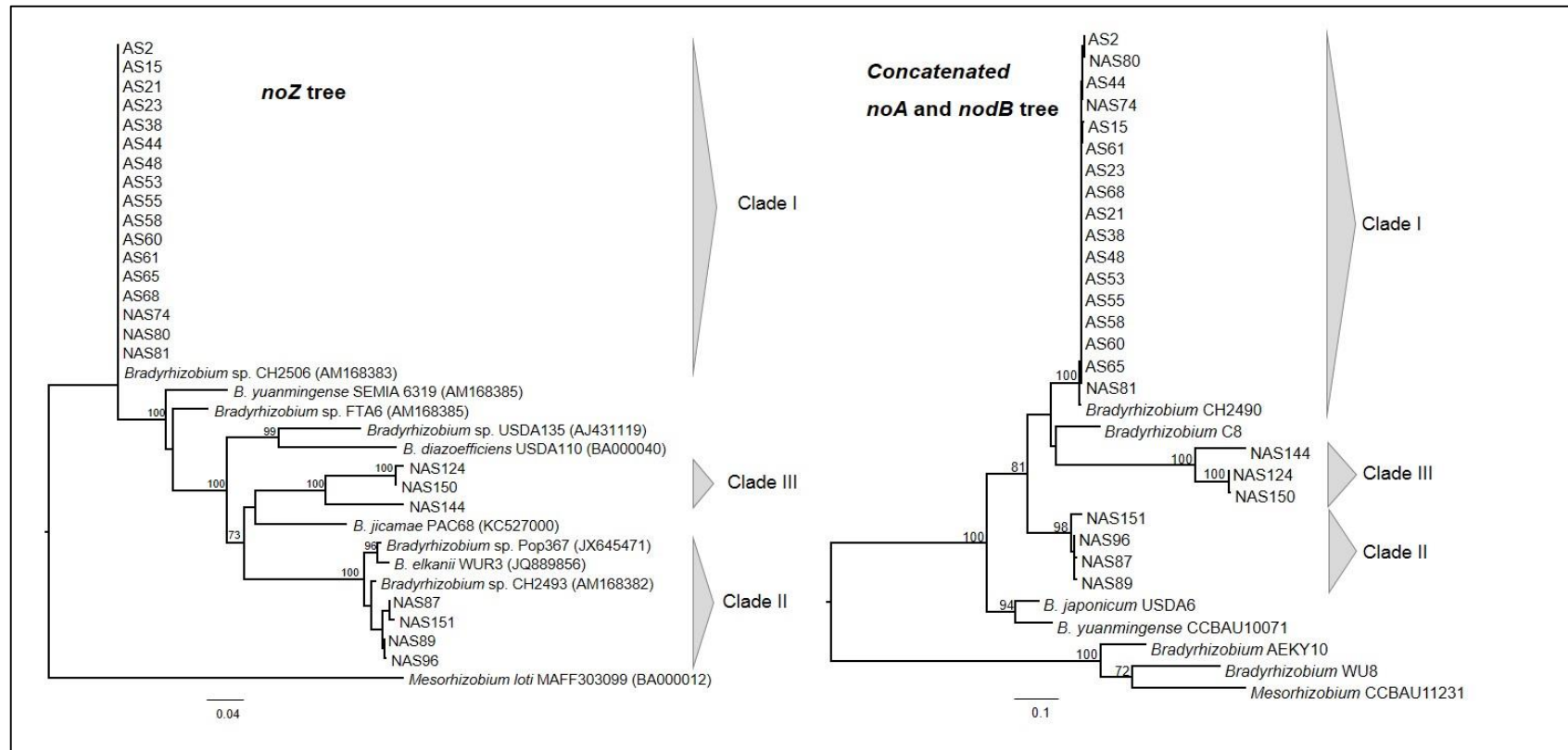
**Figure S1:** *Lupinus albescens* plant grown in the arenized area (A) and the non-arenized area (B). It can be observed that in the non-arenized area, the soil had dense vegetation coverage (grasslands), while in the arenized area, the soil did not have vegetation coverage with only few spaced *L. albescens* plants.



**Figure S2:** Neighbor-joining phylogenetic tree of the 74 bradyrhizobial isolates from arenized (AS) and non-arenized (NAS) areas and 10 reference strains using 1,207 bp of the 16S rRNA gene. The significance of each branch is indicated at the branching points by a bootstrap percentage calculated for 1,000 subsets (only values higher than 70% are indicated).



**Figure S3:** Neighbor-joining phylogenetic tree of the 24 bradyrhizobial isolates from arenized (AS) and non-arenized (NAS) areas and 13 reference strains using six housekeeping concatenated genes (*atpD*, *dnaK*, *recA*, *glnII*, *rpoB*, and *gyrB*). The significance of each branch is indicated at the branching points by a bootstrap percentage calculated for 1,000 subsets (only values higher than 70% are indicated).



**Figure S4:** Neighbor-joining phylogenetic tree of the 24 bradyrhizobial isolates from arenized (AS) and non-arenized (NAS) areas using the *nodZ* gene (A) and concatenated *nodAB* genes (B). The *nodZ* analysis was performed using 10 reference strains, while seven reference strains were used in the concatenated *nodAB* analysis. The significance of each branch is indicated at the branching points by a bootstrap percentage calculated for 1,000 subsets (only values higher than 70% are indicated). Scale bar = 0.04 for *nodZ* analysis and 0.1 for *nodAB* analysis.

## 5. Considerações finais

---

O processo de arenização do sudoeste do Rio Grande do Sul é um dos mais graves problemas socioambientais do Brasil. A localização e a dificuldade de acesso a estas áreas gera dificuldades na realização de estudos e trabalhos de extensão que visem minimizar o problema ou até recuperar tais núcleos de arenização. Sabendo da escassa vegetação que encobre os núcleos de arenização e da importância da microbiota do solo no estabelecimento e manutenção de culturas de plantas, nosso grupo decidiu realizar um estudo dos micro-organismos diazotróficos de plantas de *L. albescens* nativas do Pampa brasileiro (áreas arenizadas e adjacentes não arenizadas).

O presente estudo revelou que a escassez de nutrientes, pH extremamente ácido, baixa quantidade de argila e matéria orgânica e as altas concentrações de alumínio tóxico tornam os solos arenizados um ambiente inóspito não somente para o desenvolvimento de plantas, mas, também, para o estabelecimento e manutenção da comunidade microbiana. Comparando com suas áreas adjacentes, a microbiota das áreas arenizadas está altamente reduzida (tanto na quantidade como na diversidade). Os trabalhos envolvendo a diversidade de bactérias diazotróficas (simbióticas e de vida livre) promotoras de crescimento de plantas mostraram que o ambiente arenizado seleciona os poucos micro-organismos resistentes às condições adversas da região e que estes, por consequência, são potenciais promotores de crescimento de plantas de *L. albescens*.

Nosso estudo de inoculação de isolados de *Bradyrhizobium* sp. em plantas de *L. albescens* também mostrou claramente as diferenças no efeito de promoção de crescimento dos micro-organismos isolados de solos arenizados e não-arenizados. As plantas inoculadas com os isolados de solos arenizados se igualaram ou foram superiores ao controle não inoculado, que recebeu uma alta dose de nitrogênio, enquanto que as

plantas inoculadas com os isolados de solos não-arenizados foram semelhantes ao controle não inoculado e que não recebeu nitrogênio.

A recuperação das áreas arenizadas pode ser feita pelo cultivo de plantas de cobertura que visem o aumento da matéria orgânica destes locais. Plantas de *L. albescens* são altamente promissoras para este fim e a associação com bactérias diazotróficas pode incrementar seu grande potencial. Os isolados bacterianos obtidos neste trabalho ainda precisam ser testados em experimento de inoculação em plantas de *L. albescens* crescidas em diferentes tipos de solos antes de aplicar a estratégia de recuperação em um areal já estabelecido.

As análises filogenéticas também mostraram diferentes pools gênicos entre os isolados dos dois locais estudados, revelando uma variabilidade sempre maior entre os isolados de áreas não arenizadas. Nossos resultados não agruparam os *Bradyrhizobium* sp. isolados de áreas arenizadas com as espécies de *Bradyrhizobium* descritas na literatura, sugerindo que eles constituem uma nova espécie deste gênero bacteriano. Os isolados bacterianos de solos não arenizados precisam de mais estudos, mas nossos resultados igualmente sugerem que eles possam constituir duas novas espécies de *Bradyrhizobium*. Conseqüentemente, o próximo passo deste projeto será a descrição destas novas espécies.

O estudo filogenético de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* foi o início de uma nova linha de pesquisa no Laboratório de Microbiologia Agrícola do Departamento de Genética da UFRGS. Nosso laboratório, que executa com maestria o isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas de vida livre, avaliando seu potencial de promoção de crescimento de diversas plantas, começará a avaliar a diversidade de isolados bacterianos sob o foco filogenético. Este trabalho também nos propiciou a parceria com o pesquisador Tomasz Stepkowski do Institute of Bioorganic Chemistry da

Polish Academy of Sciences, em Varsóvia, Polônia. Esta parceria possibilitará o estudo de linhagens de *Bradyrhizobium* sp. simbiotes de plantas de *Lupinus* spp. originárias de várias partes do mundo.

## Referências Bibliográficas

---

- Abd'Alla MH (1999) Nodulation and nitrogen fixation of *Lupinus* species with *Bradyrhizobium* (lupin) strains in iron-deficient soil. *Biol Fertil Soils* 28: 407–415.
- Ab'Saber NA (1995) A Revanche dos Ventos: Destruição de solos areníticos e formação de areais na Campanha Gaúcha. *R Cienc Amb* 11: 33 - 55.
- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW (2008) Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Can J Microbiol.* 54:876 – 886.
- Adesemoye AO, Kloepper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1 – 12.
- Alami Y, Achouak W, Marol C, Heulin T (2000) Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl Environ Microbiol* 66: 3393 - 3398.
- Ali B, Sabri AN, Ljung K, Hasnain S (2008) Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phyto-stimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 519 – 526.
- Barea JM, Pozo MJ, Azcon R, Azcon-Aguilar C (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* 56(417):1761 - 1778.
- Baudoin E, Nazaret S, Mougél C, Ranjard L, Moënne-Loccoz Y (2009) Impact of inoculation with the phyto-stimulatory PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of the rhizobacterial community of field-grown maize. *Soil Biol. Biochem.* 41: 409 – 413.
- Berreta, E. (2001) Ecophysiology and management response of the subtropical grasslands of Southern America. In *Proceedings of the XIX International Grassland Congress*,



Gomide, J.A., Mattos, W.R.S., Silva, S.C., Eds.; São Pedro: Piracicaba, Brazil, pp. 939 - 946.

Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327 – 1350.

[Boddey](#) RM, Polidoro JC, Resende AS, Alves BJR, Urquiaga S (2001) Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to sugar cane and other grasses. *Australian J Plant Physiol.* 28(9): 889 – 895.

Boivin C e Giraud E (1999) Molecular symbiotic characterization of rhizobia, pp. 295-299. Martínez, E. & G. Hernández (Eds). *Highlights of Nitrogen Fixation Research*, Kluwer Academic/Plenium Publishers, New York.

Botelho GR (1996) Impacto ambiental de *Pseudomonas fluorescens* em rizosfera de milho (*Zea mays* L. Merrill) e seu potencial uso em biocontrole. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Braud A, Jézéquel K, Bazot S, Lebeau T (2009) Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* 74: 280 – 286.

Campos-Andrada MP, Bettencourt E, Martins LL, Mourato MP, Tavares-Sousa MM (2005) Evaluation of two sweet, Non-Shattering Sandplain Lupin (*Lupinus cosentinii* Guss) cultivars under Mediterranean conditions. *Proceedings of 11<sup>th</sup> International Lupin Conference.* pgs 41 - 45.

Castaldi P, Santona L, Melis P (2005) Heavy metal immobilization by chemical amendments in a polluted soil and influence on white lupin growth. *Chemosphere* 60: 365 – 71.

- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai W, Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34: 33 – 41.
- Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar OM (2010) Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol. Fertil. Soils.* 46: 727 – 738.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Cle C (2005) Use of Plant Growth-Promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol.* 71(9): 4951 – 4959.
- CRS/IBAMA, Centro de Sensoriamento remoto – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite, acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA, Monitoramento do bioma pampa 2002 a 2008. Brasília, 2010.
- Cummings SP (2009) The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic cultivation of graminaceous crops; potential and problems. *Environm Biotechnol.* 5(2): 43 - 50.
- Dary M, Chamber-Pérez M, Palomares J, Pajuelo E (2010) “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J. Hazard. Mater.* 177: 323 – 30.
- Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I.S., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* Group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3342-3351.

- Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiol. Ecol.* 72: 313 – 27.
- Ding GC, Piceno YM, Heuer H, Weinert N, Dohrmann AB, Carrillo A, Andersen GL, Castellanos T, Tebbe CC, Smalla K (2013) Changes of Soil Bacterial Diversity as a Consequence of Agricultural Land Use in a Semi-Arid Ecosystem. *PloS One* 8(3): e59497.
- Durán, D., Rey, L., Sánchez-Cañizares, C., Navarro, A, Imperial, J., Ruiz-Argueso, T. (2013) Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 128–36.
- Eckhardt MM, Baldwin IL, Fred EB (1930) Studies of the root-nodule organism of *Lupinus*. *J Bacteriol.* 21(4) 273 – 285.
- Eisenhauer N, Beßler H, Engels C, Gleixner G, Habekost M, Milcu A, Partsch S, Sabais ACW, Scherber C, Steinbeiss S, Weigelt A, Weisser WW, Scheu S (2010) Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecol* 1(2):485 - 496.
- Eltz F, Rovedder AP (2005) Revegetação e temperatura do solo em áreas degradadas no sudoeste do Rio Grande do Sul. *R. bras. Agrociência*, 11(2): 193 - 200.
- Estrada GA, Baldani VLD, Oliveira DM, Urquiaga S, Baldani JI (2013) Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil.* 369: 115 – 129.
- Fernández LA (2005) Exploring prokaryotic diversity: there are other molecular worlds. *Mol Microbiol* 55(1):5 - 15.

- Fernández-Pascual M, Pueyo JJ, Felipe MR, Golvano MP, Lucas MM (2007) Singular features of the *Bradyrhizobium-Lupinus* symbiosis. *Dynamic Soil, Dynamic Plant* 1(1): 1 - 16.
- Fuentes E, Planchuelo AM (1999) Wild lupins as pioneers on riverside sand banks. *Proceedings 9th international lupin conference*. pgs 30 - 33.
- Garg N, Geetanjali (2007) Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules : process and signaling . A review. *Agron. Sustain.* 27: 59 – 68.
- García JAL, Probanza A, Ramos B, Manero FJG (2001) Genetic variability of rhizobacteria from wild populations of *Lupinus* species based in PCR-RAPDs. *J Plant Nutr Soil Sci.* 164: 1 – 7.
- García JAL, Probanza A, Ramos B, Colón Flores JJ, Manero FJG (2004) Effects of Growth Promoting Rhizobacteria (PGPRs) on the Biological Nitrogen Fixation, Nodulation and Growth of *Lupinus albus* L, cv. Multolupa. *Eng Life Sci.* 4(1): 71 – 77.
- Geurts R, Bisseling T (2002) Rhizobium Nod Factor Perception and Signalling. *The Plant Cell.* S239 – S249.
- Giongo A, Beneduzi A, Ambrosini A, Vargas LK, Stroschein MR, Eltz FL, Bodanese-zanettini MH, Passaglia LMP (2010) Isolation and characterization of two plant growth-promoting bacteria from the rhizosphere of a legume (*Lupinus albus*) in sandy soil. *R Bras Ci Solo.* 34: 361 – 369.
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109 - 117.
- Glick BR, Patten CL, Holguin G, Penrose DM (1999) Biochemical and genetics mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London: 270 p.

- Glick BR (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* 21: 383 – 393.
- Gholami A, Shahsavani S, Nezarat S (2009) The effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *World Acad Sci, Eng Technol.* 25: 19 – 24.
- Gonzalez-Sama A, Lucas MM, de Felipe MR, Pueyo JJ (2004) An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytol.* 163: 371 – 380.
- Granada C, Costa PB, Lisboa BB, Vargas LK, Passaglia LMP (2013) Comparison among bacterial communities present in arenized and adjacent areas subjected to different soil management regimes. *Plant Soil* 373: 339 – 358.
- Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2007) Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39: 1968 – 1977.
- Haghighi BJ, Alizadeh O, Firoozabadi AH (2011) The role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in sustainable agriculture 1. *Adv Environm Biol.* 5(10): 3079 - 3083.
- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W (2005) Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 66 – 76.
- Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G (2008) Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* 163: 234 – 242.

- Hardarson G, Atkins C (2003) Optimising biological N<sub>2</sub> fixation by legumes in farming systems. *Plant Soil*. 252: 41 – 54.
- Hariprasad P, Niranjana SR (2009) Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil*. 316: 13 – 24.
- Hartwig UA, Phillips DA (1991) Release and Modification of nod-Gene-Inducing Flavonoids from Alfalfa Seeds. *Plant Physiol*. 95: 804 – 807.
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311: 1 – 18.
- Howard JB, Rees DC (1996) Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chem. Rev.* 96: 2965 – 2982.
- IBGE 2004. Mapa de Biomas do Brasil. Primeira aproximação. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomas.shtm> (Acesso em 20/01/2014).
- Intorne AC, de Oliveira MVV, Lima ML, da Silva JF, Olivares FL, de Souza Filho GA (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch. Microbiol*. 191: 477 – 483.
- Jarabo-Lorenzo A, Pérez-Galdona R, Donate-Correa J, Rivas R, Velázquez E, Hernández M, Temprano F, Martínez-Molina E, Ruiz-Argüeso T, León-Barrios M (2003) Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. *Syst App Microbiol*, 26: 611 - 623.
- Jilani G, Akram A, Ali RM, Hafeez FY, Shamsi IH, Chaudhry AN, Chaudhry AG (2007) Enhancing crop growth, nutrients availability, economics and beneficial

- rhizosphere microflora through organic and biofertilizers. *Ann. Microbiol.* 57: 177 – 184.
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil.* 205: 25 – 44.
- Jordan DC (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol.* 32: 136 – 139.
- Kabata-Pendias A (2004) Soil–plant transfer of trace elements - an environmental issue. *Geoderma* 122(2):143 - 149.
- Karthikeyan B, Joe MM, Islam MR, Sa T (2012) ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. *Symbiosis.* 56: 77 – 86.
- Kraepiel ML, Bellenger JP, Wichard T, Morel FMM (2009) Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. *Biometals.* 22: 573 – 581.
- Kuykendall LD (2003) Genus *Bradyrhizobium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> ed., vol 2, ed by Garrity GM, Springer-Verlag, New York (in press).
- Leigh GJ, Winterton N, Postgate J (2002) *Biological Nitrogen Fixation*. Copyright. **DOI:**10.1039/9781847551481-00233.
- Lloret L e Martínez-Romero E (2005) Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev Latinoam Microbiol.* 47: 43-60.
- Lynch JM (1990) *The rhizosphere*. Wiley-Interscience, Chichester, England:458 p.
- Mao Y, Yannarell AC, Mackie RI (2011) Changes in N-transforming archaea and bacteria in soil during the establishment of bioenergy crops. *PloS One* 6(9):e24750.

- Marschner P, Crowley D, Yang CH (2004) Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* 261: 199 – 208.
- Martínez-Alcalá I, Walker DJ, Bernal MP (2010) Chemical and biological properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* alter soil heavy metal fractionation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73: 595 – 602.
- Martínez-Romero E e Caballero-Mellado J (1996) *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15: 113 - 140.
- Martini JEJ (1979) Karst in Black Reef Quartzite near Kaapsehoop, Eastern Transvaal. *Ann South Afr Geol Surv* 13:115 – 128.
- Menna, P., Hungria, M. (2011). Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium*: supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 3052–3067.
- Merino EF, Planchuelo AM, Wink M (1999) Phylogenetic analysis of *Lupinus*. *Proceeding of the 9<sup>th</sup> International Lupin conference.* pgs: 287 - 290.
- Mihailovi V, Hill GD, Lazarevi B, Eickmeyer F, Miki A, Dugali G (2008) Performance of blue lupin (*lupinus angustifolius* L.) cultivars on a pseudogley soil in Serbia. *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Lupin Conference.* pgs 51 - 54.
- Ministério do Meio Ambiente. Pampa - Conhecimentos e Descobertas. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/pampa> (Acesso em 20/01/2014).
- Monteiro RA, Balsanelli E, Wassem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, Tadra-Sfeir MZ, Pankievicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM (2012) *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil.* 356: 175 – 196.



- Neubauer U, Furrer G, Kayser, Schulin R (2000) Siderophores, NTA, and Citrate: Potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. *Int J Phytorem.* 2(4): 353 - 368.
- Park JH, Bolan N, Megharaj M, Naidu R (2011) Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *J. Hazard. Mater.* 185: 829 – 836.
- Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *App Environm Microbiol.* 68(8): 3795 – 3801.
- Pearse, SJ, Veneklaas EJ, Cawthray GR, Bolland MD, Lambers H (2006) Carboxylate release of wheat, canola and 11 grain legume species as affected by phosphorus status. *Plant Soil.* 288: 127 – 139.
- Pillar VD, Tornquist CG, Bayer C. (2012) The southern Brazilian grassland biome: soil carbon stocks, fluxes of greenhouse gases and some options for mitigation. *Braz. J. Biol.* 72:673 – 681.
- Planchuelo AM, Dunn DB (1984) The simple leaved lupines and their relatives in Argentina. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 71: 92 – 103.
- Planchuelo AM (1999) Endangered species of wild lupins in South America. *Proceedings 9th international lupin conference.* pgs 34 - 37.
- Poonguzhali S, Madhaiyan M, SAT (2008) Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 773 – 777.
- Pulleman M, Creamer R, Hamer U, Helder J, Pelosi C, Pérès G, Rutgers M (2012) Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services - an overview of European approaches. *Current Opinion in Environmental Sustainability.*

- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H (2010) Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 28(3): 142 – 149.
- Raza S, Jürnsgerd B, Abou-Taleb H, Christiansen JL (2001) Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) strains to salinity , pH , CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. *Lett App Microbiol.* 32: 379 – 383.
- Rees DC, Akif Tezcan F, Haynes CA, Walton MY, Andrade S, Einsle O, Howard JB (2005) Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 363: 971 – 984.
- Reis VM, Reis Jr FB, Quesada DM, Oliveira OCA, Alves BJR, Urquiaga S, Boddey RM (2001) Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. *Australian J Plant Physiol.* 28(9): 837 – 844.
- Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319– 339.
- Rodriguez H, Gonzalez T, Goire I, Bashan Y (2004) Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91: 552 – 555.
- Roesch LFW, Vieira FCB, Pereira VA, Schünemann AL, Teixeira IF, Senna AJT, Stefenon VM (2009) The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. *Diversity* 1, 182 – 198.
- Roper MM, Ladha JK (1995) Biological Nitrogen Fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. *Plant Soil* 174: 211 - 224.
- Rovedder, A.P. (2003) Revegetação com culturas de cobertura e espécies florestais para a contenção do processo de arenização em solos areníticos no sudoeste do Rio Grande do Sul. Mestern dissertation, Universidade Federal de Santa Maria, 120pgs.

- Rovedder APM, Eltz FLF, Drescher MS, Schenato RB, Antonioli ZI (2007) Organismos edáficos como bioindicadores da recuperação de solos degradados por arenização no Bioma Pampa. *Cienc Rural*. 39(4): 1061-1068.
- Rovedder AP, Eltz F (2008) Revegetação com plantas de cobertura em solos arenizados sob erosão eólica no Rio Grande do Sul. *R Bras Ci Solo*, 32: 315 - 321.
- Sawada H, Kuykendall D e Young JM (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol*. 49: 155 – 159.
- Schulze J, Temple G, Temple SJ, Beschow H, Vance CP (2006) Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. *Ann. Bot.* 98: 731 – 740.
- Selosse MA, Baudoin E, Vandenkoornhuysen P (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies* 327: 639 - 648.
- Sessitsch A, Reiter B, Berg G (2004) [Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. \*Can J Microbiol\*. 50\(4\): 239 - 249.](#)
- Sharma A, Johri BN (2003) Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiol. Res.* 158: 243 – 248.
- Shen J, Li H, Neumann G, Zhang F (2005) Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in *Lupinus albus* as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. *Plant Sci.* 168: 837 – 845.
- Shoda M (2000) Bacterial control of plant diseases. *J. Biosci. Bioeng.* 89: 515 – 521.
- Shoebitz M, Ribaudó CM, Pardo MA, Cantore ML, Ciampi L, Curá JA (2009) Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 41: 1768 – 1774.

- Simms EL, Taylor DL, Povich J, Shefferson RP, Sachs JL, Urbina M, Tausczik Y (2006) An empirical test of partner choice mechanisms in a wild legume-rhizobium interaction. *Proc. Biol. Sci.* 273: 77 – 81.
- Singh JS, Pandey VC, Singh DP (2011) Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140: 339 – 353.
- Souto JJ (1985) *Deserto, uma ameaça?* Porto Alegre DRNR, Diretoria Geral, Secretaria da Agricultura.
- Souza R, Beneduzi A, Ambrosini A, Costa PB, Meyer J, Vargas LK, Schoenfeld R, Passaglia LMP (2012) The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil.* 366: 585 – 603.
- Sprent JI (2001) *Nodulation in legumes.* Royal Botanic Gardens, Kew, p. 146.
- Stepkowski T, Hughes CE, Law IJ, Markiewicz T, Gurda D, Chlebicka A, Moulin L (2007) Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3254 – 3264.
- Stroschein MRD, Eltz IFLF, Antonioli ZI, Lupatini M, Vargas LK, Giongo A, Pontelli MP (2007) Symbiotic efficiency and genetic characteristics of *Bradyrhizobium* sp. strain UFSM LA 1.3 isolated from *Lupinus albescens* (H. et Arn). *Sci Agric* 67 (6): 702 - 706.
- Suertegaray DMA (1987) *A trajetória da natureza: um estudo geomorfológico sobre as areias de Quaraí.* Phd Thesis, RS. São Paulo, Universidade de São Paulo, 243p.
- Suertegaray DMA (1998) *Deserto grande do sul: controvérsia,* 2nd ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 130p

- Suertegaray DMA (2011) Erosão nos campos sulinos: arenização no sudoeste do Rio Grande do Sul. R Bras Geomorf, 12(3): 61 - 74.
- Trujillo ME, Willems A, Abril A, Planchuelo AM, Rivas R, Ludeña D, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. (2005) Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. App Environ Microbiol. 71(3): 1318 - 1327.
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Klimova SY, Shestakov AI, Botina SG, Netrusov AI (2007) Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. Arch. Microbiol. 188: 655 – 664.
- Turner NC, Hartung W (2012) Dehydration of isolated roots of seven *Lupinus* species induces synthesis of different amounts of free, but not conjugated, abscisic acid. Plant Growth Regul. 66: 265 – 269.
- Valverde A, Velázquez E, Fernández-Santos F, Vizcaíno N, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, Igual JM, Willems A (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1985 – 1989
- Vega NWO (2007) A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. Rev Fac Nal Agr Medellín 60(1): 3621- 3643.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil. 255: 571 – 586
- Vinuesa P, Silva C, Werner D e Martínez-Romero E (2005) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. Molec Phylog Evol. 34: 29 – 54.

- Weisskopf L, Heller S, Eberl L (2011) *Burkholderia* species are major inhabitants of white lupin cluster roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 7715 – 7720.
- West JB, HilleRisLambers J, Lee TD, Hobbie SE, Reich PB (2005) Legume species identity and soil nitrogen supply determine symbiotic nitrogen-fixation responses to elevated atmospheric [CO<sub>2</sub>]. *New Phytol.* 167: 523 – 30.
- Wolko B, Clements JC, Naganowska B, Nelson MN, Yang H (2011) *Lupinus*. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Legume Crops and Forrage*. Ed. Springer, New York – DOI: 10.1007/978-3-642-14387-8.
- Yang Z e Rannala B (2012) Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews.* 13: 303 – 314.
- Yim WJ, Poonguzhali S, Madhaiyan M, Palaniappan P, Siddikee MA, Sa T (2009) Characterization of plant-growth promoting diazotrophic bacteria isolated from field grown Chinese cabbage under different fertilization conditions. *J. Microbiol.* 47: 147 – 55.
- Yu X, Liu X, Zhu TH, Liu GH, Mao C (2011) Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biol. Fertil. Soils.* 47: 437 – 446.

## Anexo 1

---

### Trabalhos complementares publicados

1 – Beneduzi A, Campos S, Ambrosini A, Souza R, **Granada CE**, Costa PB, Arruda L, Moreira F, Vargas LK, Weiss V, Tieppo E, Faoro H, Souza EM, Pedrosa FO e Passaglia LMP (2011) Genome Sequence of the Diazotrophic Gram-Positive Rhizobacterium *Paenibacillus riograndensis* SBR5<sup>T</sup>. J Bacteriol. 193(22): 6391–6392

2 – **Granada CE**, Arruda L, Lisboa BB, Passaglia LMP e Vargas LK (2014) Diversity of native rhizobia isolated in south Brazil and their growth promotion effect on white clover (*Trifolium repens*) and rice (*Oryza sativa*) plants. Biol Fertil Soils. 50: 123–132.

3 – **Granada CE**, Strochein M, Vargas LK, Bruxel M, Sá ELS e Passaglia LMP (2014) Genetic diversity and symbiotic compatibility among rhizobial strains and *Desmodium incanum* and *Lotus* spp. plants. Artigo aceiro para publicação na revista Genetics and Molecular Biology.