



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANA GRANGE

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIO CAPAZ DE NODULAR O
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*) ISOLADO DE SOLOS DA
REGIÃO NORDESTE E DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

LUCIANA GRANGE

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIO CAPAZ DE NODULAR O
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*) ISOLADO DE SOLOS DA
REGIÃO NORDESTE E DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação
em Genética e melhoramento para obtenção do
título de mestre em Genética e Melhoramento

Orientadora. Profa. Dra. Mariângela Hungria

Londrina
2011

LUCIANA GRANGE

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIO CAPAZ DE NODULAR O FEIJOEIRO
(*Phaseolus vulgaris*) ISOLADO DE SOLOS DA REGIÃO NORDESTE E
DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação
em Genética e melhoramento para obtenção do
título de mestre em Genética e Melhoramento

BANCA EXAMINADORA

Dra. Olivia Marcia Nagy Arantes
UEL – Londrina – PR

Dra. Diva de Souza Andrade
IAPAR – Londrina – PR

Dr. Mariangela Hungria
EMBRAPA – Londrina – PR

Londrina, 26 de fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Mariangela Hungria, agradeço não só a orientação, mas também a compreensão diante das minhas dificuldades e limitações. Quero deixar aqui registrado, minha admiração por uma profissional que não é só competente, mas também humana. Obrigada, Mariangela, por me oferecer a oportunidade do aprimoramento técnico e por me incentivar a seguir nos caminhos da pesquisa.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina, por oferecer um curso de alto nível e ao Departamento de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, por contribuir para aumentar meus conhecimentos científicos. Agradeço, em especial, à Professora Leda e à amiga Sueli, pela atenção dedicada a cada aluno.

Agradeço à CAPES-CNPq, pela bolsa de mestrado concedida, à Embrapa/CNPSO, por possibilitar a realização deste trabalho e aos funcionários e amigos da Embrapa-soja, pela colaboração e apoio recebido.

Agradeço a todos os professores que participaram da minha formação, em especial à professora Berenice, que me incentivou a conciliar a ciência com a didática, caminho que pretendo seguir, ao professor Galdino, por participar da minha banca de qualificação, à professora Olivia, por dedicar parte do seu tempo na correção da minha Tese e, também, à Dra. e amiga Diva, que sempre contribuiu para a formação daqueles que buscam conhecer o mundo dos microssimbiontes.

A todos os meus colegas de laboratório, que acabaram por tornar-se meus amigos, dedico este trabalho com todo o carinho. Nenhuma palavra pode resumir a minha gratidão. Divido esta vitória com meus amigos: Ligia, que sempre me amparou nas dúvidas e, com muita paciência, aturou minhas trapalhadas; “Mag”, com quem descobri tantas afinidades e que me mostrou outras formas de encarar a vida; Marisa, obrigada por acreditar em mim todas às vezes que me senti desestimulada; Bia, pelos socorros diante desta máquina imprevisível que é o computador; Carlinha, por tantas extrações realizadas; Luciano, por socorrer minhas “filhinhas” na casa de vegetação; Fábio, a quem dedico todas as minhas análises do Bionumerics, sem ele não sei se teria conseguido; Bel, por todas as referências

encontradas e por me fazer acreditar na beleza do ser humano; Rinaldo, com quem aprendi a fazer minhas primeiras tabelas; Osvaldino, pela prontidão diante das minhas dificuldades; Julinho, por me ajudar a superar tanta ansiedade; Georginho, por sempre simplificar as coisas para mim. Aos demais colegas que, de alguma forma, participaram desse desfecho tão importante: Juninho, Tati, Everson, Mariana e João.

Quero agradecer, também, aos velhos amigos de mestrado, principalmente: Fernanda, Roberta e Flora, que tanto me ajudaram nos momentos de dúvida. Aos novos amigos que adquiri: Fabiano e Liliane, que, em pouco tempo de convivência, participaram da minha vida com tanto carinho.

Quero agradecer aos meus velhos amigos, que longe ou perto, nunca abandonaram meus pensamentos: Elaine, Silvinha, Márcio, Andréia e, em especial, ao meu melhor amigo e, também conhecido como “anjo da guarda”, Rodrigo, a quem dedico todas as minhas grandes decisões e a quem ofereço tudo que tenho de melhor. Este é um grande profissional de quem o mundo científico ainda irá ouvir falar muito.

Não me esqueço das aulas de Flamenco, que aliviaram a pressão do dia a dia e do meu professor Michel, que apesar de não fazer parte desse universo científico, sempre torceu por mim.

Dedico também este trabalho, a minha mãe, Ortencia, pelas orações e noites sem dormir por se preocupar comigo. A minha irmã e segunda mãe, Terezinha, mulher batalhadora em quem me espelho para alcançar o sucesso e ao meu irmão, João, com quem aprendi que, sem o autoconhecimento, é impossível conhecer e admirar outro ser humano. Agradeço também aos meus sobrinhos Betinho, Romeu e meu cunhado Roberto por me proporcionarem tantos momentos de felicidade.

Ao meu pai, Aparecido, ofereço meu diploma de Engenheira Agrônoma, pois foi por ele que segui este caminho. Pai, esteja onde estiver espero que esteja orgulhoso.

Ao Rodrigo Bays, agradeço por todos os dias em que estive ao meu lado, oferecendo carinho e apoio nas horas mais difíceis e, agradeço também, a paciência com que suportou minhas neuroses e inseguranças.

Obrigada por acreditar em mim.

Enfim, agradeço a DEUS por ter conseguido chegar até aqui e a Ele dedico não só o meu trabalho mas, minha vida inteira.

GRANGE, Luciana. **Diversidade de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro (*Phaseolus Vulgaris*) isolado de solos da região nordeste e da região sul do Brasil.** 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado a leguminosa mais importante para a nutrição humana no mundo e, no Brasil, representa de 20 a 28% das proteínas ingeridas pela população. Entretanto, a falta de tecnologia e o cultivo em solos marginais contribuem, decisivamente, para a queda na produtividade da cultura do feijoeiro e, nesse quadro, o fornecimento adequado de nutrientes, particularmente o nitrogênio (N), representa um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos. O processo de fixação biológica do N₂ (FBN), pela associação do feijoeiro com bactérias do gênero *Rhizobium*, pode fornecer N à cultura, porém, os benefícios da inoculação são muitas vezes limitados, devido a características intrínsecas do macro e do microssimbionte e, também, a fatores ambientais. Acredita-se que um dos principais fatores limitantes resida na população elevada de rizóbio nativa dos solos brasileiros, que é muito competitiva, mas pouco eficiente, reduzindo a probabilidade de sucesso da inoculação com estirpes mais eficientes no processo de FBN. Conseqüentemente, para que as respostas à inoculação sejam consistentes é essencial conhecer, num primeiro estágio, a diversidade das populações de rizóbio nas principais regiões produtoras e sua relação com a resposta à inoculação. Com o objetivo de conhecer melhor a diversidade da população de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro no Brasil, bem como de explicar as variações nessa diversidade sob diferentes condições ambientais, este estudo caracterizou 243 isolados provenientes de dois ecossistemas distintos: Pernambuco, com solos alcalinos e clima semi-árido e Paraná, com solos ácidos e clima tropical e subtropical. A diversidade foi avaliada pela determinação da variabilidade genética e simbiótica dos isolados. Para isso, foram avaliados parâmetros genéticos através do uso de métodos de biologia molecular: amplificação do DNA pela reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) com o oligonucleotídeo (“primer”) específico ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus); análise do perfil de DNA pela técnica de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e seqüenciamento, parcial ou total, da região genômica do 16S rDNA. A análise dos resultados obtidos nesses três parâmetros genéticos foi realizada usando o método de agrupamento com o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, arithmetic averages). Através da análise do dendrograma com perfis de DNA obtidos por PCR-ERIC, foi evidente o grau elevado de diversidade genética entre 209 isolados, com 80,8% representando estirpes únicas. Para a investigação das relações filogenéticas das bactérias a nível de espécie, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP com amplificações da região 16S rDNA e cinco enzimas de restrição, *Nde* II, *Rsa* I, *Hinf* I, *Cfo* I e *Msp* I. Novamente constatou-se um grau elevado de polimorfismo, com 36 combinações distintas de perfis e, de 107 estirpes analisadas por essa técnica, 68,2% apresentaram perfis semelhantes à espécie *R. etli*. Para confirmar as relações filogenéticas, as estirpes investigadas foram submetidas à análise do seqüenciamento, parcial ou total, da região correspondente ao 16S rDNA. Foi possível constatar que, das 34 estirpes investigadas por essa técnica, 22 apresentaram alta similaridade com *R. etli* e *R. mongolense* e, algumas estirpes, identificadas como *Rhizobium* sp., apresentaram dissimilaridade elevada em relação às espécies de rizóbio já descritas. Em relação à caracterização simbiótica, das 34 estirpes seqüenciadas, nenhuma foi capaz de

nodular *Leucaena leucocephala*, incluindo aquelas com similaridade genética com *R. tropici*. A instabilidade dos genes de nodulação do rizóbio foi evidenciada em uma porcentagem elevada de estirpe pois, pela reinoculação das bactérias seqüenciadas em feijoeiro, 26,4% perderam a capacidade de nodulação.

Palavras Chave: Rizóbio. Feijão melhoramento genético. Solos inoculação. Nitrogênio fixação.

GRANGE, Luciana. **Diversity of rhizóbio capable of nodular the bean (*Phaseolus vulgaris*) isolated from soils of the northeast and southern Brazil.** 2011. 91 f. Dissertation(Master's degree in Genetics and Molecular Biolgy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is considered the most important legume for human nutrition worldwide and in Brazil represents from 20 to 28% of the proteins consumed by the population. However, poor technology and cropping in low-fertile soils contribute to a decrease in grain yield; adequate supply of nutrients, especially the nitrogen (N) represents a main factor to obtain higher yields. The process of biological nitrogen fixation (BNF), by the association of common bean plants with bacteria belonging to the genus *Rhizobium*, can supply the N necessary to the crop, however, benefits of inoculation are often limited due to intrinsic characteristics of the macro and microsymbiont as well as due to environmental factors. Probably the main limitation relies on a high population of indigenous and competitive rhizobia, decreasing the probability of success of inoculation with more efficient strains. Therefore to find more consistent responses to inoculation, it is important to know at a first stage, the diversity of the rhizobial population in the main producing regions as well as the relationship between this diversity and the response to inoculation. Aiming to know better the diversity of rhizobial population able to nodulate common bean, as well as to explain differences in the diversity due to different environmental conditions, this study characterized 243 isolates from two distinct ecosystems: alkaline soils of Pernambuco with a semi-arid climate, and acid soils of Paraná with tropical and subtropical climate. The diversity was evaluated by the determination of genetic and symbiotic variability. For that the following genetic parameters were evaluated using molecular biology tools: DNA amplification by the PCR (Polymerase Chain Reaction) reaction with the specific primer ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus); analysis of DNA profile by the PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) technique, and total or partial sequencing of the genomic region corresponding to the 16S rDNA. The analysis of the results obtained with these three genetic parameters was realized using the algorithm UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, arithmetic averages). The analysis of the dendrogram obtained with the ERIC-PCR profiles showed a high level of genetic diversity among 209 isolates, with 80.8% representing unique strains. For the investigation of the bacteria phylogeny at the species level the PCR-RFLP was used with amplifications of the 16S rDNA and five restriction enzymes, *NdeII*, *RsaI*, *HinfI*, *CfoI* and *MspI*. Again a high level of polymorphism was verified, with 36 different combinations of profiles and 68.2% out of the 107 strains studied showed similar profiles to *R. etli*. To confirm the phylogenetic relationships 34 strains were submitted to partial or total sequencing of a DNA fragment corresponding to the 16S rRNA region. It was possible to verify that 22 strains showed similarity with *R. etli* and *R. mongolense* and some strains, classified as *Rhizobium* sp. showed high dissimilarity in relation to the described rhizobial species. Em relation to the symbiotic characterization of the 34 sequenced strains, none was able to nodulate *Leucaena leucocephala*, including those showing genetic similarity with *R. tropici*. The instability of the rhizobial nodulation genes of a high percentage of the isolates was shown by the reinoculation of the sequenced strains in common bean plants with 26.4% loosing the capacity of nodulation.

Keywords: Beans breeding. Rhizobium. Soil inoculation.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Procedência, cultura de cobertura e número de isolados obtidos de nódulos de duas cultivares de feijoeiro inoculadas com 14 solos dos Estados de Pernambuco e Paraná..... 52
- Tabela 2** – Perfis de RFLP-PCR obtidos de 107 isolados de 14 solos obtidos dos estados de Pernambuco e Paraná e estirpes representativas das espécies de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro. Os perfis foram obtidos pela amplificação da região correspondente ao 16S rRNA, seguidos pelo corte com cinco enzima de restrição 63
- Tabela 3** – Caracterização *in vitro* (crescimento em meio YMA a 40°C, em meio LB a 28°C e produção de melanina em meio enriquecido com tirosina) e simbiótica *in vivo* (nodulação de *Leucaena leucocephala* e estabilidade genética dos genes de nodulação, avaliada pela reinoculação do feijoeiro). Os dados foram confirmados em três repetições..... 68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Dendrograma genético obtido com os produtos de PCR adquiridos pela amplificação do DNA de 209 isolados dos nódulos de feijoeiro pela técnica do PCR com o oligonucleotídeo ERIC. Agrupamento obtido pelo algoritmo UPGMA e pelo coeficiente de Jaccard..... 55
- Figura 2** – Padrões de restrição do gene que codifica a região 16S rRNA obtidos pela técnica de PCR-RFLP de algumas estirpes de *Rhizobium* após digestão com a enzima *Nde* II..... 60
- Figura 3** – Padrões de restrição do gene que codifica a região 16S rRNA obtidos pela técnica de PCR-RFLP de algumas estirpes de *Rhizobium* após digestão com a enzima *Rsa* I 61
- Figura 4** – Padrões de restrição do gene que codifica a região 16S rRNA obtidos pela técnica de PCR-RFLP de algumas estirpes de *Rhizobium* após digestão com a enzima *Hinf* I 61
- Figura 5** – Padrões de restrição do gene que codifica a região 16S rRNA obtidos pela técnica de PCR-RFLP de algumas estirpes de *Rhizobium* após digestão com a enzima *Cfo* I 62
- Figura 6** – Padrões de restrição do gene que codifica a região 16S rRNA obtidos pela técnica de PCR-RFLP de algumas estirpes de *Rhizobium* após digestão com a enzima *Msp* I 62
- Figura 7** – Dendrograma (UPGMA) mostrando as relações genéticas entre os genes 16S rDNA de 34 isolados de nódulos de feijoeiro e de 22 estirpes de rizóbio e agrobactéria utilizadas como referência. Os números de acesso das estirpes-referências estão listadas nos Resultados 65
- Figura 8** – **Produção de melanina em colônias de rizóbio** 69

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L.)	14
1.2 O PROCESSO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N ₂	17
1.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N ₂ COM A CULTURA DO FEIJOEIRO	19
1.3.1 Principais Fatores que Afetam a Eficiência da FBN pelo Feijoeiro	20
1.3.2 Respostas à Inoculação	24
1.4 O MICROSSIMBIONTE	28
1.4.1 Estrutura Genética do Rizóbio	28
1.4.2 Métodos Empregados em Estudos de Diversidade de Bactérias da Família <i>Rhizobiaceae</i>	30
1.4.3 Alguns Estudos de Diversidade de <i>Rhizobium</i>	33
1.4.4 Situação Taxonômica Atual de Rizóbio Capaz de Nodular o Feijoeiro	34
1.4.5 Distribuição Geográfica Mundial de Rizóbio do Feijoeiro	37
1.4.6 Estudo de Diversidade do Microssimbionte do Feijoeiro no Brasil	38
2 OBJETIVO	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 LOCAL DA PESQUISA	41
3.2 ISOLAMENTO DAS ESTIRPES DE RIZÓBIO	41
3.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DAS ESTIRPES	43
3.3.1 Extração de DNA	43
3.3.2 Amplificação de Dna pela Reação de Pcr (Polymerase Chain Reaction) com o “Primer” Específico ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”)	44
3.3.3 Perfil de RFLP-PCR do Gene que Codifica a Região 16s rRNA (Restriction Fragment Length Polymorphism)	45
3.3.4 seqüenciamento, Total ou Parcial, do Gene que Codifica a Região do 16S rRNA	47
3.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E SIMBIÓTICA DAS ESTIRPES	48
3.4.1 Caracterização Fisiológica	48
3.4.1.1 Crescimento em LB	48

3.4.1.2	Crescimento a 40°C	49
3.4.1.3	Síntese de melanina	49
3.4.2	Avaliação Simbiótica.....	49
3.4.2.1	Capacidade de nodular <i>leucaena leucocephala</i> em casa de vegetação	49
3.4.2.2	Avaliação da estabilidade genética dos genes de nodulação.....	50
4	RESULTADOS	51
4.1	ISOLADOS DE RHIZOBIUM OBTIDOS A PARTIR DE NÓDULOS DE FEIJÃO	51
4.2	ANÁLISE GENÉTICA PELA AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELO ERIC-PCR	53
4.3	ANÁLISE DO PERFIL DE PCR-RFLP DO GENE QUE CODIFICA A REGIÃO 16S RRNA.....	58
4.4	ANÁLISE DO SEQÜENCIAMENTO, TOTAL OU PARCIAL, DO GENE QUE CODIFICA A REGIÃO 16S RRNA	63
4.5	AVALIAÇÃO DOS CARACTERES FISIOLÓGICOS E SIMBIÓTICOS DAS ESTIRPES	66
5	DISCUSSÃO	79
6	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.)

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado uma grande fonte protéica vegetal e, também, de aminoácidos essenciais, tornando-se, assim, a leguminosa mais importante para a nutrição humana (Velasquez, 1988). Participa da alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas na América Latina, no leste e sul da África e representa a única fonte protéica para cerca de 100 milhões de consumidores pobres, cuja dieta é baseada em amido (Mariot, 1989; CIAT, 1990). Originado do continente americano, mais especificamente das regiões entre o México e a Guatemala e na zona dos Andes, foi introduzido aos outros continentes como planta ornamental, após o descobrimento da América (Zimmermann; Teixeira, 1996).

O consumo do feijão apresenta características vantajosas do ponto de vista nutricional. Entre eles, podemos citar, além do conteúdo protéico relativamente elevado, o alto teor de lisina, que exerce efeito complementar às proteínas dos cereais, a fibra alimentar, o alto conteúdo de carboidratos e a presença de vitaminas do complexo B (Lajolo *et al.*, 1996).

O feijão é, em geral, produzido para o auto-consumo e, nos países desenvolvidos, é relativamente pequena sua utilização, devido ao hábito alimentar e à supostamente baixa elasticidade da renda consumo. À medida que prevalecem níveis de renda mais altos, outros alimentos são incorporados à cesta do consumidor. Em consequência, o comércio internacional do feijão é muito pouco expressivo (Teixeira; Rocha, 1988).

No Brasil, o feijão é largamente consumido, participando com 20 a 28 % das proteínas ingeridas, porém, nos últimos 25 anos, ocorreram grandes oscilações no consumo de feijão per capita, ficando a média, neste período, em 17,5 kg/habitante/ano. Em 1970, segundo a CONAB, o consumo equivalia a 20,4 kg/hab./ano, em 1983 chegou a 12,5 kg/hab./ano e, em 1990, aumentou para 14,5 kg/hab./ano. Em 1994, o consumo alcançou 18,6 kg/hab./ano, quantidade esta também prevista para o ano de 1995 (Yokoyama, 1996). O maior consumidor continua sendo a Região Nordeste (20,8 kg/hab./ano) e, no outro extremo, situa-se a Região Sul, com um consumo de apenas 12,9 kg/hab./ano. O consumo nas demais

regiões, em 1992, ficou assim distribuído: Norte: 14,7 kg/hab./ano; Sudeste: 18,2 kg/hab./ano e Centro-Oeste: 13,9 kg/hab./ano (Yokoyama, 1996).

O feijoeiro é cultivado em cerca de 100 países em todo o mundo. Na safra de 1993, 63% da produção mundial de feijão foram obtidos em apenas cinco países: Índia (25,6%), Brasil (15,2%), China (11,8%), Estados Unidos (6,1%) e México (4,3%). Tomando-se como referência a safra deste mesmo ano, as maiores produtividades foram obtidas nos Estados Unidos (1.529 kg/ha) e na China (1.359 kg/ha), enquanto o México (636 kg/ha), Brasil (635 kg/ha) e a Índia (421 kg/ha) apresentam médias inferiores à mundial de 673 kg/ha (Yokoyama, 1996).

O feijoeiro é uma leguminosa bastante difundida em todo o território nacional. É plantado, preferencialmente, como cultura de subsistência, em pequenas propriedades, muito embora tenha havido, nos últimos anos, crescente interesse de produtores de outras classes, em cujo sistema de produção são adotadas tecnologias avançadas. Considerando todos os gêneros e espécies de feijão englobados na estatísticas da FAO, de 1993, o Brasil foi considerado o segundo maior produtor de feijão do mundo, perdendo apenas para a Índia (Yokoyama *et al.*, 1996).

Entre os anos de 1990-1994, a área plantada com a cultura do feijoeiro cresceu 3%, passando de 3,4 para 3,5 milhões de hectares. Nesse mesmo período, a produção apresentou um aumento de maior magnitude, 35%. Em 1990, o Brasil produziu 1,9 milhões de toneladas e, em 1994, 2,6 milhões de toneladas. Em relação à produtividade, houve um acréscimo de 31%, passando de 559 kg/ha, em 1990, para 732 kg/ha, em 1994, (Yokoyama *et al.*, 1996).

Em nível regional, a produção nacional de feijão do gênero *Phaseolus*, baseando-se em dados da safra de 1994, apresentou os seguintes índices: Região Sul 40,0%, Região Sudeste 29%, Região Nordeste 19,0%, Região Centro- Oeste 7,0% e Região Norte 5,0%. Esses dados foram compilados junto ao IBGE, CONAB/BSB e IPA/PE, segundo Yokoyama *et al.* (1996).

Apesar de todas essas estimativas, a produtividade brasileira de feijão (*Phaseolus*) ainda é relativamente baixa. Considerando a projeção de um consumo *per capita* de 20 kg/hab./ano, seria necessária uma produção de 3,7 milhões de toneladas. Persistindo a produtividade atual, a expansão de área para cultivo deverá atingir 5,9 milhões de hectares, ou seja, 9% superior àquela cultivada em 1994. Considerando a estagnação da área plantada, o aumento na produtividade do feijão deveria ser de 9% (de 616 para 670 kg/hab./ano), equivalendo a uma taxa anual de crescimento de 1,4% (Yokoyama, 1996).

Embora o processo migratório da população rural para as cidades tenha modificado os hábitos de alimentação, a queda no consumo do feijão deu-se basicamente por duas razões: a) perda do poder aquisitivo da população menos favorecida e b) novas alternativas de alimentação mais rápida e rica em proteínas que substituíram o feijão (Yokoyama, 1996). A falta de tecnologia e o cultivo em solos marginais, devido ao baixo retorno econômico da cultura, contribuem, decisivamente, para a queda na produtividade do feijoeiro e, nesse quadro, o fornecimento adequado de nutrientes, particularmente o nitrogênio (N) e o fósforo (P), é um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos no Brasil (Araujo, 1994).

Calcula-se que 40% da área plantada com feijoeiro na América Latina e 60% das áreas no Oriente Médio e África apresentem deficiência de N (CIAT, 1990). Os teores de N nos solos do Brasil, de um modo geral, não são elevados e, com a intensificação da agricultura, as exigências nutricionais de N são cada vez maiores, conseqüentemente, se o N do solo retirado pela planta não for repostado, o teor desse nutriente decrescerá rapidamente. Para a síntese química de fertilizantes nitrogenados existe um custo elevado, resultante principalmente da necessidade de gastos com fonte de petróleo, que também não são renováveis. Calcula-se que, para a síntese de uma tonelada de amônia, sejam necessários seis barris de petróleo. Práticas agrícolas alternativas para diminuir esses custos precisam ser procuradas, principalmente para o Brasil, que importa fertilizantes nitrogenados para satisfazer a demanda interna. Neste contexto, assume grande importância o processo de fixação biológica do nitrogênio que, além de ser uma tecnologia de baixo custo, também contribui para a preservação do solo, rios e lençóis freáticos.

1.2 O PROCESSO DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N₂

O N₂ é abundante na natureza, constituindo quase 80% do gás atmosférico. Mas nenhum animal ou planta é capaz de utilizar o N₂ como uma fonte para proteína, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do N₂, que é uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza. Bactérias da família *Rhizobiaceae* formam estruturas altamente específicas, os nódulos, onde ocorre a conversão do N₂ atmosférico em amônia, que é então incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização por algumas plantas da família *Leguminosae*, como a soja e o feijão.

A inoculação das sementes do feijoeiro com bactérias do gênero *Rhizobium* apresenta-se como uma tecnologia de baixo custo para o fornecimento de nitrogênio às plantas e pode contribuir para reverter o quadro de queda de produção e produtividade do país (Vargas; Hungria, 1997). O fornecimento do N via fixação pode aumentar a produtividade média nacional sem o uso de adubos nitrogenados, além de contribuir para a preservação do solo, para a economia de petróleo e gás natural, que são fontes energéticas não renováveis, e para a menor poluição de rios e lagos, causada pela lixiviação dos fertilizantes (Hungria *et al.*, 1994).

A fixação biológica de N₂ (FBN) ocorre através de um mecanismo simbiótico entre bactérias especializadas e suas plantas hospedeiras específicas, com formação de estruturas típicas, os nódulos, onde acontece o processo biológico. Essa simbiose é conhecida e explorada comercialmente há mais de 100 anos, sendo a soja e os adubos verdes os exemplos de maior sucesso conhecidos.

A formação de nódulos é um processo complexo, que ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas, tanto na célula hospedeira como na bactéria. As mudanças na bactéria visam, principalmente, o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP e poder redutor necessários para o processo de fixação biológica. As mudanças na planta hospedeira visam, principalmente, assimilar a amônia produzida pelas bactérias (Hungria *et al.*, 1994).

O processo inicia com a excreção, pela planta hospedeira, de compostos de ação quimiostática sobre o rizóbio (Hungria *et al.*, 1997), facilitando a colonização rizosférica e estimulando o crescimento da bactéria (Hungria; Stacey, 1997). A seguir, as bactérias aderem aos pêlos radiculares das plantas, em um processo relativamente estável e irreversível, que ocorre em duas etapas: primeiro, as células isoladas aderem à superfície radicular,

provavelmente a sítios específicos e, a seguir, outras bactérias aderem às que já estão presas aos pêlos radiculares (Hungria *et al.*, 1997). Provavelmente, em um processo simultâneo com a adesão das bactérias, tem início uma troca de sinais moleculares entre o microssimbionte e a planta hospedeira, ativando gene dos dois parceiros. Em uma primeira etapa a planta hospedeira libera sinais que são responsáveis pela indução de transcrição de genes de rizóbio essenciais à nodulação, *nod*, *nol* e *noe*. (Hungria *et al.*, 1997). Na segunda etapa de troca de sinais moleculares, as bactérias, através dos genes de nodulação, produzem sinais específicos para os hospedeiros, induzindo as modificações radiculares que ocorrem no estágio de pré-infecção, como a deformação dos pêlos radiculares, encurvamento dos pêlos, a formação de raízes curtas e grossas, o aumento no número de pêlos radiculares, entre outros (Hungria *et al.*, 1994).

Na etapa seguinte, os rizóbios penetram na raiz, pela extremidade do pêlo radicular, através da invaginação da membrana do plasma, ao redor da qual a planta forma, por deposição de um material semelhante à parede celular, uma estrutura denominada cordão de infecção, na qual as bactérias proliferam. Ao mesmo tempo, as células do córtex externo começam a se dividir, formando o primórdio do nódulo. Os cordões de infecção penetram nas células desses primórdios, em cujo citoplasma as bactérias são liberadas, envoltas em uma membrana e, em seguida, os primórdios diferenciam-se em nódulos e as bactérias diferenciam-se em bacteróides (Hungria *et al.*, 1997). Quando o nódulo está formado, são sintetizadas as enzimas relacionadas com a quebra da tríplice ligação do nitrogênio atmosférico e com a assimilação do nitrogênio fixado, iniciando-se o processo de fixação biológica (Brewin, 1991; Franssen *et al.*, 1992; Kijne, 1992).

1.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N₂ COM A CULTURA DO FEIJOEIRO

Um dos fatores mais limitantes à produtividade do feijoeiro é a baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo fósforo e nitrogênio, nos solos agrícolas. A adição de N na forma de fertilizantes é cara e, em muitos casos, ineficiente, principalmente devido a perdas do elemento causadas por práticas culturais inadequadas

A inoculação, porém, é muitas vezes limitada, devido a características intrínsecas da planta, como a baixa capacidade de FBN de algumas cultivares e alta suscetibilidade a estresses ambientais, ao ataque de pragas e doenças e a características intrínsecas das estirpes do rizóbio, como baixa capacidade competitiva e eficiência no processo de FBN. Como resultado, a avaliação das taxas de FBN em experimentos conduzidos com seis leguminosas em diversos países mostrou que o feijoeiro apresentava menor porcentagem de N proveniente da FBN, sendo esta de apenas 40%. Conseqüentemente, com freqüência se questiona a eficiência desta técnica no cultivo do feijoeiro. Entretanto, já foi constatado que, com a utilização de cultivares e estirpes mais adequadas e condições ambientais favoráveis, o feijoeiro nodulado pode acumular N nos tecidos em quantidades comparáveis às das plantas recebendo N mineral (Hungria *et al.*, 1997), podendo alcançar produtividades de até 2500 kg/ha, em solos com baixo teor de N (Mendes *et al.*, 1994).

Sabe-se que a associação simbiótica *Phaseolus vulgaris-Rhizobium* é muito sensível à presença do N mineral. Foi observado, ainda, que a alta habilidade do feijoeiro em assimilar N mineral prejudica a fixação do N₂ nessa leguminosa (Hungria *et al.*, 1985 a, b). Por outro lado, há relatos sobre os efeitos sinérgicos, em feijoeiro, entre a absorção do N mineral, fornecido em doses baixas, e a fixação do N₂, resultando em melhores produções de sementes. Além disso, a grande variabilidade genética entre cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* no desempenho simbiótico, em presença de N mineral, possibilita seleções genéticas visando um melhor aproveitamento das duas fontes de N disponíveis às plantas (Hungria *et al.*, 1985b).

Para que todo o processo seja bem desenvolvido, do início da infecção até o funcionamento pleno dos nódulos, é necessária a expressão gênica coordenada do microssimbionte e da planta hospedeira (Hungria *et al.*, 1997), portanto, para garantir o sucesso da fixação é importante a escolha adequada dos parceiros simbióticos, ou seja, estirpes de bactérias mais eficientes e competitivas e genótipos de plantas que respondam ao

microssimbionte. Como os gastos energéticos relacionados à FBN são elevados, se a simbiose não for eficiente, a associação pode se tornar parasítica.

1.3.1 Principais Fatores que Afetam a Eficiência da FBN pelo Feijoeiro

Para garantir uma boa produtividade na cultura do feijoeiro utilizando o processo de FBN, é necessário conhecer os principais fatores que podem alterar a eficiência da simbiose. Tanto na planta, quanto na bactéria existem mecanismos que podem prejudicar o sucesso da fixação pelo feijoeiro.

Na planta hospedeira, vários fatores genéticos estão envolvidos na formação dos nódulos e no mecanismo da fixação, principalmente relacionados à variabilidade dos genótipos. Por ser uma planta C_3 , caracterizada pela fotorrespiração elevada e baixa taxa fotossintética líquida, a importância do hospedeiro é atribuída, quase sempre, a sua capacidade fotossintética. A partir daí, inúmeros trabalhos foram conduzidos, em que a manipulação dos fotossintatos enviados para os nódulos afetava imediatamente a FBN (Hungria; Neves, 1986a). No feijoeiro, por exemplo, o sombreamento (Hungria *et al.*, 1985c), a remoção de folhas, a retirada das flores e os hormônios vegetais (Hungria; Neves, 1986a) diminuíram a quantidade de N_2 fixado.

Foi constatado que as cultivares de feijoeiro de crescimento indeterminado apresentavam taxas mais elevadas de FBN do que as rasteiras, pois mantinham maior proporção de carboidratos nas formas solúveis, que seriam mais prontamente utilizadas pelos nódulos. Por ser uma cultivar mais tardia, o feijoeiro de crescimento indeterminado apresenta um período maior de fornecimento de carboidratos para o funcionamento dos nódulos (Graham; Rosas, 1977).

Trabalhos conduzidos no exterior (Graham; Rosas, 1977) e no Brasil (Hungria; Neves, 1987a, Vargas *et al.*, 1991) demonstraram que existe grande variabilidade entre cultivares de feijoeiro na capacidade de fixar N_2 e na habilidade de translocar o N_2 fixado, refletindo em diferenças na nodulação, produção de massa vegetal e de grãos e no N total acumulado nos tecidos. Como exemplo, pode-se mencionar que a cultivar Rio Tibagi foi considerada pouco responsiva à FBN em diversos trabalhos (Nicoloso; Santos, 1990), enquanto a cultivar Carioca tem-se caracterizado pelas altas taxas de FBN (Costa *et al.*, 1989). Devido à variabilidade encontrada entre genótipos de feijoeiro quanto a eficiência do processo

de FBN, tem sido enfatizada a importância do melhoramento genético da planta para otimizar o fornecimento de N via fixação biológica.

Em relação às bactérias, desde os primeiros estudos conduzidos sobre a FBN já se procedia à seleção das melhores estirpes para cada hospedeiro, nas condições ambientais desejadas, com atenção particular à capacidade competitiva e à eficiência na conversão do N₂ a amônia (Yokoyama, 1996). Diversos trabalhos constataram diferenças relevantes entre estirpes de rizóbio do feijoeiro quanto à habilidade de fixar N₂, que resultavam em maior número e massa nodular, N acumulado nos tecidos e produtividade (Hungria; Ruschel, 1987; Vargas *et al.*, 1994). Alguns fatores associados com a maior eficiência de FBN foram a maior atividade da nitrogenase (redução de N₂ H₂) (Saito, 1978; Cassini, 1980), a menor perda de elétrons pela evolução do H₂ (Hungria; Ruschel, 1989) e o maior transporte do N proveniente da fixação sob a forma de ureídeos (Hungria; Neves, 1987a,b).

Além da grande variabilidade genética que ocorre com as bactérias fixadoras, a competitividade é um fator crucial na seleção das melhores estirpes. A falta de resposta das leguminosas à inoculação com estirpes mais eficientes resulta, quase sempre, da constatação de que as estirpes naturalizadas são abundantes, ineficientes e, dificilmente, deslocadas pelos métodos tradicionais de inoculação (Brockwell *et al.*, 1988). A ineficiência da inoculação é atribuída à presença de número elevado de células do rizóbio nativo (Graham, 1981; Thies *et al.*, 1991a). Outros fatores da bactéria estariam envolvidos na maior capacidade competitiva, como maior mobilidade no solo, capacidade quimiostática em direção aos exsudatos da planta, taxa de crescimento em substratos de solo, a presença de determinados polissacarídeos de superfície celular, a produção de toxinas, a velocidade de infecção das raízes, entre outros. A competitividade da bactéria é influenciada pelos fatores abióticos do solo, que podem afetar tanto a população indígena do solo como as condições para o estabelecimento de novas estirpes. Tem sido atribuída, à acidez do solo, um papel relevante na competitividade, havendo algumas evidências de que a dominância das espécies em determinados solos esteja relacionada ao seu pH (Hungria *et al.*, 1997). Um bom exemplo para este caso foi quando Vargas; Graham (1989) descobriram que a estirpe tolerante à acidez *R. tropici* CIAT 899 era mais competitiva para formar nódulos em solos ácidos. Outros estudos vêm sendo conduzidos sobre a distribuição de espécies de rizóbio em solos com diferentes níveis de acidez. No Brasil, por exemplo, 98% da população em um solo com pH 4,8 foi constituída de *R. tropici*, decrescendo para 80% quando o pH foi aumentado, por calagem, para 5,5 (Hungria *et al.*, 1997).

Diversos estudos têm demonstrado que plantas em simbiose são mais suscetíveis aos fatores ambientais do que as plantas recebendo N mineral. Isso ocorre porque estão envolvidas as suscetibilidades da planta, do rizóbio e da simbiose. Existem, ainda, plantas hospedeiras, como o feijoeiro, mais sensíveis a estresses hídricos e térmicos, salinidade, deficiências nutricionais, etc.

A temperatura tornou-se um dos principais fatores limitantes ao processo da FBN nos solos tropicais, onde as médias podem ser superiores a 40°C nas camadas mais superficiais, podendo atingir até 60°C (Denmet, 1984). Para o feijoeiro nodulado, os limites de tolerância térmica se situam entre 28°C e 33°C (Hungria; Franco, 1993). Foi constatada uma correlação negativa e altamente significativa entre a temperatura na rizosfera do feijoeiro nodulado e o N acumulado na parte aérea, com uma queda drástica nas taxas de fixação em temperaturas superiores a 31°C (Hungria *et al.*, 1985c). Contudo, verificaram-se diferenças entre estirpes que nodulam o feijoeiro quanto à tolerância ao estresse térmico, tendo sido observado que o microssimbionte parece ser mais tolerante do que o hospedeiro (Hungria *et al.*, 1993).

As temperaturas elevadas afetam diversas etapas da simbiose: com relação às propriedades genéticas do rizóbio, altas temperaturas podem favorecer os eventos de recombinação e/ou deleção plasmidial, algumas estirpes que nodulam o feijoeiro são muito sensíveis, ocorrendo facilmente deleções de plasmídios e rearranjos genômicos (Martínez-Romero *et al.*, 1991). A sobrevivência e o estabelecimento de diversas estirpes de *Rhizobium/Bradyrhizobium* no solo também são afetadas pelo estresse térmico, incluindo rizóbio do feijoeiro, o que pode afetar a competitividade (Hungria *et al.*, 1997). O processo de infecção das raízes do feijoeiro é extremamente sensível e, provavelmente, o mais afetado por temperaturas elevadas (Hungria; Franco, 1993). A inibição inicia com o decréscimo na exsudação de sinais moleculares pelo feijoeiro, em resposta, ocorre um decréscimo na produção de oligossacarídeos lipoquitínicos (LCOs) sintetizados pelo rizóbio e esta queda na síntese dos LCOs provavelmente explica relatos de estudos pioneiros sobre o efeito das temperaturas elevadas na formação dos pêlos radiculares, afetando, indiretamente, a aderência das bactérias às raízes (Hungria *et al.*, 1997).

Efeitos acentuados também são observados quando feijoeiros bem nodulados são submetidos a estresses térmicos. Como exemplo, apenas dois choques térmicos de 40°C/8h/dia, no florescimento, afetaram drasticamente o funcionamento e aceleraram o

processo de senescência dos nódulos e a recuperação só ocorreu após sete dias, pela formação de novos nódulos (Hungria; Franco, 1993).

Além do estresse térmico, a deficiência hídrica é outro fator que pode afetar o mecanismo simbiótico no feijoeiro. O estresse hídrico afeta os estágios de infecção das raízes, através da ausência de pêlos radiculares normais e diversas outras etapas da formação e desenvolvimento dos nódulos (Saito *et al.*, 1984). Se os nódulos já estiverem formados, ocorre um decréscimo nas taxas de FBN, que é irreversível se a perda de água exceder a 20% do peso fresco máximo (Sprent, 1984). Com a reidratação, tem início um processo de recuperação da FBN e, de modo similar ao observado com choques térmicos (Hungria; Franco, 1993), a planta responde com a produção de novos nódulos, podendo superar a massa nodular das plantas não estressadas (Peña-Cabriales; Castellano, 1993). Mas, se a deficiência hídrica persistir, a senescência dos nódulos é acelerada (Sutton, 1983). Como exemplo, em um experimento conduzido na Guatemala, as taxas de FBN encontradas durante o ciclo das águas, de 107 kg de N/ha, representando 71% do N total das plantas, caíram, na época mais seca, para 28 kg de N/ha, representando 38% do N das plantas. Em outro experimento, conduzido em Goiânia, as taxas de FBN foram muito baixas, de 11 a 12 kg de N/ha, representando no máximo 25% do N total das plantas, sendo levantada a hipótese de que isso ocorreu devido às condições de seca e temperaturas elevadas (Hardarson *et al.*, 1993).

Outras condições que limitam uma fixação satisfatória na cultura do feijoeiro são a acidez do solo, a toxicidade por Al e Mn e a deficiência de Ca, Mg, P e Mo. Os solos da maioria das áreas produtoras de feijão da América Latina são caracterizados pela acidez elevada e o quadro característico resultante, com toxicidade por certos elementos e deficiência de diversos nutrientes, pode ser um fator crítico ao desempenho simbiótico das leguminosas (Munns; Franco, 1982). Como o processo de FBN resulta em excreção de H^+ , os problemas relacionados à acidez podem ser agravados na rizosfera das leguminosas noduladas. Além de prejudicar o crescimento da planta, a acidez afeta o rizóbio em termos de sobrevivência, de taxa de crescimento, de morfologia, de perda de infectividade e da eficiência simbiótica (Jardim Freire; Vidor, 1971).

Desde os primeiros estudos de FBN, o feijoeiro era considerado bastante sensível ao Al, apresentando sintomas de toxicidade já a partir de 3 mg/kg (Ruschel *et al.*, 1968), porém, poucos estudos vêm sendo conduzidos em solos em relação ao Mn, embora Döbereiner (1966) tenha relatado que apenas 25 mg de Mn/kg e 200 mg de Mn/kg de folhas tenham reduzido, consideravelmente, a nodulação. Na mesma época, Franco; Döbereiner

(1967, 1968) concluíram que os efeitos do Ca e do Mg na planta, no rizóbio e na simbiose também são extremamente importantes.

Outros três elementos do solo que também exercem influência sobre o mecanismo simbiótico no feijão são o fósforo (P), o molibdênio (Mo) e o N mineral. Deficiências de P são, frequentemente, relatadas nas áreas produtoras de feijão na América Latina e a simbiose com o feijoeiro é muito sensível à deficiência desse nutriente, que afeta não só a sobrevivência do rizóbio, mas também, todos os estágios de formação dos nódulos e a atividade das enzimas relacionadas com a FBN e assimilação de N₂ fixado (Graham, 1981).

Embora venha sendo postulado que as altas exigências dessa leguminosa resultem de seleção sob altas adubações fosfatadas, em uma análise de tipos selvagens e genótipos cultivados foi constatada maior tolerância ao baixo P pelos genótipos cultivados (Araújo *et al.*, 1995). Para o Mo, tem sido cada vez mais freqüente o relato de deficiência desse micronutriente em solos que vêm sendo cultivados intensivamente. Nos nódulos, o nível crítico de Mo foi determinado em 3,66 µg de Mo/g de nódulos secos (Jacob-Neto; Franco, 1989), mas os nódulos amostrados em diversas regiões do Brasil apresentaram concentrações abaixo desse nível crítico (Jacob-Neto; Franco, 1995). O Mo é importante para a FBN, pois é um componente da enzima nitrogenase e se encontra pouco disponível em solos ácidos. Já o N mineral exerce efeitos inibitórios em diversas etapas do processo simbiótico (Hungria *et al.*, 1997). As teorias mais recentes para explicar os efeitos inibitórios do N na FBN envolvem as taxas de difusão de O₂ para a zona infectada dos nódulos. A barreira de difusão de O₂ é variável e muda com as condições ambientais e fisiológicas da planta, incluindo a exposição das leguminosas ao nitrato (Minchin *et al.*, 1986), pois este pode alterar a resistência da barreira de difusão ao O₂ no córtex dos nódulos, diminuindo a energia necessária aos processos metabólicos (Vessey; Waterer, 1992). Graham (1981) e Vieira *et al.* (1995) observaram que a menor dose, aplicada depois da emergência das plantas, resultou em incrementos na produtividade, enquanto a dose mais elevada, por via foliar ou no solo, inibiu a nodulação e não aumentou, significativamente, a produtividade.

1.3.2 Respostas à Inoculação

Há relatos que demonstram que o feijoeiro apresenta uma nodulação mais fraca em condições de campo, mostrando-se também pouco responsivo à nodulação com

rizóbios selecionados (Vargas *et al.*, 1991). Contudo, há diversos experimentos, conduzidos a campo, onde as respostas à inoculação são positivas (Ferraz, 1982; Costa *et al.*, 1989; Vargas *et al.*, 1990, 1991, 1994; Mendes *et al.*, 1994; Peres *et al.*, 1994).

Nos experimentos de inoculação em solos virgens da região dos Cerrados, são encontradas duas situações. Na primeira, em áreas de várzea, o problema da competitividade é eliminado, pois as condições de inundação, antes da drenagem, criam um ambiente desfavorável ao rizóbio e, conseqüentemente, a nodulação espontânea nessas áreas é extremamente baixa (Vargas *et al.*, 1994). Como resultado, tem-se uma resposta positiva à inoculação e, em experimento conduzido com duas cultivares de feijoeiro e 17 estirpes de rizóbio, os ganhos obtidos pela inoculação da cultivar CNF-178 superaram os ganhos obtidos pelos tratamentos não inoculados, sem e com N mineral (100 kg/ha), em até 1.776 e 535 kg/ha, respectivamente (Mendes *et al.*, 1994).

Nas áreas virgens onde o feijoeiro é introduzido para o cultivo em sequeiro a população nativa é elevada, portanto, a competitividade reduz a resposta à inoculação. Como exemplo, em três experimentos de campo, conduzidos, em 1997, em áreas dos Cerrados, pela comparação com quatro cultivares de feijoeiro e três combinações de estirpes, foram constatados ganhos de produtividade, pela inoculação do feijoeiro, de até 469 kg/ha (cultivar Negro Argel, em 1986) e 489 kg/ha (cultivar Carioca) em relação às plantas não inoculadas. Em dez das doze avaliações, porém, esses ganhos foram inferiores aos obtidos pela adubação nitrogenada, em níveis que variam de 70 a 100 kg de N/ha. O grande potencial de cultivares responsivas à inoculação, porém, fica evidente pelo experimento com a cultivar Negro Argel, em 1986, onde o rendimento do tratamento inoculado superou o da testemunha nitrogenada em 340 kg/ha (Peres *et al.*, 1994).

Nas áreas previamente inoculadas e cultivadas com o feijoeiro, além da população nativa, existe a população naturalizada, dificultando a resposta à inoculação. Mesmo assim, nesses solos, caracterizados pelos baixos teores de N, a inoculação, suplementada com N mineral, incrementou a produção de grãos (Vargas *et al.*, 1997).

Em três experimentos (realizados consecutivamente nos anos de 1985, 1986 e 1987) conduzidos em solos de cerrados sob condições de sequeiro, avaliou-se a resposta de sete cultivares de feijão (Carioca, Rio Tibagi, CNPAF-178, Negro Argel, CNF-10, CNF-2234 e Capixaba Precoce) à inoculação e à adubação nitrogenada. A ocorrência de nódulos aos 12 D.A.E. (Dia Após Emergência) nas plantas do tratamento testemunha demonstra a presença de estirpes nativas de rizóbio nas áreas experimentais. O número de nódulos por planta foi significativamente maior no tratamento com inoculação do que nos tratamentos testemunha e

com nitrogênio, na avaliação aos 12 dias. Todas as cultivares apresentaram, em média, mais de vinte nódulos por planta, na fase inicial do ciclo. A precocidade de nodulação tem sido considerada de grande importância para o feijoeiro (Vargas *et al.*, 1994), devido ao seu ciclo curto.

Na avaliação de nodulação realizada aos 37 D.A.E., o número e peso de nódulos do tratamento inoculado foram maiores do que os do tratamento testemunha, mas as diferenças só foram significativas, a 5% de probabilidade, para as cultivares Carioca (em 1985, número e peso de nódulos), Rio Tibagi (1986, número de nódulos), CNPAF-178 (1985, peso de nódulos) e Negro Argel (1986 e 1987, número e peso de nódulos). A nodulação, avaliada nesse estágio do ciclo, no experimento de 1986, foi muito baixa, devido à ausência dos nódulos ocorrida em função da deficiência hídrica causada por vernico, dos 13 aos 42 D.A.E. das plantas. Nos experimentos de 1985 e 1987, verificou-se que a cultivar Rio Tibagi, em média, foi inferior às demais, enquanto houve destaque para a Carioca, Negro Argel e CNF-2234, que apresentaram um maior número e peso de nódulos (Vargas *et al.*, 1994). A produção do tratamento inoculado, no entanto, foi consistentemente superior à do tratamento testemunha, com uma diferença média de 197 kg/ha. A única exceção foi a cultivar Rio Tibagi no experimento de 1985. Em diversos casos a produção com nitrogênio foi estatisticamente superior ao tratamento testemunha e em apenas um caso (Capixaba Precoce, em 1987), este tratamento foi estatisticamente superior ao tratamento inoculado. Mesmo a cultivar Tibagi, que apresentou os menores valores de nodulação, obteve ganhos de produção com a inoculação, fato também observado por Duque *et al.* (1985), indicando que mesmo em condições de pouca nodulação, estirpes eficientes são capazes de contribuir de forma expressiva para o rendimento de grãos do feijoeiro. Os ganhos médios de produção obtidos nos três experimentos com a inoculação, para as cultivares Carioca, Rio Tibagi, CNPAF-178, Negro Argel, CNF-10, CNF-2234 e Capixaba Precoce, foram de: 90, 163, 174, 291, 63, 135 e 193 kg/ha, respectivamente (Vargas *et al.*, 1994). As respostas diferenciadas, em termos de ganho de produção com a inoculação, demonstraram a variabilidade no potencial de fixação do nitrogênio entre as diferentes cultivares de feijão, conforme verificado em outros trabalhos (Duque *et al.*, 1985; Hungria; Neves, 1986b, 1987a).

O sucesso no uso da inoculação com rizóbios, como principal fonte de nitrogênio para as plantas leguminosa, deve considerar tanto a eficiência dessas bactérias como o potencial simbiótico dos cultivares. Um experimento realizado em condições de campo no município de Linhares, estado do Espírito Santo, testou o efeito da inoculação, com a suplementação de N mineral, em catorze cultivares de feijão. Não houve diferenças

significativas entre os cultivares, mas a inoculação com *Rhizobium*, com ou sem N mineral, aumentou significativamente seu rendimento de grãos. Todas as plantas de feijoeiro apresentaram nodulação, independente da inoculação com *Rhizobium* (Vargas *et al.*, 1991).

Em outro experimento conduzido a campo, no município de Viena, estado do Espírito Santo, foi feita uma avaliação de quatro formas de inoculação: mistura de sementes com água, com solução de sacarose, com solução de goma arábica e peletização das sementes. Houve efeito da inoculação das sementes no número e tamanho dos nódulos e no rendimento de grãos com relação à testemunha. Não houve diferenças entre os métodos de inoculação, exceto no tamanho dos nódulos, possibilitando um aumento significativo no rendimento de grãos. A utilização de água isoladamente, aplicada junto do inoculante, apresentou a maior quantidade de nódulos pequenos (Vargas *et al.*, 1990).

No processo de fixação de N₂, a enzima nitrogenase, além de reduzir o N₂ a amônia, também reduz os prótons de hidrogênio a H₂, com um custo energético para a simbiose de, no mínimo, 25% do total translocado à enzima. Algumas estirpes porém, possuem uma segunda enzima, a hidrogenase, capaz de reciclar parte desta energia (Hungria *et al.*, 1997). É importante, portanto, encontrar simbioses mais eficientes no processo de reciclagem do hidrogênio. Em um experimento, conduzido sob condições de casa de vegetação, no CENA, Piracicaba, São Paulo, procurou-se estudar o efeito da cultivar de feijoeiro e da estirpe de *Rhizobium* na atividade da nitrogenase, avaliada pelo método de redução do acetileno, e na evolução do H₂ pelos nódulos. Utilizaram-se duas cultivares de feijão (Carioca e Venezuela-350) inoculadas isoladamente, com três estirpes de *Rhizobium* (CO5, C-88 e C-29). Houve efeito da cultivar de feijoeiro, da estirpe de *Rhizobium* e da interação entre ambos na atividade e na eficiência relativa da nitrogenase e no N total acumulado pelas plantas. A eficiência dos nódulos das plantas inoculadas com a estirpe C-88 foi de 1494 mg N.g⁻¹ de nódulo, bastante superior à eficiência dos nódulos formados pela estirpe C-29, de 948 mg N.g⁻¹ de nódulo. A cultivar Carioca mostrou-se o melhor hospedeiro e a melhor combinação simbiótica foi Carioca x C-88, que apresentou, entre 25 e 35 DAE (dias após emergência), taxa de assimilação de 12,47 mg N.g⁻¹ de nódulo.dia⁻¹ (Hungria; Rushel, 1987).

Os resultados obtidos evidenciaram a importância da continuidade dos trabalhos de seleção de estirpes com maior eficiência fixadora de nitrogênio e enfatizam a importância da avaliação de resposta das diferentes cultivares de feijão à inoculação e adubação nitrogenada, antes do seu lançamento para utilização pelos agricultores.

1.4 O MICROSSIMBIONTE

O agrupamento dos rizóbios foi, inicialmente, baseado em características fenotípicas, principalmente na habilidade de nodular algumas leguminosas, dando origem ao conceito de “grupos de inoculação cruzada”. Esse conceito resulta do princípio de que a infecção das plantas pelo rizóbio apresenta certa especificidade, como por exemplo, *R. leguminosarum* bv. trifolii nodula os trevos (*Trifolium* spp.), *R. leguminosarum* bv. viceae nodula ervilha, ervilhaca e fava (*Pisum sativum*, *Vicia sativa* e *V. faba*) e *R. leguminosarum* bv. phaseoli o feijoeiro (Hungria *et al.*, 1997). Contudo, freqüentemente era relatada a promiscuidade das estirpes de rizóbio em relação à nodulação com diferentes hospedeiros. Jordan (1984), considerando características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas, reclassificou algumas espécies de rizóbio e separou as que apresentavam crescimento lento em meio de cultura específico em um novo gênero, *Bradyrhizobium* (“bradus”, grego, lento), diferindo assim, das de crescimento rápido, denominadas de *Rhizobium*. Posteriormente, quatro novos gêneros foram incluídos: *Sinorhizobium* (rizóbio de soja de crescimento rápido) (Chen *et al.*, 1998), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Mesorhizobium* (Lindström *et al.*, 1995) e *Allorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1998).

1.4.1 Estrutura Genética do Rizóbio

Até os anos 70, os estudos de genética molecular de rizóbio eram praticamente inexplorados. A mudança começou após a observação de que ferramentas disponíveis aos estudos com *Escherichia coli* poderiam ser aplicadas à rizóbio, levando à identificação dos genes *nif*, bem como a sua localização aproximada no cromossomo. Hoje, estão descritos diversos genes, que são classificados em três categorias: genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*), responsáveis pelos passos iniciais da nodulação; genes *nif* (nitrogen fixation), ligados à síntese e regulação da nitrogenase, todos homólogos a genes encontrados em *Klebsiella pneumoniae* e os genes *fix*, com a mesma função dos *nif*, mas sem homologia com os genes de *K. pneumoniae*. Existem, ainda, outras categorias de genes, envolvidos com a superfície das bactérias e que alteram a nodulação, *exo* (exopolysaccharides), *lps* (lipopolysaccharides) e *ndv* (1,2- β -glucans, nodule development), além dos genes *hem*

(heme), relacionados com síntese de hemoglobina, *dct* (dicarboxylic transport), *gln* (glutamine synthetase) e *hup* (hydrogenase uptake). Existem, hoje, muitos métodos disponíveis para a caracterização do DNA. Martínez-Romero *et al.* (1990) dividiu esses métodos em três classes funcionais: perda de função, ganho de função ou inibição específica. Com essas técnicas, grandes progressos têm sido conseguidos na detecção de novos genes.

Em estirpes de bactérias do gênero *Rhizobium*, o genoma é constituído de um cromossomo e plasmídios de alto peso molecular (Noel *et al.*, 1984). As estirpes normalmente apresentam de um a seis plasmídios, que podem representar até 25% do DNA total. Os genes estruturais da nitrogenase e os genes determinantes de várias etapas da nodulação estão em um único plasmídio, chamado de plasmídio simbiótico (*pSym*) (Martínez-Romero *et al.*, 1990) e os demais são plasmídios crípticos. Algumas funções já foram demonstradas para esses plasmídios crípticos, como a capacidade de sobrevivência no solo (Amaral *et al.*, 1995), a biossíntese de polissacarídeos da superfície celular, processos metabólicos e utilização de exsudatos da planta e compostos aromáticos, bem como a nodulação e capacidade competitiva (Brom *et al.*, 1992). Já nas estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, as informações, de modo geral, estão encerradas somente no DNA cromossomal (Noti *et al.*, 1985), embora algumas estirpes de *B. japonicum* provavelmente possam ter megaplasmídios (Martínez-Romero, 1994).

Uma característica importante do genoma de *Rhizobium* é a presença de seqüências reiteradas de DNA. Essas reinterações foram detectadas, inicialmente, na espécie *R. phaseoli*, em três regiões do *pSym* que apresentavam homologia com os genes estruturais da nitrogenase. Duas dessas regiões reiteradas continham o operon *nifHDK* completo e a terceira somente o gene *nifH* (Quinto *et al.*, 1985; Martínez *et al.*, 1985; Romero *et al.*, 1988). Posteriormente foi detectada reiteração dos genes *nodD* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993) e, num mapa físico completo do *pSym* de *R. etli* CNF42, com aproximadamente 390 kb, foram encontrados cerca de 700 elementos reiterados pertencentes a 200 famílias (Hungria *et al.*, 1997). Essas cópias são normalmente necessárias para a expressão e efetividade do processo de FBN (Romero *et al.*, 1988), mas também representam sítios de recombinação, onde ocorrem rearranjos genômicos. Como consequência da recombinação, são detectadas amplificações, deleções e co-integrações de plasmídios (Hungria *et al.*, 1997). Esses rearranjos significam a base da variabilidade e, também, das perdas das propriedades simbióticas nessas estirpes (Martínez *et al.*, 1990, Martínez-Romero, 1994), passando a ser a explicação para a ocorrência freqüente da perda da habilidade de nodular e fixar N₂ de diversas estirpes.

Nos últimos anos, porém, a visão negativa em relação às interações dos genes rizobianos está sendo modificada, pois foram detectadas algumas vantagens decorrentes da dinamicidade do genoma. Como resultado da amplificação, que ocorre com frequência no genoma de *R. etli* (Romero *et al.*, 1991, 1995), podem resultar bactérias mais adaptadas a alterações do meio, como disponibilidade de nutrientes e alguns rearranjos podem promover, inclusive, incrementos nas taxas de FBN (Romero *et al.*, 1991, 1995). Contudo, pelas estimativas das frequências de rearranjos, *R. tropici* parece ser cem vezes mais estável do que *R. etli* e, ao considerar as perdas de plasmídios, a estabilidade do *R. tropici* pode ser pelo menos mil vezes superior à de *R. etli*. Conseqüentemente, foi decidido, na “VI Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*” (RELARE), realizada em 1994, que somente a espécie *R. tropici* deveria ser recomendada em inoculantes comerciais brasileiros (Hungria; Araujo, 1995).

1.4.2 Métodos Empregados em Estudos de Diversidade de Bactérias da Família *Rhizobiaceae*

Os microrganismos representam uma fonte de recursos naturais de fácil manipulação em laboratório e podem ser, igualmente, estudados em seus ambientes naturais. São parte importante do ecossistema, pois têm papel crucial na transformação de energia e em processos biogeoquímicos. Com isso, estudos que permitam o isolamento, a identificação e a quantificação desses organismos nos vários habitats são de grande valor (Fungaro; Vieira, 1998).

Para a identificação de bactérias, têm sido citados métodos que utilizam anticorpos policlonais e, mais recentemente, os monoclonais e ambos podem ser adaptados ao método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Hungria *et al.*, 1997). Há relatos, também, sobre análises com polimorfismo isoenzímico com eletroforese (Eardly *et al.*, 1990); perfil de plasmídios (Chan *et al.*, 1988) e hibridização do DNA (Saano; Lindström, 1990).

Uma das técnicas mais utilizadas na detecção e identificação de microrganismos em ambientes naturais e que ganhou grande impulso nos últimos anos é a PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica, que foi descrita por Saiki *et al.* (1985), permite amplificar segmentos pequenos e específicos do DNA. É uma técnica pela qual se obtêm, *in vitro*, várias cópias de um segmento de DNA, previamente conhecido. Para se fazer a amplificação de uma certa seqüência de DNA, é necessário que se faça, em primeiro lugar, a

extração do DNA, depois sua amplificação (PCR) com algum “primer” (oligonucleotídeo), que é feita em um termociclador (Fungaro; Vieira, 1998). A eletroforese do produto da amplificação foi realizada em gel de agarose.

A interpretação dos géis de eletroforese de PCR depende dos propósitos pelos quais se utiliza a técnica, por exemplo, em genética, a PCR pode ser utilizada para identificar e quantificar a variabilidade genética. Esta técnica oferece vantagens por ser rápida e versátil, possibilitando que um grande número de isolados possa ser caracterizado em pouco tempo (Yamaoka-Yano; Valarini, 1998; Fungaro; Vieira, 1998).

Outras variações e combinações de métodos com a PCR têm sido utilizadas para a classificação das bactérias, como a PCR com oligonucleotídeos arbitrários (AP-PCR, Arbitrarily Primed – PCR) (Welsh; McClelland, 1990) e a análise por RFLP dos genes 16S rRNA amplificados por PCR (Laguerre *et al.*, 1994).

Desde o início deste século, geneticistas têm utilizado recursos poderosos em estudos de biologia de populações e ecologia do comportamento, em especial os marcadores genéticos, para conhecer a estrutura dessas populações.

O RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é um dos marcadores moleculares derivados da técnica de PCR, que gera fragmentos únicos de DNA com um único oligonucleotídeo de seqüência arbitrária (Williams *et al.*, 1990).

Esta técnica é uma das mais populares variações da PCR, pois apresenta vantagens em relação aos outros métodos, porque requer pequena quantidade de DNA, não necessitando ter informações sobre a seqüência de nucleotídeos do genoma. Além disso, é capaz de revelar alto grau de marcas polimórficas e é um método rápido, além de processar grande número de microrganismos ao mesmo tempo (Yamaoka-Yano; Valarini, 1998). Esta técnica tem sido utilizada para caracterização de isolados de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, tanto com culturas puras, quanto com nódulos (de Bruijn, 1992; Harrison *et al.*, 1992; Judd *et al.*, 1993; Loureiro, 1994; Versalovic *et al.*, 1994; Sadowsky; Moawad, 1995).

Pequenas seqüências intergênicas repetidas têm sido encontradas em bactérias entéricas como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (Gilson *et al.*, 1984; Stern *et al.*, 1984; Hulton *et al.*, 1991; Sharples; Loyd, 1990). Estas seqüências possuem repetições centrais invertidas e altamente conservadas e foram divididas em duas classes, REP (Repetitive Extragenic Palindromic) (Stern *et al.*, 1984) e ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (Hulton *et al.*, 1991). Tem sido sugerido que estes elementos repetidos representam seqüências próprias de DNA, que são mantidas e propagadas via conversão gênica (Higgins *et al.*, 1988).

Segundo Versalovic *et al.* (1991), estas seqüências têm sido utilizadas para gerar primers REP e ERIC específicos e com eles modelar o genoma de uma variedade de eubactérias para a presença de seqüências semelhantes de REP e ERIC utilizando, para isto, a técnica de PCR. Com isso, foram encontradas seqüências de REP e ERIC com um significativo grau de homologia às seqüências de REP e ERIC de *E. coli* e *S. typhimurium* e foi observada, também, uma hibridização preferencial do DNA de bactérias Gram-negativas.

A amplificação com os “primers” REP e ERIC-PCR, utilizando o DNA cromossômico de diferentes estirpes de bactérias, é capaz de gerar padrões distintos quando separados por eletroforese. Assim, foi proposto, por Versalovic *et al.* (1991), que o método de PCR utilizando REP e ERIC pode ser útil para gerar distintos perfis de genomas bacterianos.

Com todos os estudos realizados sobre REP e ERIC-PCR, os resultados mostraram que estas seqüências são altamente conservadas em rizóbio, agrobactérias e pseudomonas e que este método pode ser utilizado para distinguir e classificar estirpes estreitamente relacionadas de *Rhizobium* (de Bruijn, 1992).

Outro processo de caracterização que tem fornecido valiosas informações nos estudos de identificação de microrganismos é o perfil eletroforético de proteínas. A eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas totais (PAGE) produz padrões de bandas que podem ser considerados impressões altamente específicas. Esse método diferencia, taxonomicamente, níveis de espécies e subespécies (Yamaoka-Yano; Valarini, 1998).

Uma outra técnica que vem sendo usada na investigação das relações filogenéticas de fungos e bactérias, a nível de subespécie, variedades e formas específicas, é a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Esta técnica utiliza enzimas de restrição para fragmentar o DNA em diferentes comprimentos, evidenciando o polimorfismo no comprimento dos fragmentos obtidos. Para a identificação desse polimorfismo, é necessário que as seqüências de nucleotídeos, nas fitas de DNA dos organismos, sejam distintas (Yamaoka-Yano; Valarini, 1998). Apesar de ser eficiente na identificação de microrganismos, esta técnica possui custo elevado para ser utilizada rotineiramente, por isso, outras técnicas e métodos são mais utilizados.

Para o agrupamento de estirpes de rizóbio, a análise de diversos parâmetros realizada no laboratório da Embrapa-Soja, com várias espécies, mostrou que resultados mais confiáveis são obtidos pela utilização de dois a três métodos. Os métodos que mostraram maior confiabilidade nas análises foram o seqüenciamento, parcial ou total, do gene 16S rDNA, a amplificação do DNA com primers específicos pela PCR, fragmentação do DNA pelas enzimas de restrição através da técnica de RFLP e o perfil de lipolissacarídeos.

Para que a FBN traga benefícios maiores para a cultura do feijoeiro é necessário que se identifique a diversidade das estirpes brasileiras em termos de classe taxonômica através de análises envolvendo parâmetros morfológicos, fisiológicos e genéticos (como os métodos citados anteriormente) e, dentro dessa diversidade, identificar estirpes com maior capacidade de fixação de nitrogênio, maior competitividade e maior estabilidade genética.

1.4.3 Alguns Estudos de Diversidade de *Rhizobium*

A grande diversidade genética de rizóbio pode estar relacionada com a ampla distribuição geográfica dessas bactérias (Laguerre *et al.*, 1993). Esta alta diversidade genética não é apenas uma característica predominante dos simbioses de leguminosas, mas também de simbioses com outras espécies de plantas. As análises da diversidade desses microrganismos têm revelado relacionamentos inesperados entre bactérias aparentemente não relacionadas, além de permitir uma melhor compreensão dos mecanismos que atuam na evolução dos mesmos. De acordo com essa ampla diversidade de estirpes, vários grupos de pesquisa têm se empenhado na descoberta e tentativa de classificar tais microrganismos (Martínez-Romero, 1994).

De acordo com Piñero *et al.* (1988), a grande diversidade, tanto quanto a ampla distribuição geográfica podem ser interpretadas como uma evidência de que *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e outros rizóbios, sejam estirpes antigas e com uma longa história evolutiva. Assim, uma única leguminosa, por exemplo, *Acacia*, soja, ou *Leucena*, pode atrair geneticamente vários simbioses. Portanto, com poucas espécies de leguminosas pode-se ter amostras da grande heterogeneidade bacteriana. *Acacia*, por exemplo, é nodulada por *Bradyrhizobium* spp. (Dupuy; Dreyfus, 1992), *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (Lajudie *et al.*, 1992) e *R. huakuii* (Martínez-Romero, 1994). Já o feijoeiro, é nodulado por uma grande diversidade de rizóbio que não foram completamente descritos e, em adição a *R. tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. giardinii* e *R. gallicum* existem novas linhagens descobertas de noduladores desta planta. van Berkum *et al.* (1994) verificaram a competência simbiótica e a diversidade genética de estirpes de rizóbio em alfafa (*Medicago sativa*) e trevo (*Trifolium alexandrinum*), observando que o *S. meliloti* apresenta uma efetiva variação simbiótica entre as estirpes, mas não entre os simbioses de trevo.

Populações de *S. meliloti* proveniente de diferentes variedades de alfafa e de diferentes solos do Norte da Itália foi testada por Paffetti *et al.* (1996) quanto a sua diversidade genética. Os autores evidenciaram uma considerável diversidade genética entre as linhagens noduladoras das diferentes variedades de alfafa. Esses dados tornaram-se úteis para a investigação da variabilidade genética entre populações intraespecíficas, uma vez que tal característica da população reside em todo o genoma bacteriano.

Com o uso da técnica RAPD (random amplified polymorphic DNA), Young; Cheng (1998), analisaram a diversidade genética de três estirpes de *S. fredii* e três estirpes de *B. japonicum*, verificando que a distribuição geográfica está relacionada a filogenia e a proximidade de parentesco entre as espécies. Outro estudo sobre a distribuição geográfica relacionada a diversidade genotípica e fenotípica de isolados de *Rhizobium* provenientes de grão-de-bico (*Cicer arietium* L.), realizado por Nour *et al.* (1994), demonstrou que havia evidência de alta heterogeneidade entre as estirpes, tornando possível dividí-las e classificá-las em dois grupos, com base na ampla distância filogenética entre as estirpes.

A subdivisão de rizóbio em três gêneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*), foi objeto de estudo de Young e Haukka (1996), quanto à filogenia e diversidade deste grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio. Com base na técnica da análise de pequenas unidades ribossômicas (SSU), verificaram que provavelmente a habilidade de formar nódulos em leguminosas não estava presente no ancestral comum de todos os rizóbios, mas que os genes para nodulação foram transferidos entre bactérias distintas filogeneticamente, de modo que a filogenia dos genes de nodulação provavelmente diferiu em relação a outros genes que essas bactérias carregam.

De acordo com os estudos acima, dentre outros publicados, é possível evidenciar a ampla diversidade genética entre as espécies noduladoras de leguminosas, devido à capacidade de nodulação poder ser transmitida de uma estirpe para outra, além da influência da distribuição geográfica e da promiscuidade das variedades hospedeiras.

1.4.4 Situação Taxonômica Atual de Rizóbio Capaz de Nodular o Feijoeiro

A taxonomia do rizóbio, baseada na inoculação cruzada (especificidade hospedeira), foi sendo substituída pela taxonomia numérica, que se apoia nas características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (Hungria *et al.*, 1997). Bactérias de

crescimento rápido e lento foram, então, separadas nos dois gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* e, posteriormente, mais quatro gêneros, citados anteriormente, foram incluídos.

As bactérias que nodulam o feijoeiro foram classificadas, inicialmente, como *Rhizobium phaseoli*, porém, com uma melhor caracterização fisiológica, bioquímica e genética, essas bactérias foram reclassificadas, após 50 anos, na espécie *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984). Com o estudo de outros isolados e o avanço nas técnicas de biologia molecular, em um curto período de tempo, foi constatado que as bactérias que nodulavam o feijoeiro apresentavam, claramente, características fisiológicas e genéticas distintas, permitindo a sua separação em dois grupos, denominados Tipo I e Tipo II (Martínez *et al.*, 1985; Quinto *et al.*, 1985; Brom *et al.*, 1988).

Essas e outras diferenças levaram, em 1991, à definição de uma nova espécie, *R. tropici* (tro' pi. ci. Gr. n. tropikos, trópicos), que incluiria as estirpes do Tipo II, que foi subdividido em IIA e IIB. As bactérias dessa nova espécie foram descritas como aeróbias, Gram-negativas, com pH ótimo para crescimento variando entre 5 e 7, crescendo em temperatura até 40°C. As estirpes estudadas foram isoladas de regiões tropicais, nodulam e fixam N₂ com *P. vulgaris*, *Leucaena esculenta* e *L. leucocephala*. A estirpe IIB CIAT 899 (=ATCC 49672, =UMR 1899, = SEMIA 4077) foi designada como estirpe-padrão (“type strain”) e a estirpe representativa do grupo IIA é a CFN 299. A estirpe CIAT 899, assim como as outras do Tipo IIB, também é resistente a metais pesados e aos antibióticos clorofenicol, espectinomcina, carbenicilina e estreptomicina (Martínez-Romero *et al.*, 1991) e apresenta maior tolerância à acidez (Graham *et al.*, 1994) e a temperaturas elevadas (Hungria *et al.*, 1993; Mercante, 1993). Somente as estirpes do Tipo IIB crescem em meio LB (Martínez-Romero *et al.*, 1991) e, nos últimos anos, têm aumentado os relatos sobre diferenças entre os Tipos IIA e IIB, incluindo análise de PCR com seqüências repetitivas (van Berkum *et al.*, 1995) e a presença de megaplasmídios (Geniaux *et al.*, 1995).

Após a criação da espécie *R. tropici* ficou decidido, pelo subcomitê internacional de taxonomia de *Agrobacterium* e *Rhizobium*, que a designação *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* deveria ser usada somente para estirpes que estivessem estreitamente relacionadas aos genes cromossomais de outros biovares desta espécie (Hungria *et al.*, 1997).

A proximidade das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* com as do bv. *viceae* e bv. *trifolii* resulta na possibilidade de fácil recombinação dos genes cromossomais e de transferência de plasmídios entre diferentes biovares (Hungria *et al.*, 1997). Além disso, os

níveis de hibridização DNA-DNA são elevados (Crow *et al.*, 1981) e as seqüências de nucleotídeos de um fragmento do gene 16S rRNA são idênticas entre os três biovares (Young *et al.*, 1991; Eardly *et al.*, 1992). Os isolados de *R. leguminosarum* bv. phaseoli também mostraram baixo nível de polimorfismo e apresentaram similaridade, nos ensaios enzimáticos, com os outros dois biovares (Young, 1985).

Quando as estirpes de *R. leguminosarum* bv. phaseoli, isoladas no México, foram comparadas com os isolados da Europa, encontraram-se diferenças entre os dois grupos no perfil eletroforético de enzimas (Segovia *et al.*, 1991), diversidade genética (Pinero *et al.*, 1988), baixo nível de hibridização com estirpes-referência de *R. leguminosarum* bv. viciae e bv. trifolii (Segovia *et al.*, 1991) e diferenças na seqüência de nucleotídeos de um fragmento do gene 16S rRNA (Eardly *et al.*, 1992). Foi sugerido, então, que todos os isolados americanos obtidos de nódulos de feijoeiro passassem a ser denominados de *Rhizobium* sp. Tipo I (Eardly *et al.*, 1992). A seguir, a análise de seqüências de nucleotídeos do gene 16S rRNA de isolados americanos levou Segovia *et al.* (1993) a sugerirem uma nova espécie para essas estirpes, *Rhizobium etli*, tendo pelo menos um biovar, *Rhizobium etli* bv. phaseoli.

Essa nova espécie de bactéria foi descrita como sendo aeróbia, Gram-negativa, com temperatura máxima de crescimento de 35°C. Essas bactérias não crescem em meio LB e também não apresentam colônias em meio PY na presença de cálcio, na presença de carbenicilina, espectinomicina, cloranfenicol ou rifampicina. Mas crescem em meio mínimo contendo malato como fonte C, mas não com arginina, hipoxantina ou sorbitol. Todas as estirpes são resistentes ao ácido nalidíxico e são distingüíveis das de outras espécies em nível molecular pelos resultados de teste de hibridização do DNA total, perfis enzimáticos de eletroforese e seqüências de genes ribossomais. Segundo a descrição da espécie, as estirpes nodulam exclusivamente *Phaseolus vulgaris* L. (Segovia *et al.*, 1993). A estirpe-padrão é a CFN 42 (=USDA 9032).

Outras espécies e biovares foram descritas como sendo rizóbio de feijoeiro: *R. gallicum* bv. *gallicum* e *R. giardinii* bv. *giardinii* (Amarger *et al.*, 1997). Existem, ainda, diversas diversas estirpes sem posição taxonômica definida, podendo representar novas espécies.

Com tantas diferenças já descobertas e com o constante avanço das técnicas de biologia molecular, será possível, em breve, levar à sugestão de novas espécies. Portanto, é fundamental estar atualizado com as novas correntes taxonômicas e atento para o fato de que, certamente, a cada ano, novos gêneros e espécies estão sendo descobertos e reclassificados,

seguindo uma tendência lógica, desde que se calcula que somente 12% das espécies de bactérias são conhecidas.

1.4.5 Distribuição Geográfica Mundial de Rizóbio do Feijoeiro

Segundo Young (1993), *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* divergiram muito antes dos nódulos evoluírem mas, como os genes *nod* dos dois gêneros são claramente relacionados, deve ter ocorrido transferência lateral. Uma das primeiras teorias, sugeriu que os *Bradyrhizobium* seriam ancestrais e teriam originado junto com as leguminosas, quando imperavam condições de altas temperaturas e umidade. Por outro lado, os estudos filogenéticos mostraram, de modo claro, que o *Rhizobium* é estreitamente relacionado com *Agrobacterium* (Young *et al.*, 1991) e, desse modo, seria lógico pressupor que os genes *nod* se originaram em *Rhizobium* e foram transferidos para *Bradyrhizobium* (Sprent, 1994). A partir daí, os rizóbios passaram a nodular os ancestrais das leguminosas nos trópicos úmidos, com baixa especificidade hospedeira e, indo para ambientes mais especializados, começou a ocorrer a seleção das plantas hospedeiras por determinados rizóbios (Sprent, 1994).

As estirpes de crescimento rápido parecem ser taxonomicamente mais diversificadas e ecologicamente mais adaptadas do que as de crescimento lento, provavelmente porque os principais genes ligados à FBN estão em plasmídios, o que confere maior dinamicidade ao processo (Hungria *et al.*, 1997).

Ainda são desconhecidos todos os fatores que determinam a distribuição geográfica das espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro mas, certamente, a origem da disseminação da planta hospedeira deve estar relacionada à predominância da espécie de rizóbio, que pode ser carregada com as sementes (Hungria *et al.*, 1997).

Segundo Segovia *et al.* (1993), a espécie *R. etli* é normalmente encontrada na Mesoamérica e teria sido introduzida, na Europa, concomitantemente com o seu hospedeiro, no século XVI. Algumas estirpes permaneceram como tal mas, aparentemente, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* pode ter surgido a partir da adição, por transferência horizontal, do plasmídio simbiótico de uma espécie de *R. etli* para o cromossomo de *R. leguminosarum*. A coexistência, por um período mais longo, entre *R. etli* e o hospedeiro, em relação à espécie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, explicaria por que a estirpe parental apresentaria maior diversidade genética (Young, 1985).

Provavelmente nos locais onde o feijoeiro foi introduzido via países da América do Sul, as sementes devem ter carregado *R. tropici*, explicando a dominância dessa espécie em algumas regiões da África, como no Quênia (Ayanango *et al.*, 1995). Em diversos locais da França, conforme esperado, foi detectada a presença de *R. leguminosarum* bv. phaseoli, mas *R. tropici* respondeu por 2 a 82% da população (Amarger *et al.*, 1993, 1994, 1995), podendo ter sido o resultado de introdução de sementes da América do Sul.

Uma coleção de isolados de rizóbio de 17 regiões geograficamente separadas do Norte da Argentina foi caracterizada, por Aguilar *et al.* (1998), com base na variação de hospedeiro, crescimento, hibridização, DNA fingerprinting e perfis plasmidiais, com o intuito de se verificar quais espécies de rizóbio nodulavam eficientemente os feijoeiros selvagens. Sendo assim, verificaram uma grande dominância de *R. etli*, além de alguns isolados apresentarem, como simbionte, *R. leguminosarum* bv. phaseoli. Com isso, a predominância de *R. etli* sugere que, neste centro de origem de *P. vulgaris*, a co-evolução de *Rhizobium* sp. e feijões primitivos tem resultado, preferencialmente, nesta associação.

No continente Australiano, 745 estirpes de rizóbio foram isoladas e caracterizadas a partir de 32 diferentes espécies de leguminosas hospedeiras provenientes de 17 localidades, por Lafay e Burdon (1998), onde, entre essas espécies de rizóbio, 16 pertenciam à *Bradyrhizobium*, dois à *R. leguminosarum* e três ao *Mesorhizobium*. Apenas uma espécie genômica correspondeu à espécie conhecida como *R. tropici* e a distribuição das espécies genômicas foi não seguiu um padrão entre os isolados, leguminosas hospedeiras e localidades. Contudo, algumas espécies preferem estirpes específicas e não foi observado nenhuma divisão geográfica entre as mesmas.

De acordo com as conclusões acima mencionadas, pode-se observar a promiscuidade das estirpes de rizóbio com relação a escolha do hospedeiro, a ampla distribuição geográfica dessas bactérias por todos os continentes e sua enorme diversidade genética.

1.4.6 Estudo de Diversidade do Microsmbionte do Feijoeiro no Brasil

A espécie *R. tropici* parece ser nativa da região tropical da América do Sul, (Martínez-Romero *et al.*, 1991), sendo largamente encontrada no Brasil (Mercante, 1993; Hungria *et al.*, 1995). Em uma análise de população em solos cultivados com feijoeiro no

Estado do Paraná foi constatado que, em média, a população era constituída de 29% de rizóbio somente capaz de nodular o feijoeiro (*R. leguminosarum* bv. phaseoli ou *R. etli*), 25% capaz de nodular feijoeiro e leucena (*R. tropici* ou *R. etli*) e 46% de *Rhizobium* (*Leucaena*) spp. (Hungria; Stacey, 1997).

Entre isolados de solos da Bahia e do Espírito Santo, usando a leucena como planta recuperadora, 47,5% foram classificados como *R. tropici* IIA, 1,5% como *R. tropici* IIB e os demais como tipo I (*R. etli*) (Stralioetto *et al.*, 1995).

Em levantamentos realizados na região dos Cerrados utilizando estirpes isoladas de nódulos de feijoeiro, foi constatado que, aproximadamente, 70% da população foi classificada com *R. tropici* IIA, 19% de *R. tropici* IIB e 11% como *R. etli* ou *R. leguminosarum* bv. Phaseoli (Hungria *et al.*, 1997). Outro grupo de pesquisadores (Sá *et al.*, 1997), isolou estirpes eficientes de rizóbio de diferentes regiões do cerrado. Tais estirpes foram distinguidas, fenotipicamente, como *R. leguminosarum* bv. phaseoli e *R. tropici*.

Os trabalhos citados acima indicam que, apesar da importância da cultura do feijoeiro e do processo de fixação do N₂, poucos estudos foram conduzidos no Brasil sobre a diversidade de rizóbio capaz de nodular essa leguminosa. Este trabalho teve por objetivo, portanto, estudar a diversidade de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro isolado de duas regiões distintas e contrastantes, o semi-árido de Pernambuco e a região subtropical do Paraná.

2 OBJETIVO

Estudar a diversidade de populações de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro de dois ecossistemas distintos do Brasil: Pernambuco, com solos alcalinos e clima semi-árido e Paraná, com solos ácidos e clima tropical. A avaliação será feita através da variabilidade genética e simbiótica de isolados dessas regiões.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DA PESQUISA

Todos os experimentos foram conduzidos no laboratório de Microbiologia do Solo e casa de vegetação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa -Soja), na cidade de Londrina, Paraná.

3.2 ISOLAMENTO DAS ESTIRPES DE RIZÓBIO

Foram isoladas 245 estirpes a partir de amostras de solos representativos do Estado de Pernambuco, da região da Zona da Mata, em áreas anterior e atualmente cultivadas com feijoeiro, além de áreas de solos cobertos com vegetação natural e de solos do Estado do Paraná, nos distritos de São João, Warta, Toledo, Francisco Alves e Londrina. As culturas de cobertura desses solos podem ser visualizadas na Tabela 1.

Para a obtenção de amostras de solos de boa representatividade, os critérios levados em consideração foram: amostras que representassem toda a área em estudo, coletadas segundo Andrade e Hamakawa (1994), e cuidados durante todo o processo de obtenção das amostras, que vai da coleta até a avaliação em laboratório, para tentar manter os materiais em condições semelhantes às dos locais em que foram coletados.

Depois de identificadas, as amostras foram peneiradas em malha de 4 mm para eliminar pedregulhos e pedaços de vegetais maiores, mas sem perder colônias de rizóbios localizadas no interior dos agregados do solo.

Como diluente, foi utilizada solução fisiológica preparada a partir de 8,5 g de NaCl dissolvidos em 1000 ml. de água destilada. Para a diluição dos solos, segundo Vincent (1970), foi preparado um frasco contendo 90 ml. da solução fisiológica e adicionaram-se 10 g de cada solo. A suspensão foi agitada com pérolas de vidro, durante 30 minutos, em agitador mecânico horizontal e, então, transferida para um tubo de vidro contendo 9 ml. da solução fisiológica.

Foram escolhidas duas cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) como plantas-iscas para rizóbio, uma de grãos pretos (Negro Argel) e outra de grãos marrons

(Aporé). Estas cultivares foram escolhidas por serem boas noduladoras e pela coloração diferente dos grãos, com exsudação de distintos flavonóides (Hungria *et al.*, 1991), podendo selecionar grupos diferentes de rizóbio. Após o processo de desinfestação com álcool (95%) (para quebrar a tensão superficial) e hipoclorito de sódio (10%), 3 minutos cada e lavagem por 3 vezes com água destilada estéril, as sementes foram colocadas para germinar em papel para germinação (tipo-Germiteste) umedecido em água destilada estéril, enroladas dentro de sacos plásticos semi-fechados para evitar ressecamento e incubadas durante 48 horas a 27°C, no escuro (Andrade; Hamakawa, 1994).

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições, em condições de casa de vegetação, em vidros tipo “maionese”, de 530 ml. de capacidade (Andrade; Hamakawa, 1994). Para a montagem dos vidros foi necessário colocar, no interior do frasco, um papel para germinação contendo um orifício por onde se introduz a semente pré-germinada e a abertura do vidro é coberta com papel laminado vedada com barbante. Foi preparada uma solução estoque sem N mineral e contendo, por litro: 147,05 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 68,05 g de KH_2PO_4 ; 3,67 g de Fe-EDTA; 61,65 g de MgSO_4 ; 43,50 g de K_2SO_4 ; 0,169 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,124 g de H_3BO_3 ; 0,144 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,050 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,028 g de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0553 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Broughton; Dillworth, 1971). Foi utilizado 1ml. de cada solução estoque por litro de solução final e o pH foi ajustado para 6,6-6,8 com NaOH, sendo colocados 400 ml. dessa solução por frasco. Depois de emergidas, as plântulas foram introduzidas, através de um orifício feito no papel de alumínio, até alcançarem o interior do vidro.

Quatro semanas após a inoculação, as plantas foram coletadas e todos os nódulos retirados, procedendo-se ao isolamento das estirpes, segundo Vincent (1970). De cada cultivar foram obtidos 15 isolados, de nódulos escolhidos ao acaso, por amostra de solo, na diluição 10^{-2} . Para isso, os nódulos foram desinfestados individualmente com álcool (95%), hipoclorito de sódio (10%) (3 minutos cada) e água destilada esterilizada, macerados e, com uma alça, passados para placas de Petri contendo meio de cultura sólido com extrato de levedura manitol (YM); foi adicionado, como indicador, vermelho Congo a 1% (solução estoque de $0,25 \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$; 10 ml. do estoque. L^{-1} do YM; concentração final de $25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), pois os contaminantes, ao contrário do rizóbio, absorvem a coloração vermelha.

As placas foram incubadas a 27°C, no escuro, e verificadas diariamente, determinando-se as propriedades morfológicas (cor, forma e tamanho das colônias, produção de melanina). Depois de crescidas em YM, as estirpes foram armazenadas em glicerol, na

proporção 1:1 (v:v), a -80°C . Para uso contínuo, as bactérias foram mantidas em meio YMA (YM com 12 g.L^{-1}) a 4°C .

3.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DAS ESTIRPES

3.3.1 Extração de DNA

As bactérias foram incubadas em 20 ml. de meio YM, durante cinco dias, a 28°C , com agitação. Após a incubação, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos e lavadas, por três vezes, com solução salina (NaCl a 0,85%). Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado em 400 μL de TE 50/20 (50 mM de Tris, pH 7,5; 10 mM de NaCl e 10 mM de EDTA, pH 8,0), a uma concentração de 10^6 UFC.ml^{-1} e avaliado por densidade ótica, segundo curva de crescimento previamente construída com diversas estirpes. A seguir, pipetaram-se 400 μL da suspensão bacteriana e foram adicionados 50 μL de SDS 10% (10g de lauril sulfato de sódio em 100 ml. de água), 5 μL de proteinase K (20 mg.ml^{-1} de água, mantida no congelador), 10 μL de lisozima (5 mg.ml^{-1} de água, mantida no congelador), 1 μL de RNase (10 mg.ml^{-1} , preparada em tampão com 10 mM de Tris HCl pH 7.5 e 15 mM de NaCl) e, então, foram incubadas a 37°C , por mais ou menos 1 hora (até clarear). Depois disso, as amostras foram homogeneizadas com ponteiras de 1000 ml., movimentando para dentro e para fora, por três vezes, para retirar a viscosidade. A seguir, foi acrescentado NaCl para atingir uma concentração final de 250 mM e acetato de sódio até a concentração final de 300 mM. As amostras foram bem homogeneizadas e deixadas em repouso por 1 hora, a 40°C . Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos, recolheu-se o sobrenadante de cada amostra e foram adicionados, a estes, 2 volumes de etanol absoluto frio a 95%; armazenou-se, então, por uma noite, a -20°C . No dia seguinte, após as amostras serem centrifugadas novamente a 12.000 rpm por 15 minutos, o etanol foi descartado e os precipitados colocados para secar e, em seguida, ressuspensionados em TE 10:1 (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8,0). As soluções de NaCl, Tris-HCl, EDTA Na_2 , SDS, AcONa e TE 50/20 foram previamente autoclavadas.

A quantificação do DNA de cada amostra foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda 260 nm, sendo que 1 unidade de absorvância corresponde a $50\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$

de DNA. A leitura foi feita com as amostras diluídas e a concentração do DNA ($\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$) foi dada pela seguinte relação: $(\text{OD}_{260} \times \text{Fator dil.} \times 50 \mu\text{g.ml.}^{-1})/1000$. Para verificar a pureza do DNA foi feita, também, a leitura a 280 nm. Com a relação entre as leituras 260/280 foi obtida a pureza do DNA ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$), que deve ser inferior a 1,8. Depois das leituras, foi realizada a diluição do DNA para obter um estoque de DNA concentrado e outro de DNA diluído (utilizado para amplificação). Para a diluição, foram utilizados 10 μL de DNA, variando a quantidade de água (mili Q esterilizada ou TE 10:1), segundo a fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$, onde C_i é a concentração inicial do DNA, segundo a quantificação em 260nm; V_i é o volume inicial da solução de DNA; C_f é a concentração final da solução de DNA e V_f é o volume final necessário.

Para confirmar a concentração e pureza do DNA, as amostras (diluídas) foram corridas em mini-gel de agarose de 8 x 10 cm a 1,5% [0,6g de agarose em 40ml. de TBE 1X (10,8 ml. de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4,0 ml. de EDTA, 0,5 M, pH 8,0)], durante 25 minutos a 80 V.

A pureza do DNA foi verificada após a coloração com brometo de etídio (1mg.ml.^{-1} de estoque, 0,00005% de concentração final) por, aproximadamente, 20 minutos e a visualização feita em transluminador emitindo luz ultra-violeta de comprimento de onda curto.

3.3.2 AMPLIFICAÇÃO DE DNA PELA REAÇÃO DE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) COM O “PRIMER” ESPECÍFICO ERIC (“ENTEROBACTERIAL REPETITIVE INTERGENIC CONSENSUS”).

Os “primers” ERIC amplificam regiões repetitivas do DNA cromossômico de enterobactérias (de Bruijin, 1992) e vêm sendo utilizados em diversos trabalhos de filogenia. As seqüências dos “primers” são: ERIC1R, 3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-5'; ERIC2R, 5'-AAGTAAGTGACTGGGTGAGCG-3'.

Para iniciar a reação foi necessário preparar os seguintes reagentes: dNTPs, 1,5mM de solução para cada um dos quatro nucleotídeos; primers (os pares ERIC I e II, estoques preparados a $30 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$; concentração final de $50 \text{ pmol.}\mu\text{L}^{-1}$); Taq polimerase, 5 U. μL^{-1} , diluída em tampão 1X; tampão 10X [500 μL de KCl 1 M (500 mM); 100 μL de Tris-

HCl pH 8,3, 1 M (100 mM); 400 µL de água]; solução de MgCl₂, 20 mM. Os volumes utilizados para cada reação foram: 12,6 µL de água (mili Q esterilizada); 5,0 µL de dNTPs; 2,5 µL de tampão 10X; 1,2 µL de MgCl₂; 1,0 µL de cada "primer"; 1,5 µL de DNA (50 ng); 0,2 µL de Taq; tendo um volume final de 25 µL. Para os "primers" ERIC I e II os ciclos foram fornecidos segundo de Bruijin (1992), com uma pequena modificação, segundo Santos *et al.* (1999): 1 ciclo a 95°C por 7 minutos; 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, a 52°C por 1 minuto e a 65°C por 8 minutos; 1 ciclo a 68°C por 16 minutos; mantendo-se a 4°C.

Depois da amplificação, foram colocados 2 µL do tampão de amostra por tubo (tampão de amostra preparado com 0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose ou 30% de glicerol) e preparado um gel de agarose de 20 x 25 cm a 1,5%, diluído em tampão TBE. Nas canaletas do gel foram colocados 27 µL de cada amostra, com exceção da primeira canaleta, da última e da central, nas quais foi colocado 0,7 µl, por canaleta, do padrão de peso molecular de 1kb (plus DNA LadderTM- Gibco- Life technologies). A corrida foi realizada a 100 V por, aproximadamente, 6 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio, conforme descrito anteriormente, e fotografados para posterior análise dos resultados.

A análise foi feita utilizando o programa de análise Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) e o método de agrupamento utilizado foi o UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, arithmetic averages, método de agrupamento de médias aritméticas), com o coeficiente de Pearson, que avalia a densidade de cada banda. A análise de ERIC-PCR permite o agrupamento a nível de estirpes.

3.3.3 PERFIL DE RFLP- PCR DO GENE QUE CODIFICA A REGIÃO 16S rRNA (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

A metodologia adotada foi baseada em Amarger *et al.* (1997), mas utilizando "primers" diferentes para amplificar o 16S rRNA. A partir do estoque de DNA diluído descrito na extração de DNA, procedeu-se à amplificação com os "primers" Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCGTGGCGGC-3') (Young et al, 1991) e Y3 (3'-CTGACCCCAACTTCAGCATTGTTCCAT-5') (P. W. Young, dados não publicados). Esses "primers" amplificam uma região do 16S rRNA com, aproximadamente, 1500 pares de bases, incluindo os "primers", portanto, quase todo o 16S rRNA.

Uma solução “master mix” foi preparada para a reação de amplificação, contendo: 30,3 μL de água miliQ esterilizada; 5 μL de tampão para PCR (200 mM de Tris-base, pH 8,4; 500 mM de KCl); 1,5 μL de MgCl_2 50mM; 2 μL de dNTP 5mM; 0,5 μL de cada "primer" – Y_1 e Y_3 – estoque a 10 $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 0,2 μL de Taq polimerase, estoque a 5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. O ciclo para amplificação de Y_1 e Y_3 foi levemente modificado de Young *et al.* (1991), para permitir a obtenção de bandas nas condições do Laboratório de Microbiologia de Solos da Embrapa Soja. Para isso, foi necessário aumentar a temperatura de anelamento em 2° C. Conseqüentemente, os ciclos foram de: 2 minutos a 93° C; 35 ciclos de 45 segundos a 93° C, 45 segundos a 64° C, 2 minutos a 72° C; 1 ciclo de 5 minutos a 72° C, com manutenção a 4° C. Para verificar o sucesso da amplificação, os fragmentos foram visualizados em mini-gel de agarose de 8 x 10 cm a 1,5%.

Para a análise de restrição, os fragmentos foram cortados com as seguintes enzimas de restrição: *Cfo* I (5′- GCG/C – 3′; 3′- C/GCG – 5′); *Hinf* I (5′- G/ANTC – 3′; 3′- CTNA/G – 5′); *Msp* I (5′- C/CGG – 3′; 3′- GGC/C – 5′); *Rsa* I (5′- GT/AC – 3′; 3′- CA/TG – 5′) e *Nde* II (5′- /GATC - 3′, 3′- CTAG/ - 5′) (Gibco- Life technologies). Com exceção da enzima *Nde* II, para cada reação, o volume utilizado de reagentes foi: 0,5 μL da enzima (10 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$); 0,7 μL do tampão 10X (10% do volume total da reação); 6 μL do produto de PCR; volume total de 7,2 μL por reação. As reações foram incubadas a 37 °C , por uma noite, em banho-maria. Como todas as enzimas estão estocadas a 10 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, exceto a *Nde* II, estocada a 5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, durante a digestão com essa enzima o volume de cada reagente foi de: 1 μL da enzima; 1 μL do tampão 10X; 1 μL de DTT (ditiotritol) 10 mM (100 mM Tris-HCl - pH 7.6; 10 mM MgCl_2 ; 150 mM NaCl; 1 mM DTT); 1 μL de água mili Q esterilizada; 6 μL do produto de PCR; volume total de 10 μL .

Em cada canaleta do gel foram colocados 7,2 μL de cada amostra + 3 μL do tampão de amostra, com exceção da primeira canaleta, da última e da central, nas quais foi colocado 0,7 μg , por canaleta, do padrão de peso molecular de 100 kb. As amostras foram aplicadas em gel de agarose de 10 x 12,5 cm, a 3 %, utilizando tampão TBE 0,5X, tanto para o preparo do gel quanto para a corrida, que foi a 100 V por cerca de, aproximadamente, 3,5 horas. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas visualizadas em transluminador com lâmpada ultravioleta, conforme descrito anteriormente.

Os géis foram fotografados e a análise de agrupamento das estirpes foi realizada utilizando o programa Bio Numerics, mas cada banda foi marcada para análise pelo

método UPGMA e o coeficiente de Jaccard. O RFLP-PCR da região 16 rRNA permite o agrupamento, de acordo com as similaridades dos padrões de eletroforese, a nível de espécie.

3.3.4 Seqüenciamento, Total ou Parcial, do Gene que Codifica a Região 16S rRNA

Neste estudo, foram selecionadas, para seqüenciamento, 50 estirpes de rizóbio, conforme os agrupamentos obtidos por ERIC-PCR e RFLP-PCR.

Após a extração do DNA das bactérias, procedeu-se à amplificação do mesmo pela técnica de PCR com os “primers” Y1 e Y3, conforme descrito no item 3.3, mas, para cada bactéria, foram realizadas três reações, a fim de obter quantidade suficiente para o seqüenciamento. Depois de amplificado, o DNA foi lido em espectrofotômetro e diluído a $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; a concentração foi confirmada em gel de agarose 3% e corrida com padrão de massa.

Para a purificação das amostras, utilizou-se o kit “Concert Rapid PCR Purification System” da GibcoBRL (n^o11458), da seguinte forma: foram adicionados 400 μL de “Binding Solution-H1” (hidrocloreto de guanidina, EDTA, Tris HCl, isopropanol) para cada amostra amplificada e homogeneizada. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 12.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Em todos os precipitados foi adicionado 700 μL de tampão de lavagem “Wash Buffer-H2” (NaCl, EDTA, Tris HCl e etanol) e, então, centrifugados novamente por 1 minuto a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram novamente centrifugadas, para que qualquer resíduo de tampão de lavagem fosse removido.

Na reação para seqüenciamento, os fragmentos de PCR (70 ng para Y1 e 40 ng para Y2) foram amplificados novamente, utilizando os “primers” Y1 e Y2 ($3,2 \text{ pmol} \cdot \text{mL}^{-1}$), além dos “primers” montados especificamente para algumas estirpes, e o kit “Big dye” (Applied Biosystem), da seguinte forma: cada amostra foi amplificada, separadamente, por Y1-fita longa (8,0 μl de água; 1,0 μl do “primer”, 4,0 μl de Big dye; 7,0 μl de DNA), Y2-fita curta (12,0 μl de água; 1,0 μl de “primer”, 3,0 μl de Big dye; 4,0 μl de DNA) e demais “primers” feitos para as estirpes; utilizou-se o mesmo ciclo de amplificação (93°C por 2 minutos, 93°C por 45 segundos, 64°C por 45 segundos, 72°C por 2 minutos, 72°C por 5 minutos e manutenção 4°C).

A próxima etapa do processo foi a precipitação, onde foram adicionados, para cada amostra, aproximadamente 80 μL de isopropanol a 85%. Os tubos foram bem fechados, agitados vigorosamente em vórtex e incubados, por 15 minutos, à temperatura

ambiente para que os produtos de extensão precipitassem. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12.000 rpm (25°C) e o sobrenadante completamente aspirado com pipeta (esta etapa foi realizada imediatamente após a centrifugação). Foram adicionados, aos precipitados, 150 µL de isopropanol a 85%, agitados em vórtex e centrifugados da mesma forma anterior. Posteriormente, os tubos contendo as amostras foram centrifugados por 5 minutos na velocidade máxima, o sobrenadante foi novamente aspirado cuidadosamente, as amostras foram secas, colocando-se os tubos com suas tampas abertas no bloco aquecido a 90°C por 1 minuto e, por fim, as amostras foram ressuspensas em 8 µL de tampão (formamida e azul de dextran), na proporção 5:1, e desnaturadas por 2 minutos a 93°C, seguido de choque térmico em gelo.

O sequenciamento foi realizado em gel de poliacrilamida a 5% (kit “Long Ranger Singel packs”, da FMC bioproducts), onde foram aplicados 2 µL de cada amostra. O sequenciador utilizado foi o ABI 377, da Perkin Elmer. As seqüências obtidas foram submetidas à análise para verificar alinhamentos significativos com outras bactérias, segundo a base de dados disponível no GenBank database, BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As seqüências obtidas e aquelas de estirpes representativas de outras espécies de rizóbio foram alinhadas pelo programa Bionumerics e inferiu-se uma árvore filogenética, pelo método de agrupamento UPGMA.

3.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E SIMBIÓTICA DAS ESTIRPES

Procedeu-se a determinação de algumas características importantes das espécies de estirpes de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro, selecionadas segundo os grupos de ERIC-PCR e RFLP-PCR.

3.4.1 Caracterização Fisiológica

3.4.1.1 Crescimento em LB

Para verificar o crescimento em meio Luria-Bertani (LB) (contendo, para cada litro: 10,0 g de tripton; 5,0 g de extrato de levedura; 3,0 g de NaCl; pH ajustado em 7,5)

(Maniatis *et al.*, 1989), os isolados foram inoculados com alça em placas de Petri contendo esse meio, com três repetições para cada estirpe e as placas foram incubadas a 28° C, no escuro. Como controle, as estirpes foram crescidas em YMA a 28°C, no escuro.

3.4.1.2 Crescimento a 40° C

Para o reconhecimento das bactérias que possuem tolerância a altas temperaturas, as estirpes foram crescidas em meio YMA e incubadas a 40°C, no escuro, por cerca de 7 dias. Foram feitas três repetições por estirpe. Como controle, as estirpes foram colocadas para crescer a 28°C, por 7 dias, no mesmo meio, no escuro.

3.4.1.3 Síntese de melanina

A síntese de melanina *in vitro* foi avaliada segundo Rodrigues-Navarro *et al.* (1996), em placas TYA (contendo, para cada litro, 5,0 g de triptona; 3,0 g de extrato de levedura; 1,3 g de CaCl₂ · 6 H₂O; pH ajustado a 6,8) suplementadas com 1,2 mg.ml.⁻¹ de L-tirosina e 40 µg.ml.⁻¹ de CuSO₄. Após 7 dias de crescimento, a produção de pigmento escuro foi observada e, a seguir, as bactérias foram transferidas tratadas, segundo Cubo *et al.* (1988), com 0,05 ml. de TBE (Tris-base, 10,8 g; ácido bórico, 5,5 g; EDTA 50 mM pH 8,3, 40 ml.; pH 8,3) com 10% (peso/volume) de SDS, para quebrar a parede celular e obter uma nova visualização do pigmento. Para cada estirpe foram feitas três repetições. Depois de um tempo máximo de 24 horas de incubação à temperatura ambiente (25°C), as bactérias que produziram um pigmento escuro, difusível, foram marcadas como produtoras de melanina.

3.4.2 Avaliação simbiótica

3.4.2.1 Capacidade de nodular *leucaena leucocephala* em casa de vegetação

A *Leucaena leucocephala* é uma das plantas pertencentes à família *Leguminosae* que pode ser nodulada por algumas espécies de rizóbio capazes de nodular o

feijoeiro (Martinez-Romero *et al.*, 1991; Segovia *et al.*, 1993). A nodulação dessa leguminosa auxilia na avaliação de especificidade das estirpes em nodular o feijão. Pela difícil quebra de dormência, inicialmente as sementes foram escarificadas com lixa grossa e deixadas por 5 minutos no ácido sulfúrico (98%), sendo lavadas, posteriormente, em água deionizada estéril (v:v) (Andrade; Hamakawa, 1994). Para a obtenção das plântulas, as sementes foram colocadas para germinar a 27°C, no escuro, conforme descrito anteriormente.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições, em condições de casa de vegetação, em vidros tipo “maionese”, de 530 ml. de capacidade, repetindo os mesmos procedimentos usados para o isolamento dos nódulos (item 2, Material e Métodos). As estirpes foram crescidas em meio YM líquido, com agitação, a 28°C. Foram inoculados 1 ml. das culturas de cada estirpe (10^9 célula.ml.⁻¹) por plântula e, então, o experimento foi conduzido em casa de vegetação. Foram incluídos controles sem inoculação. Aos 30 dias após o plantio, as plantas foram coletadas para avaliar a presença ou ausência de nódulos nas raízes.

3.4.2.2 Avaliação da estabilidade genética dos genes de nodulação

A estabilidade genética dos genes de nodulação foi avaliada pela reinoculação das estirpes em feijoeiro. O teste de infecção foi feito em vasos “tipo maionese” com solução nutritiva contendo os nutrientes anteriormente descritos (item 2). O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições, em condições de casa de vegetação. As sementes de feijão (cultivar Aporé) foram previamente desinfestadas com álcool (95%) e hipoclorito de sódio a 10%, e lavadas em água deionizada estéril, conforme descrito anteriormente (item 2, Material e Métodos). Inoculou-se 1 ml. das culturas de cada estirpe (10^9 célula.ml.⁻¹) por semente. Foram incluídos controle sem inoculação. Aos 30 dias após o plantio, as plantas foram coletadas e avaliadas quanto à nodulação.

4 RESULTADOS

4.1 ISOLADOS DE *RHIZOBIUM* OBTIDOS A PARTIR DE NÓDULOS DE FEIJÃO

Os isolados foram obtidos de duas regiões contrastantes do Brasil, a Região Nordeste, em quatro municípios de Zona da Mata de Pernambuco e a Região Sul, em quatro municípios do Estado Paraná (Tabela 1). Para a captura de rizóbios foram utilizadas duas cultivares de feijão como planta-isca, a Aporé, de tegumento marrom, e a Negro Argel, de tegumento preto. Obtiveram-se 243 isolados, de 12 dos 14 solos investigados. Quanto ao manejo de solo, o maior número de isolados, com 11,9%, foi obtido de um solo cultivado com feijoeiro (solo 1), no Distrito de São Francisco, Estado de Pernambuco. Com 3,7%, o solo não perturbado, com vegetação nativa (solo 3), no Distrito de Santo Antônio, também no Estado de Pernambuco, foi o solo que apresentou o menor número de isolados. Dentre as cultivares utilizadas como planta-isca, a Aporé foi a que apresentou maior número de isolados, com 56,7%, enquanto que a Negro Argel foi capaz de capturar 43,2% dos isolados. Isso ocorreu tanto na Região Nordeste, como na Região Sul. O número de isolados obtidos com a cultivar Aporé foi de 76 e 62, respectivamente para as regiões Nordeste e Sul enquanto que a cultivar Negro Argel apresentou, para cada região, respectivamente 56 e 49 isolados (Tabela 1). Dos 14 solos investigados, dois não apresentaram nenhum isolado: o solo 7, com vegetação do semi-árido, não perturbado, localizado no Distrito da Serra Talhada, Pernambuco e o solo 10, cultivado com a rotação soja (*Glycine max*)/trigo (*Triticum aestivum*), no Distrito da Warta, no Estado do Paraná.

Tabela 1 – Procedência, cultura de cobertura e número de isolados obtidos de nódulos de duas cultivares de feijoeiro inoculadas com 14 solos dos Estados de Pernambuco e Paraná.

Solo	Estado	Distrito	Manejo do Solo	Aporé	Negro Argel
1	PE	São Francisco	Cultivado com feijoeiro	14	15
2	PE	São Francisco	Cultivado com feijoeiro há três anos	14	14
3	PE	Santo Antônio	Solo não perturbado, com vegetação nativa	6	3
4	PE	Santo Antonio	Cultivado com feijoeiro quatro anos antes	15	7
5	PE	Caruaru	Cultivado com feijoeiro, uma área que não recebeu fertilizantes por 10 anos	15	8
6	PE	Caruaru	Cultivado com feijoeiro	12	9
7	PE	Serra Talhada	Vegetação do semi-árido, não perturbada	-	-
8	PR	São João	Cultivado com feijoeiro, por dois anos, entre as linhas de café	9	11
9	PR	São João	Soja e feijoeiro pelos últimos dois anos	9	-
10	PR	Warta	Cultivado com soja/trigo	-	-
11	PR	Toledo	Cultivado com soja/trigo	13	13
12	PR	Toledo	Cultivado com soja/trigo	7	11
13	PR	Francisco Alves	Feijoeiro por vários anos intercalado com milho	11	8
14	PR	Francisco Alves	Feijoeiro intercalado com milho	13	6

3.4.2 Análise Genética pela Amplificação do DNA Pelo ERIC-PCR

Dos 243 isolados, 34 não cresceram em meio de cultura, contendo extrato de levedura e manitol (Vincent, 1970), desse modo, a caracterização foi realizada com 209 isolados. Após a extração, procedeu-se à amplificação do DNA de cada isolado pela técnica de PCR com o oligonucleotídeo (“primer”) específico ERIC. Constatou-se um grau elevado de polimorfismo entre as bactérias investigadas e os dados obtidos foram utilizados na geração de uma matriz de valores binários, construída de acordo com a presença ou ausência de bandas entre diferentes acessos. Procedeu-se, então, à avaliação estatística destes dados, para produzir um dendrograma (Figura 1). Para realizar a análise utilizou-se o método de agrupamento UPGMA e o coeficiente de Jaccard. A análise geral com as estirpes mostrou um agrupamento a um nível de similaridade inferior a 10%. Mesmo considerando um nível maior de similaridade, de 70%, foi evidente o grau elevado de diversidade genética entre os isolados, com 80,8% representando estirpes únicas. Pode-se constatar, em vários agrupamentos, o efeito da cultivar utilizada como planta-isca, o efeito da procedência do solo e, principalmente, da combinação planta-isca x solo. Foi constatada maior similaridade genética entre diversos rizóbios do mesmo solo. Como exemplo, os isolados 172, 177, 176, 166, 179, 178, 170, 169, 174 e 175 formaram o primeiro agrupamento (Grupo 1), unidos ao nível de 51%, podendo ser visualizados na parte superior do dendrograma e pertencem ao solo 12, sob o manejo com soja/trigo, no Paraná. Outros agrupamentos de rizóbios do mesmo solo foram: 190, 193, 192, 195 e 194, isolados do solo 13, cultivado com feijoeiro intercalado com milho e unidos ao nível de 49% de similaridade (Grupo 2); 35, 36, 38 e 40, agrupados com 82% de similaridade, capturados com a cultivar Aporé, e provenientes do solo cultivado com feijoeiro em Pernambuco (Grupo 3) e os isolados 51, 45 e 44, unidos ao nível de 79% e provenientes do mesmo solo, mas capturados pela cultivar Negro Argel (Grupo 4); 158, 243, 159, 160 e 238, agrupados com 57% de similaridade, provenientes do solo 9, cultivado com soja e feijão nos últimos dois anos (Grupo 5). Algumas poucas vezes, foram encontrados isolados idênticos, representando a mesma estirpe, mas provenientes de solos diferentes, mas da mesma região. Como exemplo, o isolado 119, de Caruaru, com os isolados 53 e 57, de São Francisco (Grupo 6), ambos de PE; o isolado 153, de São João e o 232, de Francisco Alves, no PR (Grupo 7); o isolado 241, de São João, e os isolados 163 e 164, de Toledo, também no Paraná (Grupo 8) e os isolados 60, de Santo Antonio e 109, de Caruaru (Grupo 9), ambos em

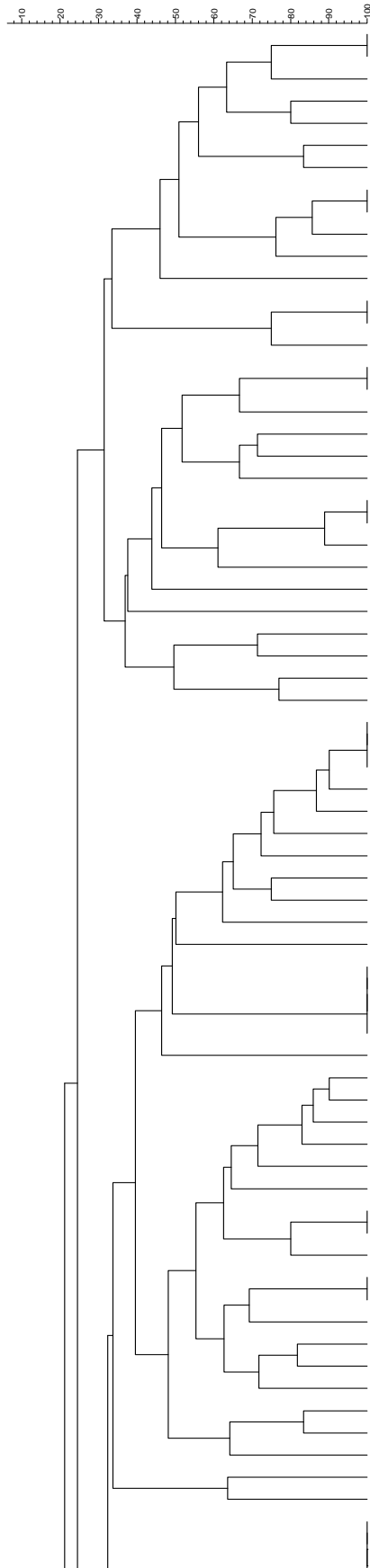
PE. Foi constatado um único caso de isolados semelhantes de regiões distintas; o 14, de São Francisco, PE e o 239, de São João, no PR.

De um modo geral, observou-se a tendência de agrupamentos relacionados com o Estado de procedência das estirpes. Na parte superior do dendrograma, por exemplo, estão unidos, ao nível de 51%, onze isolados, de 172 ao 175, de dois solos do PR. Mais abaixo, formou-se um outro agrupamento, ao nível de 46%, de 16 isolados, do 53 ao 35, de solos de PE, exceto por um deles, o 220, do PR. Diversos outros exemplos podem ser observados no dendrograma. Outros isolados do mesmo solo foram considerados idênticos, representando a mesma estirpe. Como exemplo foram encontrados os isolados: 7, 5, 10 e 8, do solo 1 e capturados pela Negro Argel; 12, 49, 19, 13, 15 e 18, também do solo 1 e capturados pelas duas cultivares; 208, 210, 209 e 211, do solo 14, isolados de nódulos da Aporé; 131, 134, 135, 133 e 136, também capturados pela Aporé, do solo 8; 141, 142 e 143, do mesmo solo 8 mas capturados pela Negro Argel. A partir dessa etapa de análise, cada isolado com perfil de DNA único passou a ser denominado de estirpe.

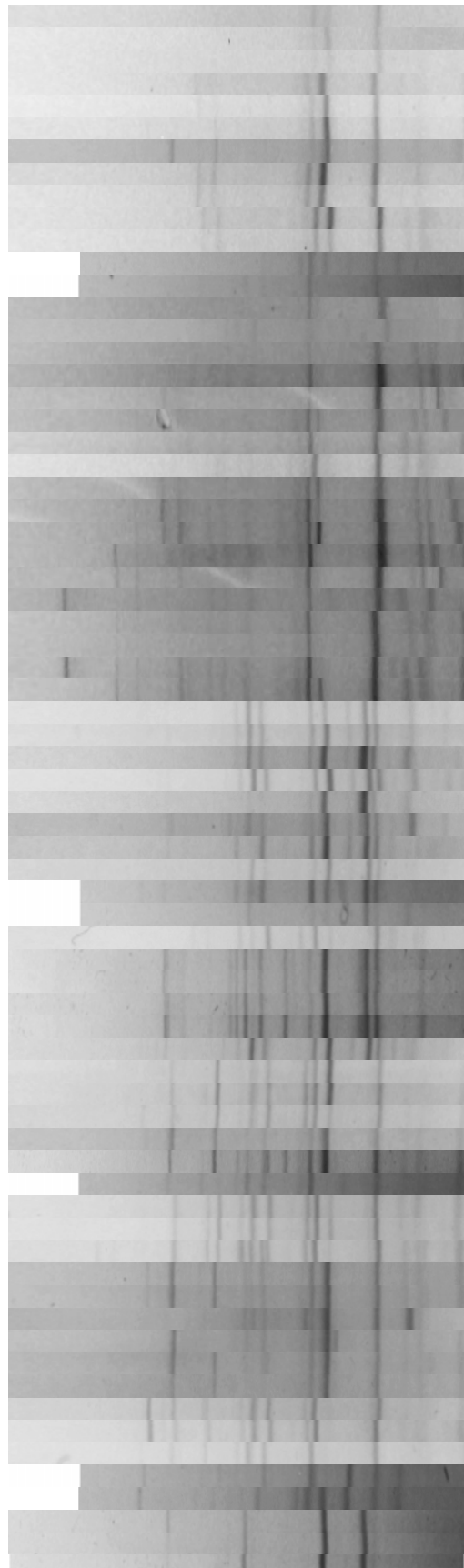
Diversidade Genética

Jaccard (Opt:1.00%) (Tol:1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

ERIC



ERIC



- 172 12 A
- 177 12 N
- 176 12 N
- 166 12 A
- 179 12 N
- 178 12 N
- 224 14 A
- 170 12 A
- 169 12 A
- 174 12 N
- 175 12 A
- 73 4 A
- 76 4 A
- 187 13 A
- 202 14 A
- 191 13 N
- 189 13 A
- 181 12 N
- 183 12 N
- 197 13 N
- 173 12 A
- 184 12 N
- 185 12 N
- 186 12 N
- 188 13 A
- 182 12 N
- 190 13 A
- 193 13 N
- 192 13 N
- 195 13 N
- 194 13 N
- 53 2 N
- 57 2 N
- 119 5 A
- 39 2 A
- 121 5 A
- 220 14 A
- 120 5 N
- 31 2 A
- 70 4 A
- 69 4 A
- 42 2 A
- 7 1 N
- 5 1 N
- 10 1 N
- 8 1 N
- 35 2 A
- 36 2 A
- 38 2 A
- 40 2 A
- 227 14 A
- 9 1 N
- 75 4 A
- 51 2 N
- 45 2 N
- 44 2 N
- 214 14 A
- 247 14 N
- 218 14 A
- 217 14 A
- 215 14 A
- 216 14 A
- 29 2 A
- 50 2 A
- 41 2 A
- 74 4 A
- 82 4 N
- 12 1 N
- 49 1 N
- 17 1 A

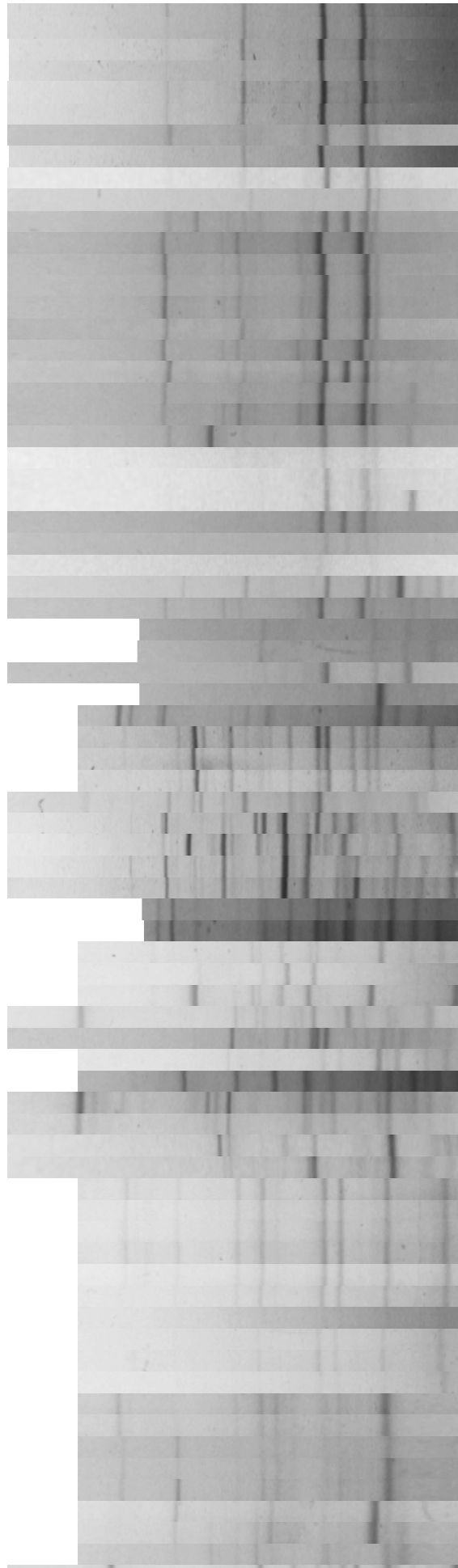
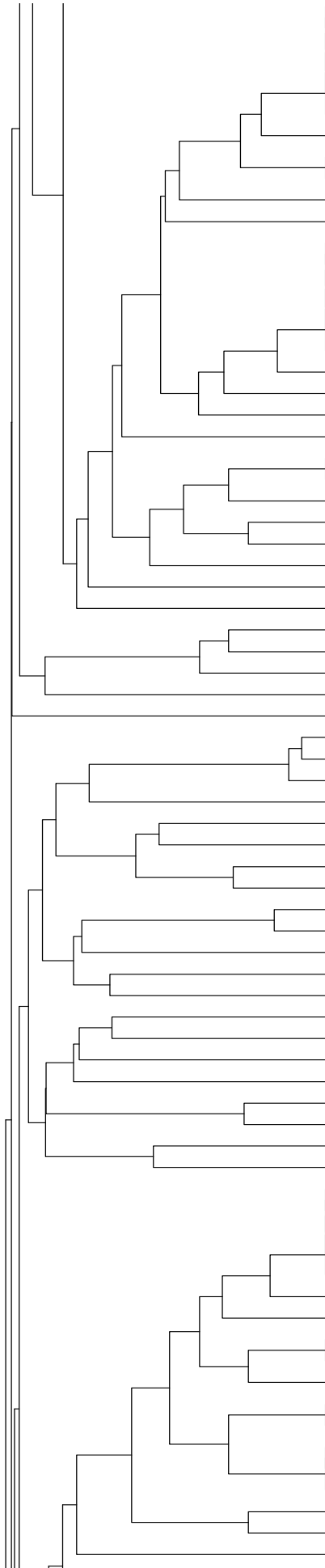
Grupo 1

Grupo 2

Grupo 3

Grupo

Grupo 4



- 12 1 N
- 49 1 N
- 17 1 A
- 13 1 N
- 19 1 A
- 18 1 A
- 225 14 A
- 16 1 A
- 231 14 A
- 30 2 A
- 226 14 A
- 200 13 N
- 208 14 A
- 210 14 A
- 209 14 A
- 211 14 A
- 196 13 N
- 212 14 A
- 207 14 A
- 205 14 A
- 228 14 A
- 153 9 A
- 232 14 A
- 230 15 A
- 206 14 A
- 223 14 A
- 168 12 A
- 22 1 A
- 198 13 N
- 64 3 N
- 61 3 A
- 222 14 A
- 62 3 A
- 84 4 N
- 155 9 A
- 156 9 A
- 237 9 N
- 33 1 A
- 3 1 N
- 1 1 N
- 2 1 N
- 4 1 N
- 96 5 A
- 99 5 A
- 112 6 N
- 128 8 A
- 148 6 N
- 48 2 N
- 123 5 N
- 236 6 N
- 79 4 A
- 92 5 A
- 93 5 A
- 246 5 A
- 101 6 A
- 131 8 A
- 134 8 A
- 135 8 A
- 133 8 A
- 136 8 A
- 235 6 N
- 130 8 A
- 249 6 N
- 116 6 N
- 125 6 N
- 149 9 A
- 150 9 A
- 141 8 N
- 142 8 N
- 143 8 N
- 152 9 A
- 151 9 A
- 140 8 N
-

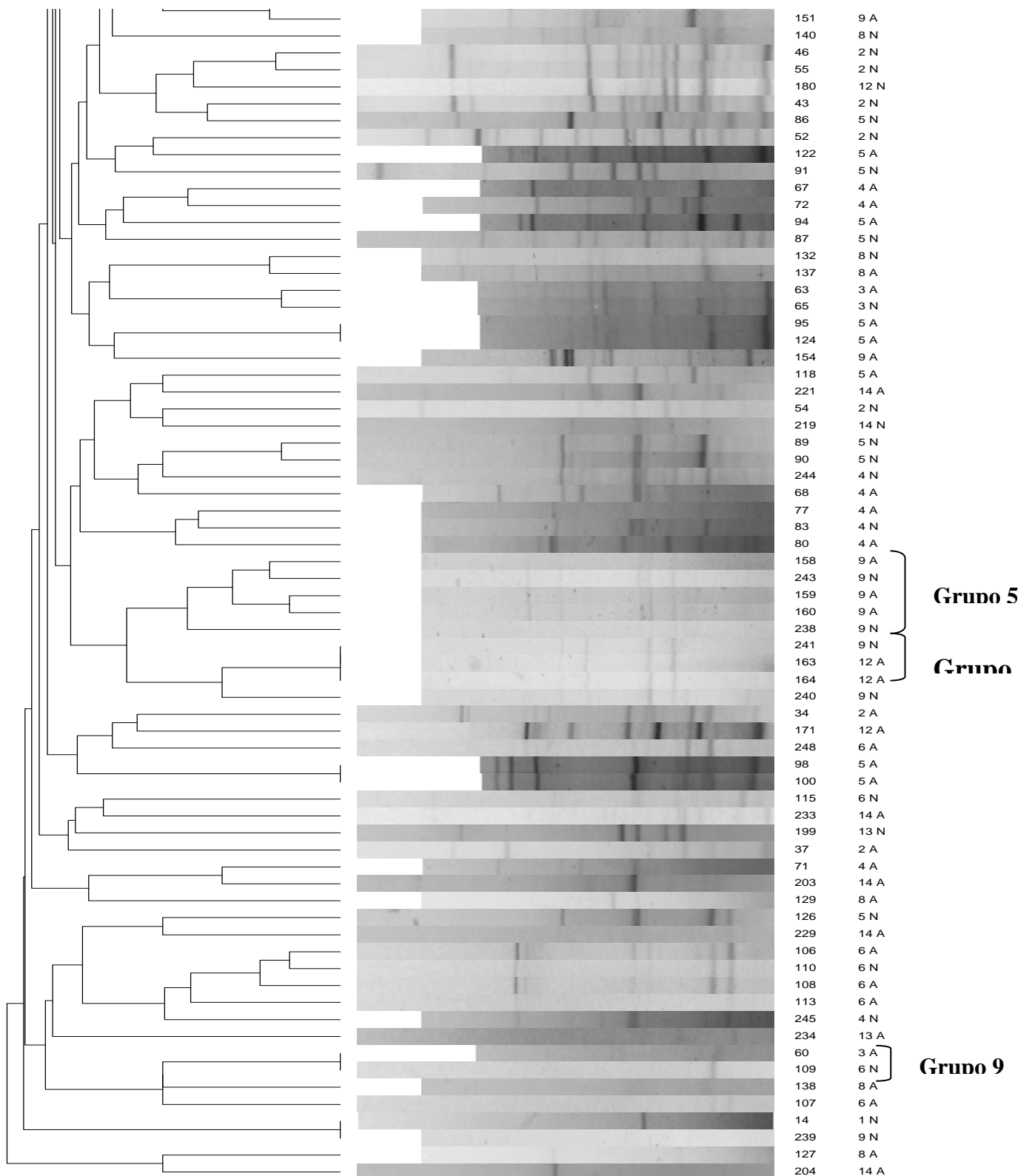


Figura 1 – Dendrograma genético obtido com os produtos de PCR adquiridos pela amplificação do DNA de 209 isolados dos nódulos de feijoeiro pela técnica do PCR com o oligonucleotídeo ERIC. Agrupamento obtido pelo algoritmo UPGMA e pelo coeficiente de Jaccard.

4.3 ANÁLISE DO PERFIL DE PCR-RFLP DO GENE QUE CODIFICA A REGIÃO 16S rRNA

A partir dos agrupamentos (“clusters”) formados pela técnica de PCR-ERIC, tomando com referência o nível de 70% de similaridade, 130 estirpes foram consideradas diferentes. Algumas dessas bactérias, porém, não amplificaram com “primers” da região 16S rRNA, portanto, 107 foram selecionadas como sendo representativas dos diversos grupos. Os DNAs dessas estirpes foram amplificados, produzindo um fragmento que corresponde a quase todo o gene que codifica a região 16S rRNA, de cerca de 1500 pb. Esses fragmentos foram submetidos à técnica de RFLP com cinco enzimas de restrição, *Cfo* I, *Hinf* I, *Msp* I, *Nde* II e *Rsa* I. Para cada enzima, foi feita a análise de todas as estirpes, em gel de eletroforese, para a avaliação do polimorfismo molecular. Como exemplo dos padrões de bandejamento obtidos, pode-se observar as Figuras 2, 3, 4, 5 e 6, com perfis obtidos para cada enzima. Grupos foram claramente formados após a restrição com cada enzima mas, para confirmar os agrupamentos, foi realizada a análise pelo método UPGMA e pelo coeficiente de Jaccard.

A seguir, cada grupo, formado com cada enzima, ficou representado por uma letra minúscula, facilitando o agrupamento. Seis estirpes consideradas padrão das espécies que nodulam o feijoeiro foram incluídas nos estudos e submetidas à técnica de PCR-RFLP para serem agrupadas com as bactérias em avaliação: *R. tropici* IIA (CFN 299), *R. tropici* IIB (CIAT 899), *R. etli* (CFN 42), *R. giardinii* (H152), *R. gallicum* (R602) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (USDA 2671). Além do agrupamento produzido para cada enzima, com um arranjo em ordem crescente, de acordo com as letras dos grupos, foi possível comparar, pela Tabela 2, as estirpes com todas as enzimas, e agrupar as que apresentaram perfis enzimáticos semelhantes.

Das cinco enzimas estudadas, nenhuma conseguiu diferenciar todas as espécies mas, com a análise conjunta de todas as enzimas, cada espécie formou um grupo único de combinação de letras. Contudo, a análise com apenas duas enzimas, *Nde* II e *Msp* I ou *Cfo* I e *Msp* I já permitiu a separação das cinco espécies. A enzima *Hinf* I produziu perfil semelhante com todas as espécies, mas diferentes para várias estirpes deste estudo. *R. tropici* IIA e IIB diferenciaram-se pela análise com *Msp* I e ambas de *R. gallicum*, com a adição da enzima *Cfo* I. A enzima *Msp* I permitiu a separação de todas as espécies, exceto *R. tropici* IIB de *R. giardinii*. De modo geral, a correlação entre perfis de ERIC-PCR e RFLP-PCR foi baixa; um exemplo disso é a combinação de perfis de PCR-RFLP característicos de *R. etli* que ocorreu em diversos grupos de ERIC-PCR, alguns apresentando similaridade genética baixa.

Essas observações indicam que a técnica de ERIC-PCR foi adequada para a caracterização das estirpes, mas não para o agrupamento em espécies. Novamente constatou-se um grau elevado de polimorfismo, pois para as estirpes em estudo, foram obtidos nove perfis distintos com a enzima *Nde* II, dez com as enzimas *Rsa* I, onze com as enzimas *Hinf* I e *Cfo* I e quatorze com a *Msp* I.

De acordo com a Tabela 2, 68,2% das estirpes analisadas apresentaram perfil semelhante à espécie *R. etli*. O isolamento de *R. etli* ocorreu independentemente do ecossistema ou da planta-isca. Essas estirpes formaram o grupo 1. Somente mais três grupos foram formados por mais de uma estirpe: o grupo 3, com as estirpes 79 e 82; as estirpes 52 e 68, formando o grupo 7 e as estirpes 168, 169 e 241, pertencentes ao grupo 9. As demais estirpes representativas de espécies de rizóbio não apresentaram perfis semelhantes aos dos isolados deste estudo, formando grupos individuais, com 32 diferentes combinações. Numa análise final de todos os perfis, foi possível totalizar, então, 36 grupos.

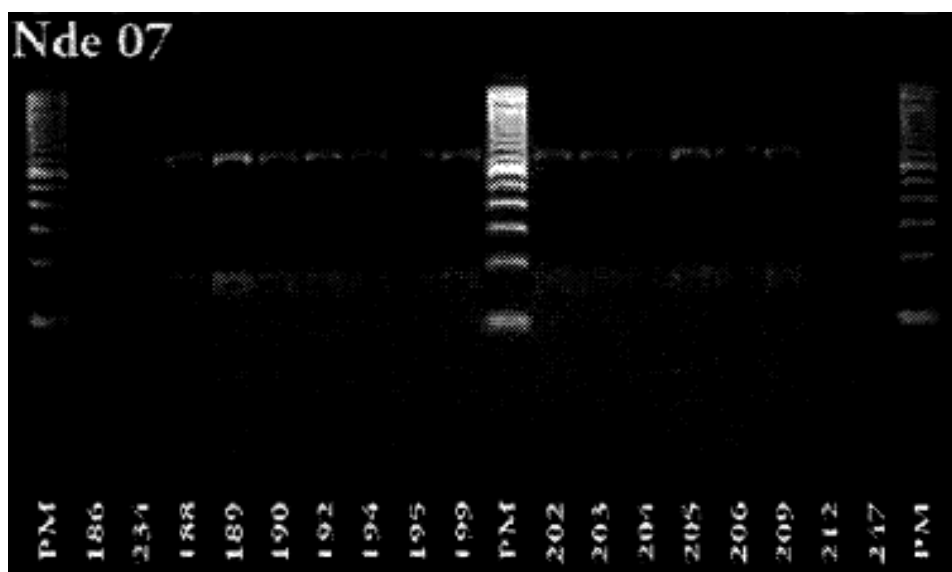


Figura 2 – Padrões de restrição do gene que codifica a região 16S rRNA obtidos pela técnica de PCR-RFLP de algumas estirpes de *Rhizobium* após digestão com a enzima *Nde* II.

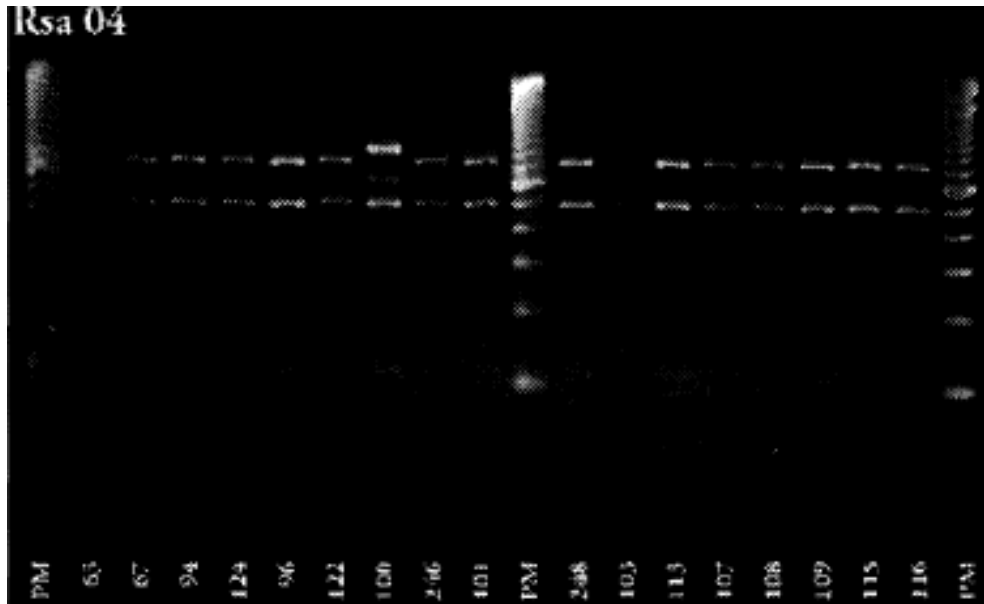


Figura 3 – Padrões de restrição do gene que codifica a região 16S rRNA obtidos pela técnica de PCR-RFLP de algumas estirpes de *Rhizobium* após digestão com a enzima *Rsa* I.

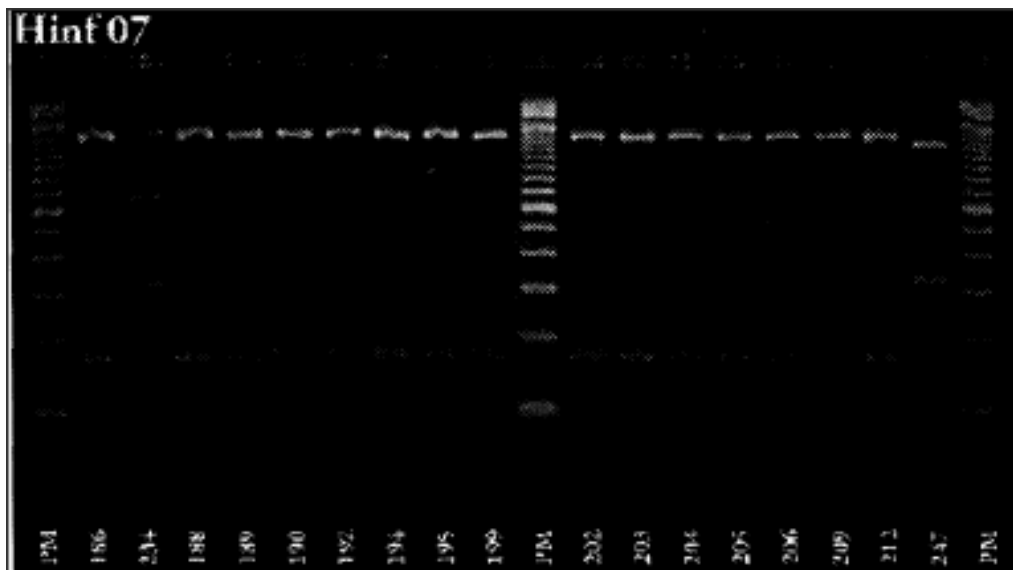


Figura 4 – Padrões de restrição do gene que codifica a região 16S rRNA obtidos pela técnica de PCR-RFLP de algumas estirpes de *Rhizobium* após digestão com a enzima *Hinf* I.

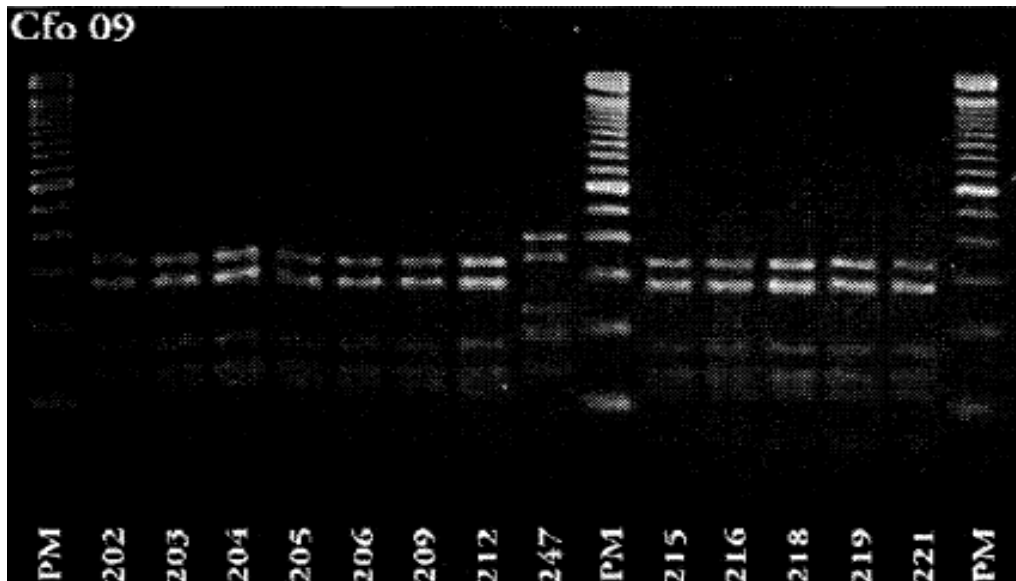


Figura 5 – Padrões de restrição do gene que codifica a região 16S rRNA obtidos pela técnica de PCR-RFLP de algumas estirpes de *Rhizobium* após digestão com a enzima *Cfo* I.

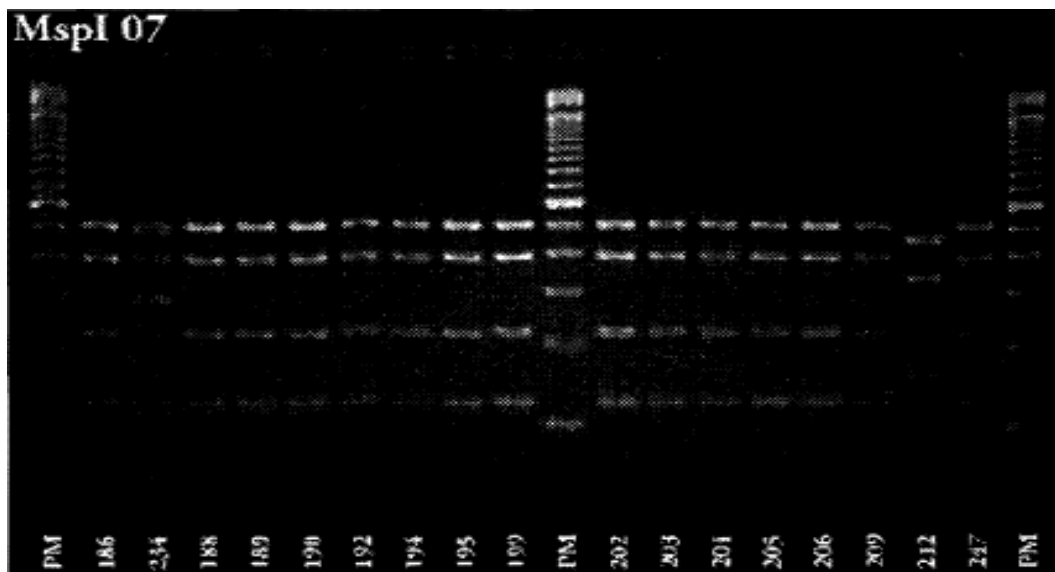


Figura 6 – Padrões de restrição do gene que codifica a região 16S rRNA obtidos pela técnica de PCR-RFLP de algumas estirpes de *Rhizobium* após digestão com a enzima *Msp* I.

Tabela 2 – Perfis de RFLP-PCR de 107 isolados de 14 solos obtidos dos estados de Pernambuco e Paraná e de estirpes representativas das espécies de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro. Os perfis foram obtidos pela amplificação da região correspondente ao 16S rRNA, seguida pelo corte com cinco enzima de restrição.

Estirpes	Enzimas de restrição				
	<i>Nde</i> II	<i>Rsa</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Cfo</i> I	<i>Msp</i> I
<i>R. etli</i> CFN 42	a	a	a	a	a
248	a	a	a	a	a
126	a	a	a	a	c
79	a	a	a	a	e
82	a	a	a	a	e
230	a	a	a	a	k
116	a	a	a	d	a
246	a	a	a	d	d
52	a	a	a	e	a
68	a	a	a	e	a
71	a	a	a	h	a
168	a	a	d	a	a
169	a	a	d	a	a
241	a	a	d	a	a
164	a	a	k	a	a
77	a	b	a	b	a
34	a	b	a	j	b
233	b	a	a	b	o
<i>R.gallicum</i> R 602	b	b	a	a	a
93	b	b	a	b	a
<i>R.tropici</i> IB CIAT 899	b	b	a	b	b
<i>R.tropici</i> IIA CFN 299	b	b	a	b	d
100	b	e	a	a	a
<i>R.leg.</i> USDA 2671	b	f	a	a	j
62	b	g	b	a	c
43	c	c	b	c	d
33	c	c	b	c	l
180	c	c	b	i	d
91	c	d	c	a	b
86	c	i	b	a	c
87	c	j	c	d	a
84	d	b	a	a	a
61	d	d	c	a	c
60	d	d	c	a	m
37	e	c	j	f	i
247	e	l	h	g	a
<i>R.giardinii</i> H 152	f	b	a	a	b
112	g	k	f	k	n
22	h	h	i	f	h
234	i	a	e	c	g
171	j	e	g	l	f

Obs. As estirpes 5, 14, 29, 31, 39, 41, 48, 51, 53, 54, 63, 69, 72, 73, 74, 75, 76, 83, 89, 90, 96, 101, 107, 108, 109, 115, 118, 122, 123, 124, 128, 129, 133, 156, 158, 160, 166, 172, 175, 177, 178, 181, 182, 183, 185, 186, 188, 189, 190, 192, 194, 195, 199, 202, 203, 204, 205, 206, 209, 212, 215, 218, 219, 221, 222, 236, 238, 239, 244 e 245 também estão presentes no primeiro agrupamento.

3.4 ANÁLISE DO SEQÜENCIAMENTO, TOTAL OU PARCIAL, DO GENE QUE CODIFICA A REGIÃO 16S RRNA.

Foi realizado o seqüenciamento total (aproximadamente 1500 pb) ou parcial (aproximadamente 600 pb) de 34 estirpes representativas dos grupos formados nas análises de ERIC-PCR e RFLP-PCR. O seqüenciamento foi realizado em um ABI 377 (Applied Biosystem) com o “kit Big Dye”. Para analisar os resultados, as estirpes seqüenciadas foram submetidas ao “GenBank” database, para buscar alinhamentos significativos. Para a análise filogenética, foi construído um dendrograma, pelo método de agrupamento UPGMA, da relação genética entre os genes 16S rRNA (Figura 7). As estirpes avaliadas tiveram suas seqüências alinhadas e comparadas com as seqüências de estirpes de rizóbio representativas de diversas espécies e gêneros de rizóbio e agrobactéria obtidos no banco de germoplasma (número de acesso entre parênteses): *R. galegae* HAMBI 540^T (Y12355); *R. huautlense* SO2^T (AFO25852.1); *Agrobacterium radiobacter* LMG 383 (AJ130719.1); *Sinorhizobium fredii* USDA 205 (M74163); *Sinorhizobium* sp. C4 (AF227753.1); *R. giardinii* bv. giardinii H152^T (U86344); *Rhizobium* sp. USDA 1920 (U89823.1); *R. etli* Olivia 4 (M55235); *R. mongolense* USDA 1877^T (U89820.1); *R. etli* CFN 42^T (U28916); *R. etli* TAL 182 (U28939); *Rhizobium* sp. OR 191 (X91211); *R. mongolense* USDA 1844 (U989117.1); *R. gallicum* bv. gallicum R602 sp^T (U86342); *Rhizobium* sp. WSM 1583 (AF279266); *R. leg.* bv. viceae ATC 10004^T (U29386); *R. leg.* bv. phaseoli ATCC 8002 (M55494); *Rhizobium* espécie genômica. Q BDV 5102 (Z94806.1); *A. tumefaciens* K-Ag-3 (D14504); *R. tropici* IIB PRF 81 (AF 260274); *R. tropici* IIB CIAT 899^T (U89832); *R. tropici* IIB LMG 9517 (X67234); *R. tropici* IIA LMG 9518 (X67233.1); *Mesorhizobium plurifarum* LMG 10056 (Y141233.1).

De 16 estirpes que apresentaram o perfil de RFLP-PCR de *R. etli*, 14 mostraram elevada semelhança genética com três estirpes usadas como referência dessa espécie. A menor similaridade genética foi constatada com as estirpes 244, semelhante em 99,6% com *Rhizobium* sp. USDA 1920, 215 e 129, que se uniram ao grupo de *R. etli* com 98,9% de similaridade. Outros isolados que diferiram, na análise por RFLP-PCR, apenas no perfil com *Msp* I (grupos 2, 3, 4), ou apenas no perfil com *Cfo* I (grupos 5 e 7), ou ainda, com os perfis de *Cfo* I e *Msp* I (grupo 6) também foram classificados como *R. etli*. No caso da enzima *Hinf* I, o grupo 10 apresentou similaridade com *R. etli*, mas o

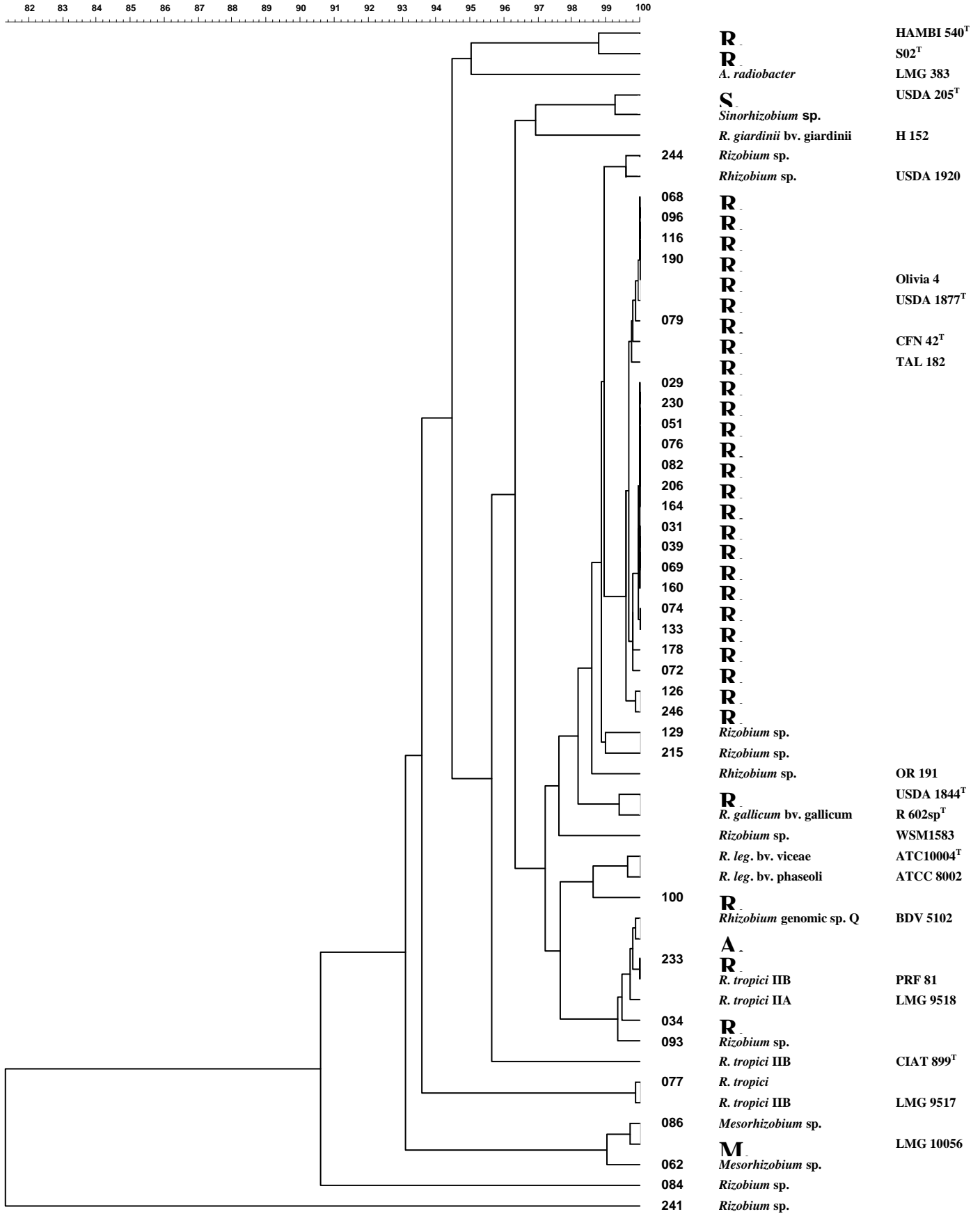


Figura 7 – Dendrograma (UPGMA) mostrando as relações genéticas entre os genes 16S rDNA de 34 isolados de nódulos de feijoeiro e de 22 estirpes de rizóbio e agrobactéria utilizadas como referência. Os números de acesso das estirpes-referências estão listadas nos Resultados

grupo 9 não. As estirpes com maior similaridade genética com *R. tropici* (grupos 12, 13 e 15), apresentaram baixa relação com os perfis de PCR-RFLP das estirpes usadas como referência para essa espécie, o mesmo acontecendo com a estirpe 100, do grupo 18, e a estirpe representativa de *R. leguminosarum*. Finalmente, em dois grupos, 20 e 25, foi constatada similaridade genética com *Mesorhizobium*.

4.3 AVALIAÇÃO DOS CARACTERES FISIOLÓGICOS E SIMBIÓTICOS DAS ESTIRPES

Para avaliar as propriedades fisiológicas das 34 bactérias que foram submetidas ao seqüenciamento, três caracterizações foram realizadas *in vitro*, cada uma repetida três vezes, para a confirmação dos dados. No teste de tolerância a altas temperaturas, no qual as bactérias foram colocadas para crescer em meio YMA e incubadas a 40°C, as estirpes 34, 39, 68, 69, 244, 84, 96, 129, 209, 215, 230 e 233 foram as que apresentaram resultados positivos, o que corresponde a 35,2% do total (Tabela 3). Quanto à capacidade de crescimento, à 28°C, em meio Luria-Bertani (LB), a porcentagem de crescimento também foi baixa, somente 44,1% do total; as estirpes que cresceram neste meio foram: 31, 34, 39, 69, 74, 76, 82, 244, 84, 96, 129, 209, 215, 230 e 233. Em relação à capacidade de sintetizar melanina, com crescimento em placas contendo o meio TYA, suplementado com tirosina e CuSO₄, das 34 estirpes seqüenciadas, somente 10 produziram melanina, representando 29,4% do total.

A avaliação da capacidade simbiótica das estirpes foi verificada pela especificidade de nodulação com o feijoeiro. As estirpes foram inoculadas em feijoeiro e em *Leucena leucocephala*, em experimento conduzido em casa de vegetação e os resultados foram avaliados quanto à presença ou ausência de nódulos. Nenhuma das estirpes estudadas, mesmo as classificadas como *R. tropici*, foram capazes de nodular leucena. Para verificar a estabilidade dos genes de nodulação, as estirpes foram reinoculadas em feijoeiro, cultivar Aporé. A instabilidade dos genes de nodulação, verificada pela perda da capacidade de nodular o feijoeiro após algumas repicagens, ocorreu independente da espécie/gênero de rizóbio, sendo verificada em *R. tropici* (estirpes 34 e 233), *R. etli* (estirpes 96, 190 e 230), *R. leguminosarum* (estirpe 100) e *Mesorhizobium* sp. (estirpes 62 e 86).

Tabela 3 – Caracterização *in vitro* (crescimento em meio YMA a 40°C, em meio LB a 28°C e produção de melanina em meio enriquecido com tirosina) e simbiótica *in vivo* (nodulação de *Leucaena leucocephala* e estabilidade genética dos genes de nodulação, avaliada pela reinoculação do feijoeiro). Os dados foram confirmados em três repetições.

Estirpe	Identificação pelo Sequenciamento	YMA	LB	Produção de Melanina	Nodulação	
					Feijão	Leucena
29	<i>R. etli</i>	-	-	+	+	-
31	<i>R. etli</i>	-	+	-	+	-
34	<i>R. tropici</i>	+	+	-	-	-
39	<i>R. etli</i>	+	+	-	+	-
51	<i>R. etli</i>	-	-	-	+	-
164	<i>R. etli</i>	-	-	+	+	-
62	<i>Mesorhizobium sp.</i>	-	-	-	-	-
68	<i>R. etli</i>	+	-	-	+	-
69	<i>R. etli</i>	+	+	+	+	-
72	<i>R. etli</i>	-	-	-	+	-
74	<i>R. etli</i>	-	+	-	+	-
76	<i>R. etli</i>	-	+	-	+	-
77	<i>R. tropici</i>	-	-	-	+	-
79	<i>R. etli</i>	-	-	+	+	-
82	<i>R. etli</i>	-	+	+	+	-
244	<i>Rhizobium sp.</i>	+	+	-	+	-
84	<i>Rhizobium sp.</i>	+	+	-	+	-
86	<i>Mesorhizobium sp.</i>	-	-	-	-	-
93	<i>R. tropici</i>	-	-	+	+	-
96	<i>R. etli</i>	+	+	+	-	-
100	<i>R. leg.</i>	-	-	-	-	-
126	<i>R. etli</i>	-	-	+	+	-
129	<i>Rhizobium sp.</i>	+	+	-	+	-
246	<i>R. etli</i>	-	-	-	+	-
116	<i>R. etli</i>	-	-	-	+	-
133	<i>R. etli</i>	-	-	-	-	-
160	<i>R. etli</i>	-	-	-	+	-
241	<i>Rhizobium sp.</i>	-	-	-	+	-
178	<i>R. etli</i>	-	-	-	+	-
190	<i>R. etli</i>	-	-	-	-	-
209	<i>R. etli</i>	+	+	+	+	-
215	<i>Rhizobium sp.</i>	+	+	+	+	-
230	<i>R. etli</i>	+	+	-	-	-
233	<i>R. tropici</i>	+	+	-	-	-



Figura 8 – Produção de melanina em colônias de rizóbio

5 DISCUSSÃO

O feijão constitui uma das principais fontes de proteína da dieta do brasileiro, sendo consumido por todas as classes de renda do país. Entretanto, o consumo *per capita* vem diminuindo (Vieira, 1988), reflexo da queda do poder aquisitivo do consumidor, do cultivo em solos marginais com baixa tecnologia e do acesso a novas alternativas de alimentação, mais rápida e rica em proteínas, que substituíram o feijão. Todos esses fatores contribuíram, decisivamente, para a queda na produtividade do feijoeiro no Brasil. Além desses, outro fator limitante à produtividade do feijoeiro é a baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo fósforo e nitrogênio, nos solos agrícolas.

A adição de nitrogênio na forma de fertilizantes é cara e, em muitos casos, ineficiente, principalmente pela perda do elemento causada por práticas culturais inadequadas. As leguminosas evoluíram, obtendo nitrogênio da simbiose formada com bactérias fixadoras de nitrogênio, os rizóbios. Essa simbiose é conhecida e explorada comercialmente há mais de cem anos, sendo a soja e os adubos verdes os exemplos de maior sucesso conhecidos. Há um descrédito crônico, porém, na capacidade do feijoeiro fixar nitrogênio atmosférico em quantidade suficiente para expressar o potencial produtivo da cultura, quando em associação com o *Rhizobium*, recomendando-se a aplicação de fertilizantes nitrogenados (Araujo, 1994).

Resultados de vários anos de pesquisa, porém, constataram que a cultura do feijoeiro pode se beneficiar com a fixação do nitrogênio (Mendes *et al.*, 1994; Peres *et al.*, 1994; Hungria *et al.*, 1997). A exemplo da cultura da soja, se o uso da inoculação do feijoeiro se tornar uma prática comum na agricultura, isso poderá representar uma economia de divisas para o País. Mesmo que a inoculação não seja suficiente para suprir todo o nitrogênio e seja necessária a realização de adubações nitrogenadas em cobertura, a eliminação ou redução da adubação no plantio já representa uma economia a ser considerada.

Para que todo o processo seja bem desenvolvido, do início da infecção até o funcionamento pleno dos nódulos, é necessária a expressão gênica coordenada do microssimbionte e da planta hospedeira (Hungria *et al.*, 1997), portanto, para garantir o sucesso da fixação é importante a escolha adequada dos parceiros simbióticos, ou seja, estirpes de bactérias mais eficientes e competitivas e genótipos de plantas que respondam ao microssimbionte.

No Brasil, na maioria dos solos onde se cultiva o feijoeiro existe uma população naturalizada de rizóbio capaz de nodular a cultura, como demonstraram diversos

levantamentos de nodulação espontânea. Recentemente, por exemplo, observou-se nodulação espontânea abundante em plantas de feijoeiro da cultivar Diamante Negro, em um campo que fora pastagem por quarenta anos antes da introdução dessa leguminosa, e na cultivar Aporé, em área de produção de feijão sob irrigação onde nunca foi feita inoculação (Araujo, 1994). O cultivo com a leguminosa hospedeira, porém, aumenta a população de rizóbio capaz de nodulá-la. Isso foi confirmado no presente trabalho, sendo possível constatar que o maior número de isolados capturados esteve muito mais relacionado ao manejo de solo, do que ao local propriamente dito. Assim, os solos que apresentaram a maior quantidade de isolados capturados foram o atualmente cultivado com feijoeiro e o cultivado com feijoeiro há três anos, em Pernambuco. De solos com outros manejos com feijoeiro, em PE e PR, além do manejo cultivado com soja/trigo, no PR, também foi possível obter vários isolados. Isso confirma a baixa especificidade do feijoeiro em relação às exigências quanto ao seu microsimbionte e demonstra as dificuldades que as novas estirpes têm que enfrentar, competindo com rizóbios nativos, ao serem introduzidas no solo, sugerindo que à inoculação também depende do histórico de cultivo da área plantada.

Para ilustrar a complexidade de se obter resposta à inoculação em solos com população estabelecida, o grupo NifTAL, no Havaí, computou resultados de experimentos de inoculação de leguminosas, realizados em diversos anos e em diversas localidades naquele Estado. De acordo com os dados obtidos, a resposta das leguminosas à inoculação variou com o local, a espécie e o número de células de rizóbio, bem como com o teor de N no solo (Thies *et al.*, 1991 b). No caso do feijoeiro, um dos principais fatores que afetam sua resposta à inoculação são, com relação às plantas, a baixa capacidade de fixar N_2 e a alta suscetibilidade a estresses ambientais, além da boa resposta à adubação nitrogenada, o que prejudica a ocupação das raízes pelo rizóbio e, com relação ao microsimbionte, a baixa capacidade competitiva contra as estirpes nativas, que são pouco eficientes no processo de FBN (Hungria *et al.*, 1997).

É muito difícil encontrar plantas de feijão sem nódulos, portanto, o caráter de promiscuidade nodular do feijoeiro é uma barreira a ser transposta para que a inoculação tenha sucesso. Desta forma, é preciso que, num primeiro passo, estirpes mais eficientes sejam buscadas, realizando um levantamento qualitativo e quantitativo da população naturalizada de rizóbios. Conseqüentemente, para que as respostas à inoculação sejam consistentes, é essencial conhecer a biodiversidade das populações de rizóbio nas principais regiões produtoras e sua relação com a resposta à inoculação.

Até 1984, a classificação taxonômica do rizóbio do feijoeiro estava definida em uma única espécie, *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli (Jordan, 1984). Desde então, com o avanço nas técnicas de biologia molecular, foi possível constatar uma grande diversidade genética entre os microssimbiontes, com a definição de novas espécies e biovars: *R. tropici* tipo IIA e tipo IIB (Martínez-Romero *et al.*, 1991), *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993), *R. gallicum* bv. gallicum e *R. giardinii* bv. giardinii (Amarger *et al.*, 1997). A designação de biovars é referente aos plasmídios simbióticos e, na espécie *R. etli*, inicialmente foram propostos dois biovars, phaseoli e viciae (Segovia *et al.*, 1993) mas, pelo número pequeno de isolados de viceae analisados, o subcomitê de taxonomia indeferiu os biovars (Martínez-Romero; Jarvis, 1993). Recentemente, porém, um novo biovar para *R. etli* foi definido, mimosae (Wang *et al.*, 1999) e, portanto, a espécie deve apresentar, agora, dois biovars.

No Brasil, para o uso de inoculantes comerciais na cultura do feijoeiro são recomendadas, atualmente, duas estirpes, a SEMIA 4077 (= CIAT 899) e a SEMIA 4080 (=PRF 81), esta última isolada de um solo do Paraná e recomendada desde 1998, tendo comprovado alta capacidade de fixação de N₂ em diversos ensaios conduzidos no Brasil (Hungria *et al.*, 1999). A SEMIA 4077 é a estirpe padrão da espécie *R. tropici* e pertence ao tipo IIB (Martínez-Romero *et al.*, 1991) e a SEMIA 4080 apresenta propriedades intermediárias entre os tipos IIA e IIB (Hungria *et al.*, 1999). Existem, ainda, diversas estirpes sem posição taxonômica definida, podendo representar novas espécies (Eardly *et al.*, 1995). Portanto, para conhecer melhor a diversidade da população de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro no Brasil, este estudo caracterizou isolados provenientes de dois ecossistemas distintos.

O conhecimento da biodiversidade foi avaliado pela variabilidade no DNA cromossômico, buscando-se a posição taxonômica de cada isolado. Para isso, foram considerados alguns parâmetros genéticos através do uso de métodos de biologia molecular: amplificação do DNA pela reação de PCR (polymerase chain reaction) com o oligonucleotídeo (“primer”) específico ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Concensus); análise do fragmento 16S rRNA pela técnica de PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) e seqüenciamento parcial ou total da região genômica do 16S rRNA.

Vários são os relatos sobre a utilização da tecnologia da reação de PCR nos estudos de ecologia, genética e taxonomia de rizóbio (po exemplo, de Bruijn, 1992; Judd *et al.*, 1993; Laguerre *et al.*, 1997; Hungria *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 1999). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a torna particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo.

Através da análise do dendrograma com perfis de DNA obtidos por PCR-ERIC e agrupados utilizando o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard, foi evidente o grau elevado de diversidade genética entre os isolados, com 80,8% representando estirpes únicas. Alguns rizóbios do mesmo solo, porém, apresentando maior similaridade genética, formaram cinco grandes grupos.

Uma outra técnica que vem sendo usada na investigação das relações filogenéticas de fungos e bactérias, a nível de espécie, variedades e formas específicas, é a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Esta técnica utiliza enzimas de restrição para fragmentar segmentos específicos do DNA em diferentes comprimentos, evidenciando o polimorfismo no comprimento dos fragmentos obtidos. Para a identificação desse polimorfismo, é necessário que as seqüências de nucleotídeos, nas fitas de DNA dos organismos, sejam distintas (Yamaoka-Yano; Valarini, 1998).

A região 16S rRNA é considerada uma das regiões mais conservadas do genoma bacteriano. Ao mesmo tempo, este fragmento é suficientemente variável e com quantidades de informações capaz de revelar, claramente, as relações filogenéticas entre às espécies, inclusive entre rizóbios e agrobactérias (Willems; Collins, 1993). É, portanto, uma técnica adequada para realizar estudos de taxonomia.

Amarger *et al.* (1994) avaliaram a ocorrência de *Rhizobium* nodulando feijão em quatro diferentes regiões da França. Características de crescimento e perfil plasmidial foram usadas como uma primeira e rápida seleção dos isolados. Uma amostra representativa foi, depois, identificada, utilizando-se características simbióticas e análises de RFLP dos fragmentos de 16S rRNA amplificados por PCR, um método que permite diferenciação entre espécies de *Rhizobium*. Com base nas características simbióticas e morfológicas, bem como no polimorfismo dos genes 16S rRNA, esses autores conseguiram distinguir duas espécies, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. tropici*. Em estudos de taxonomia de rizóbio, Terefework *et al.* (1998) e Sessitsch *et al.* (1997) também se utilizaram desta técnica.

Neste estudo, através da reação de PCR associada à metodologia de RFLP com ampliações do gene que codifica a região 16S rRNA foram observadas 36 diferentes combinações de perfis. Novamente constatou-se um grau elevado de polimorfismo pois, do total de estirpes analisadas por essa técnica, 68,2% apresentaram perfil semelhante à espécie *R. etli* e somente mais três grupos foram formados por mais de uma estirpe, o restante, inclusive as estirpes representativas, não apresentaram perfis semelhantes a nenhum dos isolados em estudo.

Para confirmar as relações filogenéticas, a nível de espécie, apresentadas na Tabela 2, as estirpes investigadas foram submetidas à análise do seqüenciamento parcial ou total da região 16S rRNA. Esta técnica permite que se conheçam todas as bases presentes nesta região, bem como em que seqüência elas se dispõem. Então, cada estirpe é submetida ao “GeneBank database”, para que se busque um alinhamento significativo com outras espécies já identificadas, sendo posteriormente comparadas pelo método UPGMA e pelo coeficiente de Jaccard. Pela Figura 7 foi possível observar que, das 34 estirpes investigadas por essa técnica, 22% apresentaram alta similaridade com *R. etli* e *R. mongolense* e as estirpes 241, 129 e 215, identificadas como *Rhizobium* sp., foram as que apresentaram o maior grau de dissimilaridade.

A técnica de seqüenciamento também foi utilizada por Amarger *et al.* (1997), que ao analisarem 31 estirpes de rizóbio isoladas de feijão, obtiveram a identificação de duas novas espécies noduladoras de feijão, *R. gallicum* sp. nov. e *R. giardinii* sp. nov. Segundo *et al.* (1999) também sequenciaram o 16S rRNA ao caracterizar os grupos simbióticos de *Sinorhizobium meliloti* e *Rhizobium* sp. nodulando alfafa em solos da Argentina e do Uruguai. Em estudos filogenéticos de *Rhizobium galegae* e outros rizóbios, além de agrobactérias, Terefework *et al.* (1998) também aplicaram o método do seqüenciamento.

Testes fisiológicos e simbióticos, evidenciando algumas características das espécies de rizóbio do feijoeiro, também foram conduzidos com as estirpes deste estudo. Quanto ao teste de crescimento a 40°C, do total de estirpes testadas, 35% foram capazes de crescer nessa temperatura. Além da espécie *R. tropici*, indicada como a espécie mais tolerante a altas temperaturas, cresceram também a 40°C as espécies *R. etli* e *Rhizobium* sp., demonstrando que a reação a um choque térmico é típica da cada estirpe e não da espécie, conforme sugerido anteriormente por Pinto *et al.* (1995).

Somente *R. tropici* IIB cresce em meio LB (Martínez-Romero *et al.*, 1991), porém, segundo os dados da Tabela 3, cresceram também nesse meio o *Rhizobium* sp. e *R. etli*. Assim, é possível supor que pode ter ocorrido uma reiteração gênica nas duas últimas espécies, adquirindo, então, os genes que conferem tolerância a altas temperaturas, ou ainda, que essa não é uma característica exclusiva da espécie *R. tropici*. Apresentaram produção de melanina as espécies *R. etli* e *Rhizobium* sp. Embora essa característica pudesse ser utilizada como um marcador biológico, Martínez-Romero *et al.* (1991) não encontraram relação entre produção de melanina e espécies de rizóbio do feijoeiro.

A instabilidade genética de rizóbio tem sido, freqüentemente, relatada. Isso se deve aos genes de nodulação e fixação, presentes no DNA plasmidial, que podem ser facilmente perdidos ou transferidos para outras bactérias. As reiteraões ocorrem menos freqüentemente em *R. tropici*, contudo, neste trabalho, foi constatada perda da capacidade de nodulação nas espécies *R. etli*, *R. tropici*, *R. leguminosarum* e *Mesorhizobium* sp.

Neste trabalho constatou-se, portanto, variabilidade genética e simbiótica elevada entre isolados de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro e provenientes de dois ecossistemas distintos. A variabilidade ocorreu independente do ecossistema ou da cultivar de feijoeiro utilizada como planta-isca. Estirpes com grau elevado de diversidade genética, em relação às espécies já descritas, foram isoladas e caracterizadas, podendo representar novas espécies. Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram a importância de concentrar esforços para conhecer melhor a diversidade de rizóbio nos solos brasileiros.

6 CONCLUSÕES

- De modo geral, constatou-se a existência de uma população naturalizada elevada de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro, com variações relacionadas ao histórico de cultivo das áreas.
- Através da análise PCR-ERIC, foi evidente o grau elevado de diversidade genética entre 209 isolados, com 80,8% representando estirpes únicas.
- Pela técnica de PCR-RFLP com cinco enzimas de restrição, foi possível observar, entre 107 estirpes, 36 diferentes combinações de perfis, com 68,2% apresentando perfil semelhante à espécie *R. etli*.
- Das 36 estirpes submetidas à análise do seqüenciamento, parcial ou total, da região do DNA correspondente ao 16S rDNA, 22 apresentaram alta similaridade com *R. etli* e *R. mongolense* e algumas delas, denominadas *Rhizobium* sp., apresentaram baixo nível de similaridade com as espécies de rizóbio descritas.
- Foi constatada a instabilidade genética dos genes da nodulação do rizóbio, pois, das 34 estirpes seqüenciadas, 26,4% perderam a capacidade de nodular raízes de feijoeiro.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, O.M.; LOPEZ, M.V.; RICCILLO, P.M.; GONZALEZ, R.A.; PAGANO, M.; GRASSO, D.H.; PUHLER, A.; FAVELUKES, G. Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with beans from the Southern Andes in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.3520-3524, 1998.
- AMARAL, E.S.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Symbiotic performance and survival of plasmid-cured derivatives of the rhizobial strain Br 855 in soil under heat stress. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts**. S.l.: Embrapa-CNPBS, 1995. p.104-105.
- AMARGER, N.; MAZURIER, S.I.; GENIAUX, E.; LAGUERRE, G. Indigenous populations of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris*. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., eds. **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.593.
- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M.R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.147-156, 1994.
- AMARGER, N.; GENIAUX, E.; LAGUERRE, G. 1995. *Rhizobium* associated with field-grown *Phaseolus vulgaris*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, Santos. **Abstracts**. São Paulo: SBM, 1995. Abst. P2-14.1.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Dijon Cedex, France, v.47, n.4, 1997, p.996-1006.
- ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S., eds. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA- SPI, 1994, p.63-94.
- ARAÚJO, A.P.; TEIXEIRA, M.G.; ALMEIDA, D.L. Phosphorus efficiency of wild and cultivated genotypes of common bean under biological nitrogen fixation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS - THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts**. Sl.: Embrapa-CNPBS, 1995, p.141-142.

- ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M., eds. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.91-120.
- AYANANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYMON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.4016-4021, 1995.
- BREWIN, N.J. Development of the legume root nodule. **Annual Review of Cell Biology**, Palo Alto, v.7, p.191-226, 1991.
- BROCKWELL, J. Plant- infection counts of rhizobia in soils. In: VINCENT, J. M., ed. **Nitrogen fixation in legumes**. New York: Academic Press, 1982, p. 41-58.
- BROCKWELL, J.; HERRIDGE, D.F.; MORTHORPE, L.J.; ROUGHLEY, R.J. Numerical effects of *Rhizobium* population on legume symbiosis. In: BECK, D.P.; MATERON, L.A., eds. **Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture**. Aleppo, Syria: ICARDA, 1988, p.179-193.
- BROM, S.; MARTÍNEZ, E.; D'ÁVILA, G.; PALACIOS, R. Narrow and broad-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1280-1283, 1988.
- BROM, S.; SANTOS, A.G.D.L.; STEPKOWSKY, T.; FLORES, M.; D'ÁVILA, G.; ROMERO, D.; PALACIOS, R. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, p.5183-5189, 1992.
- BROUGHTON, W.J.; DILLWORTH, M.J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Biochemistry Journal**. v. 80, p.125-1075, 1971.
- CHAN, C.L.; LUMPKIN, T.A.; ROOT, C.S. Characterization of *Bradyrhizobium* sp. (*Astragalus sinicus* L.) using serological agglutination, intrinsic antibiotic resistance, plasmid visualization and field performance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.109, p.85-91, 1988.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.393-397, 1988.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura tropical). **Research constraints provisionally identified by CIAT**. In: WORKSHOP ON ADVANCED *Phaseolus* BEANS RESEARCH NETWORK, 1990, Cali. Cali: CIAT, 1990. 30p. (impresso).

- COSTA, R.C.L.; LOPES, N.F.; OLIVA, M.A.; BARROS, N.F. Crescimento e conversão da energia solar em feijão submetido a três doses de nitrogênio e dois regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.24, p.1439-1450, 1989.
- CROW, V.L.; JARVIS, B.D.W.; GREENWOOD, R.M. Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing *Rhizobium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.31, p.152-172, 1981.
- CUBO, M.T.; BUENDIA-CLAVERIA, A.M.; BERINGER, J.E.; RUIZ-SAINZ, J.E. Malanin production by *Rhizobium* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1821-1817, 1988.
- de BRUIJN, F. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and entero-bacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2180-2187, 1992.
- DENNET, M.D. The tropical environment. In: GOLDSWORTHY, R.P.; FISHER, N.M., eds. **The physiology of tropical field crops**. New York: Wiley, 1984, p.1-38.
- DÖBEREINER, J. Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in acid soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.24, p.153-166, 1966.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov, a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, p.89-98, 1988.
- DUPUY, N.C.; DREYFUS, B.L. *Bradyrhizobium* populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2415-2419, 1992.
- DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L. BODDEY, R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N₂ fixation using ¹⁵N. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.88, p.333-343, 1985.
- EARDLY, B.D.; MATERON, L.A.; SMITH, N.H.; JOHNSON, D.A.; RUMBAUGH, M.D.; SELANDER, R.K. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.187-194, 1990.

- EARDLY, B.D.; WANG, F.S.; WHITTAM, T.S.; SELANDER, R.K. Species limits in *Rhizobium* population that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.507-512, 1995.
- EARDLY, B.D.; YOUNG, J. P. W.; SELANDER, R. K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1809-1815, 1992.
- FERRAZ, S.M.G **Eficiencia da fixacao biológica de nitrogenio em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) quando consorciado com milho (*Zea mays* L.)**. Piracicaba: ESALQ, 1982. 55p. (Dissertação de Mestrado).
- FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J.J. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium*-feijão e influência de diferentes nutrientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.2, p.467-474, 1967.
- FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J.J. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do nitrogênio por duas variedades de *Phaseolus vulgaris*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.3, p.223-227, 1968.
- FRANSSSEN, H.J.; VIJN, I.; YANG, W.C.; BISSELING, T. Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.19, p.89-107, 1992.
- FREMONT, M.; PRIN, Y.; CHAUVIERE, M.; DIEM, H.G.; PWEE, K.H.; TAN, T.K. A comparison of *Bradyrhizobium* strains using molecular, cultural and field studies. **Plant Science**, Limerick, v.141, p.81-91, 1999.
- FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L., eds., **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, p.205-225.
- GENIAUX, E.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ, E. Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v.45, p.392-394, 1995.
- GILSON, E.; CLEMENT, J.M.; BRUTING, D.; HOFNUNG, M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **EMBO Journal**, Oxford, v.3, p.1417-1421, 1984.
- GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.4, p.93-112, 1981.

- GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERREY, M.L.; CONROY, M.J.; HAMMER, B.E.; MARTÍNEZ, E.; AARONS, S. R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.40, p.198-207, 1994.
- GRAHAM, P.H.; ROSAS, J.C. Growth and developmental of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.88, p.503-508, 1977.
- HARDARSON, G.; BLISS, F.A.; CIGALES-RIVERO, M.R.; HENSON, R.A.; KIPENOLT, J.A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PEÑA-CABRIALES, J.J.; PEREIRA, P.A.A.; SANABRIA, C.A.; TSAI, S.M. Genotypic variation in biological nitrogens fixation by common bean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.59-70, 1993.
- HARRISON, P.; MYTTON, L.R.; SKØT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.1009-1015, 1992.
- HIGGINS, C. F.; McLAREN, R. S.; NEWBURY, S. F. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: Evolution by gene conversion? A review. **Gene**, Amsterdam, v.72, p.3-14, 1988.
- HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.5, p.825-834, 1991.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; MEGÍAS, M. Characterization of new efficient and competitive strains for the bean crop (*Phaseolus vulgaris* L.) crop in Brazil. In: MARTÍNEZ, E.; HERNÁNDEZ, G., eds. **Highlights of Nitrogen fixation research**. New York: Plenum Press, 1999, p.251-254.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; SANTOS, J.C.F. Ecologia microbiana em solos sob cultivos na Região Sul do Brasil. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S., eds. **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, 1995. p.234-270.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. Relato da VI reunião de laboratórios para recomendação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S, eds. **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/Embrapa-CNPSO, 1995, p.476-489.

- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A.; SPRENT, J.I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.149, p.103-109, 1993.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A. Effects of high temperatures on nodulation and N₂ fixation in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.149, p.95-102, 1993.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A.; SPRENT, J.I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.149, p.95-102, 1993. HUNGRIA, M.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p.751-758, 1991.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Cultivar and *Rhizobium* strain effects on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.103, p.111-121, 1987a.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Efeito da manipulação de fotossintatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, p.9-24, 1986a.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Ontogenia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, p.715-730, 1986b.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Partitioning of nitrogen from biological fixation and fertilizer in *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.69, p.55-63, 1987b.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I-Atividade da nitrogenase, nitrato redutase e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.9, p.193-200, 1985a.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro; II-Absorção e translocação do N mineral e do N₂ fixado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.9, p.202-209, 1985b.
- HUNGRIA, M.; RUSCHEL, A.P. Acetylene reduction, hydrogen evolution and nodule respiration in *Phaseolus vulgaris*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.7, p.351-358, 1989.
- HUNGRIA, M.; RUSCHEL, A.P. Atividade da nitrogenase e evolução do hidrogênio pelos nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.11, p.269-274, 1987.

- HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.819-830, 1997.
- HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J.; DOBEREINER, J. Efeito do sombreamento na fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.20, p.1143-1156, 1985c.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAÚJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, p.189-294, 1997.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M., eds. **Microorganismo de importância agrícola**. EMBRAPA-SPI, Brasília, DF, 1994, p.9-90.
- JACOB-NETO, J.; FRANCO, A.A. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* L., Merrill): response to molybdenum in tropical soils. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts**. S.l.: Embrapa-CNPBS, 1995. p.156-157.
- JACOB-NETO, J.; FRANCO, A.A. Determinação do nível crítico de Mo nos nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Turrialba**, Costa Rica, v.39, p.215-223, 1989.
- JARDIM FREIRE, J.R.; VIDOR, C. Fatores limitantes dos solos ácidos na simbiose de *Rhizobium* e as leguminosas. In: DÖBEREINER, J.; EIRA, P.A.; FRANCO, A.A.; CAMPELO, A.B., eds. **As leguminosas na agricultura tropical**. SEMINÁRIO SOBRE METODOLOGIA E PLANEJAMENTO DE PESQUISA COM LEGUMINOSAS TROPICAIS, 1990. Campo Grande. Anais. Campo Grande: IPEACS, 1971. p.211-247.
- JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London: Williams; Wilkins Co., 1984. p.235-244.
- JUDD, A.K.; SCHNEIDER, M.; SADOWSKY, M.J.; DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* Serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1702-1708, 1993.
- KIJNE, J.W. The *Rhizobium* infection process. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J, eds. **Biological nitrogen fixation**, New York: Champman and Hall, 1992. p.349-398.

- LAFAY, B.; BURDON, J.J. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in southeastern Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, 3989-3997, 1998.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.56-63, 1994.
- LAGUERRE, G.; FERNANDEZ, M.P.; EDEL, V.; NORMAND, P.; AMARGER, N. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus Vulgaris* L. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.761-767, 1993.
- LAGUERRE, G.; van BERKUM, P.; AMARGER, N.; PREVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.4748-4758, 1997.
- LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I.; MENEZES, E.W. de. Qualidade nutricional. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J. de O. eds., **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996, p.23-56.
- LAJUDIE, P. DE; LAURENTE-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLIMS, M.D.; KERSTERN, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixation bacteria nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.58, 1277-1290, 1998.
- LAJUDIE, P. DE; LORTET, G.; NEYRA, M.; BADJI, S.; NDOYE, I.; BOIVIN, C.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. Etude taxonomique des *Rhizobium* sp. d'Acacia et des *Sesbania*. In: **Interactions Plantes Microorganismes**. IFS/ORSTOM, 1992. p.238-245.
- LINDSTRÖM, K.; van BERKUM, P.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ, E.; NOVIKOVA, N.; JARVIS, B. Report from the roundtable on rhizobium taxonomy. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E., EDS. **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, p.807-810.
- LOUREIRO, M.F. Caracterização das estirpes por técnicas moleculares: o uso dos métodos de PCR e RAPD. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S., eds. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.183-199.

- MANIATIS, T.; SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning. A laboratory Manual**. Col Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- MARIOT, E.J. Ecofisiologia do feijoeiro. In: **O feijão no Paraná**. Londrina: IAPAR, 1989, p.25-41. (IAPAR. Circular, 63).
- MARTÍNEZ, E.; PARDO, M.A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M.A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, London, v.131, p.1779-1786, 1985.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.11-20, 1994.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; JARVIS, B.D.W. International committee on systematic bacteriology, subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*, minutes of the meeting. **International journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.622, 1993.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; ROSENBLUETH, M. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.2384-2388, 1990.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.
- MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R.; VARGAS, M.A.T. Eficiência fixadora de estirpes de rizóbio em duas cultivares de feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p.1-5, 1994.
- MERCANTE, F.M. **Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro**. Itaguaí: UFRRJ, 1993. 149p. (Tese de mestrado).
- MINCHIN, F.R.; MINQUEZ, M.I.; SHEEHY, J.E.; WITTY, J.F.; SKØT, L. Relationships between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.37, p.1103-1113, 1986.

- MUNNS, D.N.; FRANCO, A.A. Soil constraints to legume production. In: GRAHAM, P.H.; HARRIS, S.C, eds. **Biological nitrogen fixation for tropical agriculture**. Cali: CIAT, 1982. p.133-152.
- NICOLOSO, F.T.; SANTOS, O.S. Efeitos do nitrogênio mineral, molibdênio e inoculação com *Rhizobium* no feijoeiro comum. **Revista Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v.20, p.23-35, 1990.
- NOEL, K.D.; SÁNCHEZ, F.; FERNÁNDEZ, L.; LEEMANS, J.; CEVALLOS, M.A. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.158, p.148-155, 1984.
- NOTI, J.D.; DUDAS, B.; SZALAY, A.A. Isolation and characterization of nodulation genes from *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) strain IRC78. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.82, p.7379-7383, 1985.
- NOUR, S.M.; CLEYET-MAREL, J.C.; BECK, D.; EFFOSSE, A.; FERNANDES, M.P. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.40, p.345-354, 1994.
- OLIVEIRA, I.P.; ARAUJO, R.S.; DUTRA, L.G. Nutrição mineral e fixação biológica do nitrogênio. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J. de O., eds. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, p.771-786, 1996.
- PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2279-2285, 1996.
- PEÑA-CABRIALES, J.J.; CASTELLANOS, J.Z. Effects of water stress on N₂ fixation and grain yield of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.151-155, 1993.
- PERES, J.R.R.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C.; VARGAS, M.A.T. Efeito da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada em sete cultivares de feijão em solos de Cerrados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p.1-6, 1994.
- PIÑERO, D.; MARTÍNEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.2825-2832, 1988.

- PINTO, P.P.; PAIVA, E.; SELDIN, L.; SÁ, N.M. Effects of high temperature on survival and relative performance of bean nodulating *Rhizobium* strains. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS- THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts**. s.l.: Embrapa- CNPBS, 1995. P.170-171.
- QUINTO, C.; FLORES, M.; LEEMANS, J.; CEVALLOS, M. A.; PARDO, M. A.; AZPIROZ, R.; GIRARD, M. L.; CALVA, E.; PALACIOS, R. Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.82, p.1170-1174, 1985.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; RUÍZ-SAÍNZ, J.E.; BUENDÍA-CLAVERÍA, A.; SANTAMARIA, C.; BALATTI, P.A.; KRISHNAN, H.B.; PUEPPKE, S.G. Characterization of fast-growing rhizobia from nodulated soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. in Vietnam. **Systematic and Applied Microbiology**, v.19, p.240-248, 1996.
- ROMERO, D.; BROM, S.; MARTÍNEZ-SALAZAR, J.; GIRARD, M.L.; PALACIOS, R.; DÁVILA, G. Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.2435-2441, 1991.
- ROMERO, D.; MARTÍNEZ-SALAZAR, J.; GIRARD, M.L.; BROM, S.; DÁVILA, G.; PALACIOS, R.; FLORES, M.; RODRIGUEZ, C. Discrete amplifiable regions (amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN 42. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, p.973-980, 1995.
- ROMERO, D.; SINGLETON, P.W.; SEGOVIA, L.; MORETT, E.; BOHLOOL, B.B.; PALACIOS, R.; DÁVILA, G. Effect of naturally occurring *nif* reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.848-850, 1988.
- RUSCHEL, A.P.; ALVAHYDO, R.; BARBOSA, I.; SAMPAIO, M. Influência do excesso de alumínio no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.3, p.229-233, 1968.
- SÁ, N.M.H. de; SILVA, K.L. da; SELDIN, L.; VASCONCELOS, M.J.V.; PAIVA, E. Genomic heterogeneity within bean nodulating *Rhizobium* strains isolated from cerrado soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.1011-1014, 1997.
- SAANO, A.; LINDSTRÖM, K. Detection of rhizobia by DNA-DNA-hybridization from soil samples: problems and perspectives. **Symbiosis**, Balaban/Rehovot, v.61, p.61-73, 1990.

- SADOWSKY, M.J.; MOAWAD, H.A. The use rep-PCR DNA fingerprinting to examine competition for nodulation among genetically-related *Bradyrhizobium japonicum*. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, V.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation: Fundamental and applications**. Dordrecht, Kluwe, 1995, p.673.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SAITO, S.M.T. **Relações entre fixação de $^{15}\text{N}_2$, evolução de H_2 e redução do C_2H_2 em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Piracicaba: ESALQ, 1978. 98p. (Tese de doutorado).
- SAITO, S.M.T.; NAZARETH, M.; MONTANHEIRO, S.; VICTORIA, R.C.; REICHARDT, K. The effects of N fertilizer on growth of *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.103, p.87-93, 1984.
- SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian Cerrados Region. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.30, p.261-272, 1999.
- SEGOVIA, L.; PIÑERO, D.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.426-433, 1991
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.374-377, 1993.
- SEGUNDO, E.; MARTINEZ-ABARCA, F.; DILLEWIJN, P. Van; FERNANDEZ-LOPEZ, M.; LAGARES, A.; MARTINEZ-DRETS, G.; NIEHAUS, K.; PUHLER, A.; TORO, N.; van DILLEWIJN, P. Characterisation of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v.28, p.169-176, 1999.
- SESSITSCH, A.; HARDARSON, G.; AKKERMANS, ADL; Vos-WM-de; Characterization of *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. in an Austrian soil. **Molecular Ecology**, Seibersdorf, v.6, p.601-608, 1997.
- SHARPLES, G.J.; LOYD, R.G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromossomes. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6503-6508, 1990.

- SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**. Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.
- STERN, M.J.; AMES, G.F.L.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C.; HIGGINS, C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: A major component of the bacterial genome. **Cell**, Cambridge, v.37, p.1015-1026, 1984.
- STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. de O.; MERCANTE, F.M.; RUMJANEK, N.G.; FRANCO, A.A. Genotypic diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts**. S.l.: Embrapa-CNPBS, 1995. p.185-186.
- SUTTON, W.D. Nodule development and senescence. In: BROUGHTON, W.J, ed., **Nitrogen fixation**. Oxford: Clarendon Press, 1983. p.144-212.
- TEIXEIRA, S.M.; ROCHA, L.S. de A. Análise socio-econômica da produção. In: ZIMMERMANN, M.J. de O.; ROCHA, M.; YAMADA, T., eds. **Cultura do feijoeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS, 1988. p.37-56.
- TEREFEWOR, Z.; NICK, G.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.48, p.349-356, 1998.
- THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n. 1, p.19-28. 1991a.
- THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Modeling symbiotic performance of introduced rhizobia in the field by use of indices of indigenous population size and nitrogen status of the soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.1, p.29-37, 1991b.
- van BERKUM, P.; TULLY, R.E.; KEISTER, D.L. Nonpigmented and bacteriochlorophyll II - containing bradyrhizobia isolated from *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.623-629, 1995.
- van BERKUN, P.; NAVARRO, R.B.; VARGAS, A.A.T. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup^+) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.554-561, 1994.

- VARGAS, A.A.T.; ATHAYDE, J.T.; GRAHAM, P. Métodos de inoculação do feijoeiro com *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.21, p.5-10, 1990.
- VARGAS, A.A.T.; GRAHAM, P.H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.117, p.197-200, 1989.
- VARGAS, A.A.T.; SILVEIRA, J.S.M.; ATHAYDE, J.T.; ATHAYDE, A.; PACOVA, B.E.V. Comparação entre genótipos de feijão quanto à capacidade nodulante e à produtividade com inoculação com rizóbios e/ou adubação de N mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.15, p.267-272, 1991.
- VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 524p, 1997.
- VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C.; PERES, J.R.R. **Fixação biológica de nitrogênio em solos de Cerrados**. Brasília: Embrapa-CPAC/SPI, 1994. 83p.
- VELAZQUEZ, Y. A.; KLUSON, R. A.; SCRÖDER, E. C. *Rhizobium* inoculation of *Phaseolus vulgaris* in Lajas, Puerto Rico. **Journal of Agriculture of University of Puerto Rico**, Rio Piedras, v. 72, p.427-436, 1988.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v.19, p.6823-6831, 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, New York, v.5, p.25-40, 1994.
- VESSEY, J.K.; WATERER, J. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.84, p.171-176, 1992.
- VIEIRA, C. Perspectiva da cultura do feijão e de outras leguminosas de grãos no país e no mundo. In: ZIMMERMANN, M.J. de O.; ROCHA, M.; YAMADA, T., ed. **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988, p.3-19.

- VIEIRA, R.F.; CARDOSO, E.J.B.N.; VIEIRA, C.; CASSINI, S.T.A. Foliar application of molybdenum in common beans. I. Nitrogenase and nitrate reductase activities in a soil of high fertility. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts**. S.l.: Embrapa-CNPBS, 1995. p.189-190.
- VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970, 164p.
- WANG, E.T.; ROGEL, M.A.; SANTOS, A.G.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; CEVALLOZ, M.A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.49, p.697-703, 1999.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WILLEMS, A.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA genes sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.173, p.697-703, 1991.
- WILLIAMS, G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.L.; RAFALSKI, J.A.; TIGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6531-6535, 1990.
- YAMAOKA-YANO, D.M.; VALARINI, P.J. Métodos de identificação de bactérias. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L., eds. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p.369-389, 1998.
- YOKOYAMA, M.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J. de O. eds., **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, p.771-786, 1996.
- YOUNG, C.C.; CHENG, K.T. Genetic diversity of fast-and slow-growing soybean rhizobia determined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.26, 254-256, 1998.
- YOUNG, J.P.W. Molecular phylogeny of rhizobia and their relatives. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., eds. **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.587-592.

- YOUNG, J.P.W. *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans, and lucerne grown at the same site. **Journal of General Microbiology**, London, v.131, p.2399-2408, 1985.
- YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototropic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.2271-2277, 1991.
- YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, New York, v.133, p.87-94, 1996.
- ZIMMERMANN, M.J. de O.; TEIXEIRA, M.G. Origem e evolução. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J. de O., eds., **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, p.57-70, 1996.