



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JUSCÉLIO DONIZETE CARDOSO

**ABORDAGEM POLIFÁSICA NA TAXONOMIA, FILOGENIA E
EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO DE
RIZÓBIOS SIMBIONTES DE FEIJOEIRO**

Londrina
2012

JUSCÉLIO DONIZETE CARDOSO

**ABORDAGEM POLIFÁSICA NA TAXONOMIA, FILOGENIA E
EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO DE
RIZÓBIOS SIMBIONTES DE FEIJOEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria.

Co-Orientadora: Dra. Diva Souza Andrade.

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C268a Cardoso, Juscélio Donizete.
Abordagem polifásica na taxonomia, filogenia e eficiência da fixação biológica do nitrogênio de rizóbios simbiotes de feijoeiro / Juscélio Donizete Cardoso. – Londrina, 2012.
101 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.
Coorientador: Diva Souza Andrade.
Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Rizóbio – Teses. 2. Rizóbio – Filogenia – Teses. 3. Taxonomia microbiana – Teses. 4. Microorganismos fixadores de nitrogênio – Teses. 5. Feijão comum – Teses. I. Hungria, Mariangela. II. Andrade, Diva Souza. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579.841.3

JUSCÉLIO DONIZETE CARDOSO

**ABORDAGEM POLIFÁSICA NA TAXONOMIA, FILOGENIA E
EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO DE
RIZÓBIOS SIMBIONTES DE FEIJOEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia

BANCA EXAMINADORA

Dra. Mariangela Hungria
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Dr. Fernando Gomes Barcellos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Kisle da Silva
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Dr: Marco Antonio Nogueira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Dra. Pâmela Menna Pereira Pavanelli
BIOAGRO

Londrina, 27 de agosto de 2012.

**Aos meus pais, Célio e Nilza
que acreditam na concretização
deste ideal e sempre me apoiaram em
todos os momentos de minha vida.**

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelo fortalecimento diante dos inúmeros obstáculos e por conceder o que há mais de valioso para mim, minha Família.

A Universidade Estadual de Londrina, pelas oportunidades.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), pela utilização da estrutura.

A Embrapa Soja pela utilização da estrutura.

A minha orientadora Profa. Dra. Mariangela Hungria, pelo aceite de orientação, pelos ensinamentos, paciência, pelas valiosas sugestões e pela amizade.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Diva Souza Andrade, pelo incentivo, disponibilidade, paciência, pelas cobranças, pela de confiança, comentários críticos, dedicação e sobretudo pela amizade e convívio pessoal. Ensinamentos que levarei para o resto da vida.

Aos professores do programa de Mestrado e Doutorado em Microbiologia pelo conhecimento transmitido e dedicação.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Microbiologia do Solo-IAPAR pela colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo-IAPAR, pela amizade, atenção e disponibilidade em me ajudar sempre que necessário.

Aos meus pais Célio e Nilza, pelo amor, colo, carinho cuidado, dedicação e orações; pelo exemplo de vida, dedicação e honestidade a ser seguida e a compreensão pelas minhas ausências; minha gratidão pela oportunidade que me

deram de buscar o conhecimento, como forma de conquistar meus sonhos e tornar-me um homem.

A Juliane Alves, pelo amor, amizade, incentivo, compreensão nas horas de estresse extremo, apoio moral e conselhos oferecidos.

A todos que tenham auxiliado de alguma forma na realização deste trabalho, para que houvesse êxito.

Meu muito obrigado!

**"Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,
Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o Mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades".**

LUÍS DE CAMÕES

CARDOSO, Juscélio Donizete. **Abordagem polifásica na taxonomia, filogenia e eficiência da fixação biológica do nitrogênio de rizóbios simbiotes de feijoeiro**. 2012. 101f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa com baixa especificidade em nodular com uma variedade de estirpes de rizóbios, os quais muitas vezes têm baixa efetividade na fixação de nitrogênio. O objetivo geral desta tese foi o de estudar a eficiência simbiótica e a filogenia de um grupo elite de estirpes de rizóbios, microssimbiontes do feijoeiro, utilizando uma abordagem polifásica. Avaliaram-se a eficiência simbiótica, características fenotípicas e genotípicas de estirpes de rizóbios isoladas de sementes, nódulos de feijoeiro, nódulos de amendoimzeiro (*Arachis hypogaea* L.) e mucuna anã (*Mucuna pruriens*) cultivadas em solos de diversos agroecossistemas. Quarenta e cinco estirpes elite foram analisadas quanto às propriedades simbióticas (nodulação, massa da parte aérea seca, N- total na parte aérea, porcentagem de N-ureído da seiva do xilema) em casa de vegetação, em vasos contendo solo arenoso não estéril cultivado com feijoeiro. As estirpes elite também foram caracterizadas em relação às propriedades morfo-fisiológicas, perfis genéticos de rep-PCR (BOX) e polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP – *Restriction Fragment of Length Polymorphism*) do gene 16S rRNA, utilizando-se quatro enzimas de restrição. Na análise parcial das sequências do 16S rRNA, foram utilizadas 17 estirpes representantes obtidas dos principais grupos resultantes das análises anteriores. A estirpe mais eficiente foi a IPR-Pv2608, que agrupou com *Rhizobium* sp, enquanto a IPR-Pv583, mostrando menor eficácia na fixação do N₂ foi agrupada com *Herbaspirillum lusitanum*. Estirpes eficientes foram agrupadas com espécies simbióticas e gêneros pouco comuns entre simbióticos, incluindo *Leifsonia xyli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia* e *Enterobacter*. As seis estirpes que apresentaram dissimilaridade do gene 16S RNA do gênero *Rhizobium* foram submetidas às análises do MLSA (*Multilocus Sequence Analyses*) e do gene *nifH*. Os índices de diversidade (Shannon), com base nas características fenotípicas (eficiência simbiótica, morfo-fisiológicas) e genéticas (BOX-PCR, RFLP do 16S rRNA e sequências do gene 16S rRNAs), calculados em função do número de grupos e de estirpes em cada grupo, apresentaram valores de 1,50 e 1,47, respectivamente. Algumas estirpes utilizadas neste estudo se destacaram quanto à sua capacidade de fixação de nitrogênio e, portanto, mostraram alto potencial biotecnológico para a utilização em inoculantes comerciais.

Palavras-chave: BOX-PCR. Fixação biológica do nitrogênio. RFLP-PCR. 16S rRNA. MLSA, *nifH*. *Phaseolus vulgaris* (L).

CARDOSO, Juscélio Donizete. **Polyphasic approach to taxonomy, phylogeny and efficiency of biological nitrogen fixation of rhizobial symbionts bean.** 2012. 101p. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a leguminous that has been reported with low specificity in nodulating with a variety of rhizobial strains, which one effective in fixing nitrogen. The aims of this work were to assess the symbiotic effectiveness, phenotypic and genotypic characteristics of rhizobial strains isolated from seeds and nodules of common bean and nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and mucuna (*Mucuna pruriens* L.) cropped in soils from various Brazilian agroecosystems. Forty-five elite strains were analyzed for symbiotic properties (nodulation, plant-growth and nitrogen-fixation parameters) under greenhouse conditions in pots containing non-sterile sandy soil. Elite strains were also characterized for morpho-physiological properties, genetic profiles of rep-PCR (BOX), and RFLP-PCR of the 16S rRNA gene, four restriction enzymes. Partial sequencing of the 16S rRNA was obtained for seventeen strains representative of the main groups resulting from all previous analyses. The most effective strain, IPR-Pv2608, was clustered with *Rhizobium* sp, whereas strain IPR-Pv583, showing lower effectiveness in fixing N₂, was clustered with *Herbaspirillum lusitanum*. Surprisingly, effective strains were clustered with unusual symbiotic genera/species, including *Leifsonia xyli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia* and *Enterobacter*. The six strains that presented dissimilarity of 16S rRNA gene with the *Rhizobium* genera were analyzed by using the MLSA technique and presence the *nifH* gene. Diversity indices (Shannon), based on phenotypic characteristics (symbiotic efficiency, morphological and physiological) and genetic (BOX-PCR and RFLP of 16S rRNA sequences of the 16S rRNAs), calculated according to the number of groups and strains in each group, values were 1.50 and 1.47, respectively. Some strains recognized in this study were outstanding in their nitrogen-fixing capacity and, therefore, show high biotechnological potential for use in commercial inoculants.

Keywords: Biological nitrogen fixation. BOX-PCR. MLSA. RFLP-PCR. 16S rRNA. MLSA. *nifH*. *Phaseolus vulgaris*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Crescimento da população mundial a partir do ano 1860 até 2000 e aporte global de nitrogênio por ano 18
- Figura 2** - Secreção de compostos flavonoides pela planta e ativação dos genes *nod* do *Rhizobium*..... 24
- Figura 3** - Formação de nódulos nas raízes de leguminosas. 25
- Figura. 4** - Mapa do Estado do Paraná (Brasil) mostrando os locais de amostragem indicada por números no Estado do Paraná (Para detalhes, ver Tabela 2)..... 36
- Figura 5** - Gráfico de dispersão de estirpes de rizóbios de acordo com a análise de componente principal (PCA): (a) primeiro e segundo componentes; (b), primeiro e terceiro componentes; e (c) segundo e terceiro componentes. (d) Dendrograma mostrando agrupamento das estirpes elite IPR e tratamentos não-inoculados com (N) e sem N mineral (Test). A PCA foi com base nas variáveis relativa à FBN (massa seca, N total na parte aérea, N total e % N-ureídeos na seiva do xilema, massa seca individual de nódulos totais e massa seca de nódulos..... 36
- Figura 6** - Análise de agrupamento de quarenta e oito estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de plantas de feijoeiro crescidas no campo, inoculados com suspensões de solo ou semente. Dendrograma foi gerado com base na matriz binária e distância euclidiana usando doze características fenotípicas 57
- Figura 7** - A análise de agrupamento (UPGMA com o coeficiente de índice de Jaccard e 10% de tolerância no programa Bionumerics) dos produtos de PCR obtidos por análise BOX-PCR de quarenta e cinco estirpes IPR e SEMIA4077 (CIAT899), 4080 (IPR *P.vulgaris* 81) e 4088 (H20)..... 59

Figura 8 - Dendrograma mostrando a diversidade genética de quarenta e cinco estirpes IPR de rizóbio com base nos perfis de RFLP-PCR da região 16S rRNA analisado com as enzimas de restrição <i>RsaI</i> , <i>HinfI</i> , <i>HpaII</i> e <i>HaeIII</i> . Para análise de agrupamento foi utilizado algoritmo UPGMA com o coeficiente de Jaccard. As estirpes SEMIA4077 (CIAT899) e -4080 (IPR 81) e -4088 (H12) são recomendadas para a produção comercial de inoculantes no Brasil foram incluídas.	62
Figura 9 - Árvore filogenética com base nas sequências de 16S rRNA de treze estirpes (IPR-Pv). Números acesso no GeneBank estão disponíveis na Tabela 7. Árvore filogenética foi gerada usando o programa MEGA versão 5.0 com parâmetros padrão, o modelo de distância K2P e o algoritmo “neighbor-joining”	63
Figura 10 - O produto da amplificação do DNA das estirpes de rizóbios IPR com os oligonucleotídeos do gene <i>nifH</i>	64
Figura 11 - Árvores filogenéticas baseadas nas sequências dos genes <i>gltA</i> , <i>recA</i> e <i>rpoA</i> , mostrando as relações entre os simbiosites de <i>Phaseolus vulgaris</i> . A árvore foi construída pelo método Neighbor-Joining com 1000 repetições usando o programa MEGA 5.	66
Figura 12 - Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas de três genes (<i>gltA</i> , <i>recA</i> e <i>rpoA</i>), mostrando as relações entre os simbiosites de <i>Phaseolus vulgaris</i> . A árvore foi construída pelo método Neighbor-Joining com 1000 repetições usando o programa MEGA 5.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem e coordenadas geográficas, locais de amostragem e código das bactérias na coleção.	35
Tabela 2 - Oligonucleotídeos e seus respectivos ciclos utilizados para amplificação de três genes utilizados nas análises de MLSA.	48
Tabela 3 - Variáveis associadas com fixação biológica de N ₂ com cultivar de feijoeiro IPR Colibri obtidos no experimento realizado em casa de vegetação em vasos contendo solo não estéril	52
Tabela 4 - Coeficientes de correlação de Pearson (N = 50) entre variáveis associadas à FBN.	54
Tabela 5 - Características fenotípicas e perfis de RFLP-PCR do 16S rRNA de rizóbios com as enzimas de restrição RsaI, HinfI, HpaI e HaeIII.	58
Tabela 6 - Identificação das estirpes com base na similaridade das sequências de 16S rRNA utilizando sequências disponíveis no GenBank (NCBI).	61
Tabela 7 - Número de grupos de cada característica com seus respectivos índices de dominância, Simpson , diversidade de Shannon (H), Evenness, Menhinick, riqueza (Margalef) e Equitability das 45 estirpes IPR mais 3 SEMIAS.....	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO	17
3.2	A CULTURA DO FEIJOEIRO	19
3.3	A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO NA SIMBIOSE COM O FEIJOEIRO	22
3.4	COMUNICAÇÃO ENTRE LEGUMINOSAS E RIZÓBIOS: SINAIS MOLECULARES E NODULAÇÃO	23
3.5	EFICIÊNCIA AGRONÔMICA VISANDO INOCULANTES COMERCIAIS	26
3.6	TAXONOMIA DO RIZÓBIOS	27
3.7	ANÁLISE MOLECULAR PARA DIVERSIDADE DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS	29
3.8	ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS MULTILOCUS (MLSA) EM ESTUDOS FILOGENÉTICOS	30
3.9	DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE RIZÓBIOS NODULANTES DO FEIJOEIRO	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	ORIGEM DAS ESTIRPES DE RIZÓBIO	34
4.2	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA EM SOLO NÃO ESTÉRIL	36
4.2.1	Preparo do Solo e Adubação.....	36
4.2.2	Número Mais Provável de Rizóbio no Solo	37
4.2.3	Semeadura e Tratamentos	38
4.2.4	Avaliações de Componentes da FBN	39
4.2.4.1	Coletas das raízes e nódulos do feijoeiro	39
4.2.4.2	Massa seca e nitrogênio total da parte aérea do feijoeiro	39
4.2.4.3	Determinação do N-ureído na seiva do xilema	40
4.2.4.4	Determinação do N-total na seiva.....	42
4.2.4.5	Cálculo da eficiência relativa	42
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43

4.4	ANÁLISE MORFO-FISIOLOGICAS E MOLECULAR.....	43
4.4.1	Caracterização morfo-fisiológicas das estirpes de rizóbio.....	43
4.4.2	Agrupamento das estirpes com base em dados morfo-fisiológicos.....	44
4.4.3	Extração de DNA genômico.....	44
4.4.4	Análise de PCR-RFLP do gene ribossomal 16S.....	45
4.4.5	Amplificação do PCR com oligonucleotídeo específico BOX.....	46
4.4.6	Agrupamento das Estirpes.....	47
4.4.7	Sequenciamento de Genes.....	47
4.4.7.1	Purificação do produto da PCR.....	47
4.4.7.2	Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	47
4.4.7.3	Sequenciamento de genes para análise por MLSA.....	48
4.4.7.4	Reações de sequenciamento.....	48
4.4.7.5	Precipitação dos produtos amplificados.....	49
4.4.8	Análise e Agrupamento das Sequências.....	49
4.4.9	Amplificação do Gene nifH.....	50
4.4.10	Índices de Diversidade.....	50
5	RESULTADOS.....	51
5.1	EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DAS ESTIRPES DE RIZÓBIOS IPR.....	51
5.2	CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLOGICA.....	56
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES POR BOXA1R-PCR.....	59
5.4	Perfis de RFLP-PCR da Região 16S rDNA.....	60
5.5	ANÁLISE FILOGENÉTICA BASEADA EM GENES 16S rRNA.....	62
5.6	AMPLIFICAÇÃO DO GENE NIFH.....	64
5.7	ANÁLISE DE SEQUÊNCIA MULTILOCUS (MLSA) EM ESTUDOS FILOGENÉTICOS.....	64
6	DISCUSSÃO.....	70
7	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	ANEXOS.....	86
	ANEXO A - Applied genética and molecular biotechnology.....	87

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é essencial para a formação e manutenção dos seres vivos na terra porque entra na formação de aminoácidos (proteínas) e ácidos nucléicos (DNA). Entretanto, a quantidade disponível de proteínas palatáveis e assimiláveis para sua ingestão diária pode ser limitante para o homem, que utiliza diversas fontes proteicas, tanto animal quanto vegetal. Entre os vegetais, podemos citar como fonte proteicas os grãos comestíveis de diversas leguminosas, como feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), lentilha (*Lens culinaris* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), grão de bico (*Cicer arietinum* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill.) por apresentarem de 18 a 40% de proteínas além de ser também, ricos em ferro, cálcio, vitaminas (principalmente do complexo B), carboidratos e fibras. Nesse grupo, destaca-se o feijoeiro comum que tradicionalmente faz parte da dieta do brasileiro, e de diversos países da América Latina e da África.

No Brasil, o Estado Paraná é o maior produtor dessa leguminosa, embora com produtividade ainda considerada baixa da ordem 1.500 kg ha⁻¹. A cultura do feijoeiro tem exigências elevadas em nutrientes, principalmente em solos de baixa fertilidade não corrigidos ocorre uma cadeia de deficiências nutricionais, sendo a de N um dos fatores limitantes à produtividade da cultura. Além do N, outros nutrientes (P, Ca, Mg, Mo, Co, etc.) bem como, fatores relacionados ao manejo da cultura tais como qualidade de sementes, baixo *stand*, suscetibilidade a pragas e doenças, resultam em baixa produtividade do feijoeiro.

A palavra rizóbio ou rizóbios designa um grupo de bactérias Gram negativas que vivem heterotroficamente no solo e engloba diversos gêneros, por exemplo, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (=Ensifer), *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*. A principal característica comum dessas bactérias é a de se associar simbioticamente a diversas leguminosas e não leguminosas (*Parasponia*), formando estruturas altamente específicas, chamadas nódulos, onde ocorre o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN).

A FBN é um componente importante no agrossistema para alcançar a sustentabilidade produtiva, tanto que, no Brasil, o uso de inoculantes rizobianos teve um grande crescimento nos últimos anos, em 2001 foram comercializadas aproximadamente 14 milhões de doses, já em 2011 foram 25 milhões. Uma das causas desse aumento foi a formação de uma Rede de Laboratórios para a

Recomendação, Padronização e Difusão de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE), contribuindo para uma legislação adequada de controle da qualidade dos inoculantes. Além disso, a criação da Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII, www.anpii.com.br), com um trabalho de divulgação, levou ao maior uso de inoculantes. Contudo, para a cultura do feijoeiro a quantidade de inoculantes comercializados no Brasil ainda representa apenas de 1 a 3% das 25 milhões de doses comercializadas anualmente. Além disso, no Programa de Agricultura de Baixo Carbono (www.agricultura.gov.br/abc), a FBN é um subprograma, ressaltando a sua importância.

No caso do Paraná, a ocorrência generalizada de rizóbios nos solos cultivados tem sido considerada uma das principais causas da falta de resposta à inoculação. Isso porque parte dessa população nativa de rizóbios nodulantes de feijoeiro, aparentemente, possui baixa eficiência, mas é muito competitiva.

Dentro da diversidade de rizóbios habitantes nos solos brasileiros e, especialmente no Paraná, é possível identificar estirpes com grande capacidade de FBN, competitividade e estabilidade genética, para a cultura do feijoeiro. Um exemplo é a estirpe SEMIA 4080 (= PRF81), uma das estirpes autorizadas pelo MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), isolada da região centro sul do Paraná, no município de Irati. Entretanto, essas estirpes de rizóbios microsimbiontes do feijoeiro, além da avaliação da eficiência agrônômica na fixação biológica do N₂, necessitam de uma análise polifásica com base nas características morfológicas, fisiológicas e genéticas, permitindo a sua caracterização inter e intraespecífica.

Neste contexto, a hipótese deste estudo é de que existe diversidade de rizóbios nodulantes do feijoeiro nos solos paranaenses, em consequência da distribuição causada por fatores abióticos (vento, areia, etc.) e bióticos (sementes, homem) e que podem servir como fonte para seleção de novas espécies e estirpes com potencial biotecnológico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a eficiência simbiótica e a filogenia de um grupo de estirpes elites de rizóbio, microssimbiontes do feijoeiro, utilizando uma abordagem polifásica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir de um grupo de estirpes elites de rizóbios, isoladas de sementes e nódulos de feijoeiro (*Phaseolus Vulgaris*), nódulos de amendoineiro (*Arachis hypogaea*) e de mucuna anã (*Mucuna pruriens*), previamente selecionadas quanto à eficiência simbiótica em feijoeiro, os objetivos específicos foram:

- (i) Avaliar a eficiência simbiótica em feijoeiro em solo não estéril, em casa de vegetação;
- (ii) Avaliar as características fenotípicas e genotípicas das estirpes;
- (iii) Avaliar as sequências do gene 16S rRNA de estirpes representativas;
- (iv) Determinar as relações filogenéticas, com base na metodologia de MLSA, das estirpes que apresentaram dissimilaridade na sequência do gene 16S rRNA em relações às estirpes padrões do gênero *Rhizobium*;
- (v) Avaliar a diversidade com base nas características fenotípicas (eficiência simbiótica e morfo-fisiológicas) e genéticas (no perfil genético do BOX-PCR, RFLP 16S rRNA e sequenciamento do 16S rRNA).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

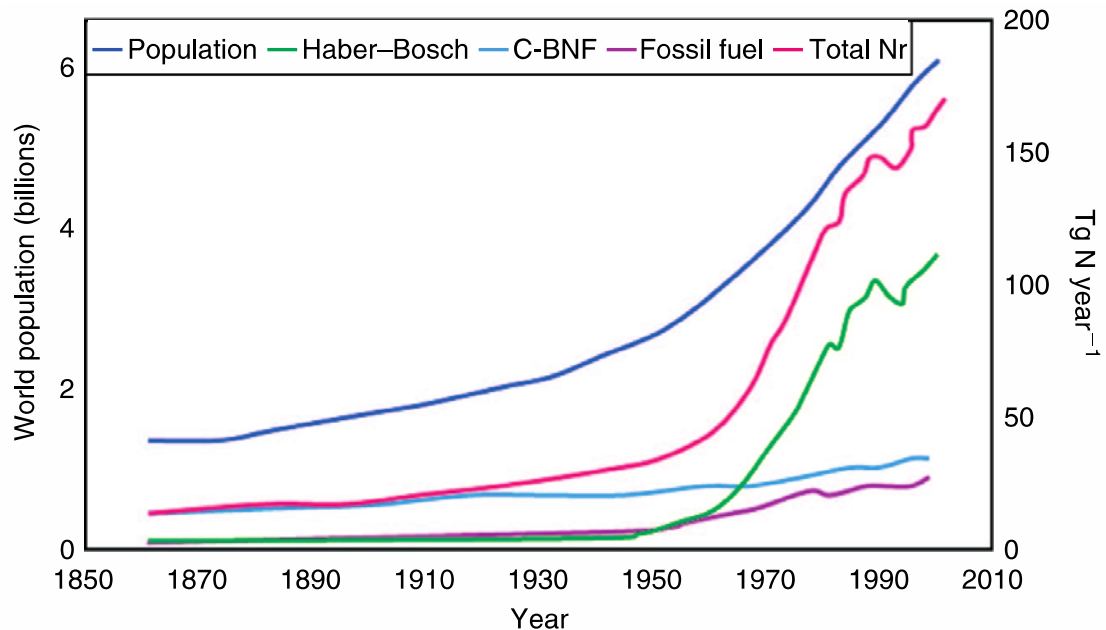
3.1 IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é essencial para a vida. Embora uma grande quantidade de N (4×10^{21} g) exista na atmosfera, solos, e nas águas da Terra, mais de 99% deste está na forma de N_2 , que não é assimilável pela maioria dos organismos. Para que o N possa ser incorporado no bloco da vida “C, H e O”, a tripla ligação existente nos átomos de nitrogênio ($N \equiv N$) deve ser quebrada (BOTTOMLEY e MYROLD, 2007) e este seja convertida à forma amoniacal.

O N é o quarto elemento mais abundante nas plantas, sendo superado apenas pelo carbono (C), oxigênio (O) e hidrogênio (H), sendo constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucléicos, hormônios e da clorofila (MADIGAN et al., 2010) sendo por isso considerado um macronutriente primário junto com o fosforo (P) e potássio (K).

No mundo pré-industrial o N atmosférico era transformado através de descargas elétricas e vulcanismo ($5 \text{ milhões t N ano}^{-1}$) e através da FBN (Fixação Biológica do Nitrogênio) ($100\text{-}140 \text{ milhões t N ano}^{-1}$). Durante os últimos 100 anos, no entanto, a entrada anual de N aumentou significativamente. Devido ao uso de leguminosas na agricultura, a FBN contribuiu aproximadamente com $30 \text{ milhões t N ano}^{-1}$. Mas o maior aumento durante esse período foi devido ao uso de fertilizantes na agricultura, que antes do século XX era praticamente zero e atualmente está em $110 \text{ milhões t N ano}^{-1}$ (Figura 1). Esse aumento de 10 vezes em um século foi devido ao crescimento da população no mesmo período (GALLOWAY et al., 2003; BOTTOMLEY e MYROLD, 2007).

Figura 1 - Crescimento da população mundial a partir do ano 1860 até 2000 e aporte global de nitrogênio por ano.



Fonte: (GALLOWAY et al., 2003)

Geralmente, o N encontrado no solo como parte do complexo denominado matéria orgânica pode ser classificado como orgânico (TISDALE e NELSON, 1975). A mineralização do N no solo é um processo mediado por micro-organismos. Indiscutivelmente, o N na forma de fertilizantes é assimilado mais rapidamente pelas plantas, mas apresentam custo energético elevado, pois o processo industrial que transforma o N₂ em amônia (NH₃) requer: 1) hidrogênio (derivado de gás de petróleo); 2) catalisador contendo ferro; 3) altas temperaturas (300° a 600°C); e altas pressões (200 a 800 atm). Conseqüentemente, o gasto de fontes energéticas não renováveis é bastante elevado e, estimando-se que, para a síntese de uma tonelada de amônia (NH₃), sejam necessários, aproximadamente, seis barris de petróleo (HUNGRIA et al., 2001a).

A recomendação de N para a cultura do feijoeiro tem sido feita com base na fertilidade do solo e na produtividade no Paraná, e pode ser até 80 kg de N ha⁻¹ de forma parcelada (PARRA, 2000) embora, em muitos casos a dose pode ser reduzida. Considerando-se o aproveitamento de 50% do N fertilizante aplicado, conforme discutido por Hungria et al (2001a), de fato seriam necessários o dobro dessa quantidade com valores aproximados de 160 kg de N ha⁻¹, ou 356 kg ha⁻¹ de ureia, a fonte de N mais utilizada, que contém 45% de N.

A perda aproximada de 50% de N quando adicionado na forma de fertilizantes minerais tem sido relatada por diversos autores. Esses processos de perda são de lixiviação no perfil do solo por percolação, ou escoamento superficial e, também, de transformação em formas gasosas, tanto pela desnitrificação (redução, pela ação dos micro-organismos, para formas gasosas, N_2 e N_2O), como pela volatilização na forma de NH_3 no solo (TISDALE e NELSON, 1975; HUNGRIA et al., 2001a). Vale considerar, ainda, o fato de 70% da ureia ser importada e a distância entre os portos e as áreas consumo é elevada o que requer o uso de transporte viário com alto consumo de combustível não renovável. Os altos custos ambientais e financeiros representam fortes argumentos para o apoio às linhas de pesquisa buscando fontes renováveis e biológicas de N.

3.2 A CULTURA DO FEIJOEIRO

O gênero *Phaseolus* é composto por aproximadamente 50 espécies, todas nativas das Américas. Entre essas, *P. lunatus*, *P. vulgaris*, *P. coccineus* e *P. acutifolius* foram domesticadas pelas civilizações pré hispânica e são amplamente cultivadas para consumo humano (ORMEÑO-ORRILLOA et al., 2006).

A espécie *P. vulgaris* é nodulada por *Rhizobium* de crescimento rápido, enquanto *P. lunatus* forma nódulos com espécies de *Bradyrhizobium* de crescimento lento em meio de cultura (ORMEÑO-ORRILLOA et al., 2006). Entre as espécies cultivadas do gênero *Phaseolus* (*P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. lunatus*), *P. vulgaris* é o que representa a maior área cultivanda, sendo responsável por cerca de 95% da produção mundial (MARIOT, 1989).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é originário das regiões entre o México e a Guatemala e na zona dos Andes, conforme dados e estudos com marcadores moleculares (ZIMMERMANN e TEIXEIRA, 1996; BITOCCHI et al., 2012). É a principal leguminosa largamente consumida e participa da alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas na América Latina, no leste e sul da África. O feijão possui entre 20 a 33% de proteínas nos grãos e é considerado um alimento perfeito, pois apresenta aproximadamente o dobro do teor de proteínas da maioria dos cereais. O grão de feijão é rico em fibras e carboidratos, além de ser uma importante fonte de vitaminas hidrossolúveis, como a tiamina, a riboflavina, a niacina e a folacina (COSTA e VIEIRA, 2000).

Considerando todos os gêneros e espécies de feijoeiro englobadas nas estatísticas da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (FAO, 2010), a produção mundial de feijão situou-se em torno de 20 milhões de toneladas.

No Brasil, a área plantada na safra de 2010/2011 ocupou cerca de 4 milhões de ha e com produção de 3,8 milhões de toneladas, ou seja, cerca de 19% da produção mundial. O Brasil ocupa a posição de segundo maior produtor mundial, sendo ultrapassado somente pela Índia, que produz 4,8 milhões de toneladas. O Paraná destaca-se como o principal produtor nacional de feijão, com uma área de 520 mil hectares cultivados e produção em torno de 820 mil toneladas (FAO, 2010; CONAB, 2011).

O potencial produtivo do feijoeiro é alto, conforme dados obtidos em condições experimentais, a produtividade pode alcançar 5.000 kg ha⁻¹ (EMBRAPA, 2005). De acordo com trabalhos conduzidos no Paraná, foram obtidas produções de até 4.000 kg ha⁻¹ semente com a inoculação de estirpes de rizóbios eficientes para o feijoeiro (HUNGRIA et al., 2000) sem o uso de N mineral. Embora existam pacotes tecnológicos para uma alta produtividade, a produtividade no Brasil é considerada ainda baixa, em média 935 kg ha⁻¹. Por outro lado, o Estado do Paraná apresentou produtividade superior a 1.500 kg ha⁻¹ em 2011 (CONAB, 2011).

O cultivo dessa leguminosa é bastante difundido em todo território nacional. Em algumas regiões, o plantio de feijoeiro é feito em três épocas ao longo do ano. A primeira, conhecida como safra das "águas", ocorre entre agosto e dezembro e concentra-se mais nos Estados da região Sul; a segunda safra, ou da "seca", abrange todos os Estados brasileiros e ocorre entre janeiro e abril; a terceira safra, ou de "inverno", concentra-se nas regiões sudeste, sul, centro-oeste e no Estado da Bahia, e seu plantio é realizado de maio até agosto, frequentemente em áreas irrigadas com pivô central. Dessa forma, durante todo o ano, em alguma região do país sempre haverá produção de feijão (COSTA e VIEIRA, 2000). O agricultor deve considerar a rotação de culturas e boas práticas para manter a diversidade e saúde do solo, evitando a monocultura.

Esse cultivo generalizado e algumas vezes intensivo do feijoeiro exige fertilidade natural alta e adubação equilibrada para obter rendimentos altos. Entretanto, grande parte dos solos cultivados com feijoeiro no Paraná apresenta baixos valores de pH, elevados teores de alumínio trocável, baixa saturação em

bases e baixos teores de fósforo (PARRA, 2000). Além disso, o baixo nível de tecnologia adotada por alguns produtores e o cultivo em solos marginais, devido ao baixo retorno econômico da cultura, contribuem para a baixa produtividade do feijoeiro e, nesse contexto, o fornecimento adequado de nutrientes, particularmente o nitrogênio (N) e o fósforo, representam um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos no Brasil (ARAÚJO, 1994).

Os teores de N nos solos brasileiros, de um modo geral, são baixos e, com a intensificação da agricultura, as exigências por N são cada vez maiores. Conseqüentemente se faz necessário o suprimento do N à cultura. Portanto, práticas agrícolas alternativas para diminuir a dependência de fertilizantes químicos e seus custos econômicos e ambientais, precisam ser procuradas, principalmente para o Brasil, que não industrializa boa parte dos fertilizantes nitrogenados que consome.

O N no solo é bastante dinâmico e sofre várias transformações, geralmente intermediada por micro-organismos. A primeira via que ocorre naturalmente é pela mineralização da matéria orgânica do solo. No entanto, essa fonte não é suficiente para suprir a demanda pela planta, especialmente nas condições tropicais e subtropicais onde não existe uma reposição suficiente. Embora no passado os solos paranaenses, originalmente sob florestas, apresentassem elevada fertilidade natural, o cultivo intenso resultou na diminuição dos teores de matéria orgânica (M.O.). A adoção da prática do plantio direto a partir de 1980, no Paraná, aliada à rotação de culturas no inverno tem mostrado que é possível aumentar os teores de M.O. no solo. Além da maior quantidade de M.O. para fornecimento de N, a diversidade de micro-organismos no solo é maior sob plantio direto do que nos sistemas convencionais. O grupo de rizóbios nodulantes da soja mostrou maior diversidade em solo argiloso em experimento de longa duração em solo com plantio direto em relação ao convencional no norte do Paraná (FERREIRA et al., 2000).

Devido à rápida mineralização da M.O. em condições tropicais, os solos brasileiros são capazes de fornecer, em média, apenas 10 a 15 kg de N.ha⁻¹safr⁻¹ (HUNGRIA et al., 2001a).

Uma segunda forma de fornecimento de N e que vem sendo utilizada há muitos anos é via fertilizantes industrializados obtidos pelo processo denominado Haber-Bosch. Nesse processo a conversão do nitrogênio gasoso atmosférico (N₂) em amônia tem um gasto energético alto e elevado custo

econômico e ambiental. Todavia, é o mais utilizado porque ocorre rápida assimilação pelas plantas. Uma terceira fonte de N considerada e com contribuição em torno de 10% da entrada de N na Terra é a fixação não-biológica, resultante de processos naturais em que o N_2 atmosférico é convertido diretamente a nitrato, principalmente pelas descargas elétricas, combustão e vulcanismo.

Finalmente, a mais importante fonte renovável de N para as plantas e micro-organismos é o N obtido da reação enzimática mediada por micro-organismos procarióticos em simbiose com as leguminosas e algumas não leguminosas, como gramíneas e os fixadores de N de vida livre. A fixação biológica do nitrogênio atmosférico representa uma importante via de incorporação do N_2 à biosfera, perfazendo cerca de 65% da entrada de N na Terra (TISDALE e NELSON, 1975; GILLER, 2001; HUNGRIA et al., 2001a).

3.3 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO NA SIMBIOSE COM O FEIJOEIRO

Nenhum outro elemento essencial para a vida apresenta tantas formas no solo como o N cujas transformações são mediadas principalmente por micro-organismos (ROBERTSON e GROFFMAN, 2007). Bactérias diazotróficas conhecidas coletivamente como rizóbios são capazes de estabelecer simbiose com muitas leguminosas e algumas não leguminosas, formando nódulos nas raízes, e apresentando a capacidade de fixar o N_2 atmosférico, o que pode contribuir para a redução no uso de fertilizantes nitrogenados.

Entre os sistemas biológicos envolvendo plantas e micro-organismos, a simbiose leguminosas-rizóbios é a de maior expressão econômica. Em razão da importância econômica e social do feijoeiro no Brasil, e da potencialidade e necessidade de incrementar sua produtividade, estudos visando a otimização do processo de nodulação e, conseqüentemente, da FBN como forma de melhorar a disponibilidade de N às plantas, são de grande relevância (FRANCO et al., 2002).

Embora o N_2 constitua, aproximadamente, 80% dos gases atmosféricos, nenhum animal ou planta consegue utilizá-lo como nutriente, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos de N na molécula do N_2 , uma das mais fortes na natureza. Contudo, os gases atmosféricos também se difundem para o espaço poroso do solo, e o N_2 consegue ser aproveitado por alguns micro-

organismos procariotos (arqueobactérias e, principalmente, bactérias). Em uma reação de oxido-redução, a quebra da tripla ligação do N_2 ocorre pela ação de um complexo enzimático denominado dinitrogenase, com formação de amônia e em seguida de compostos orgânicos nitrogenados (HUNGRIA et al., 2001b).

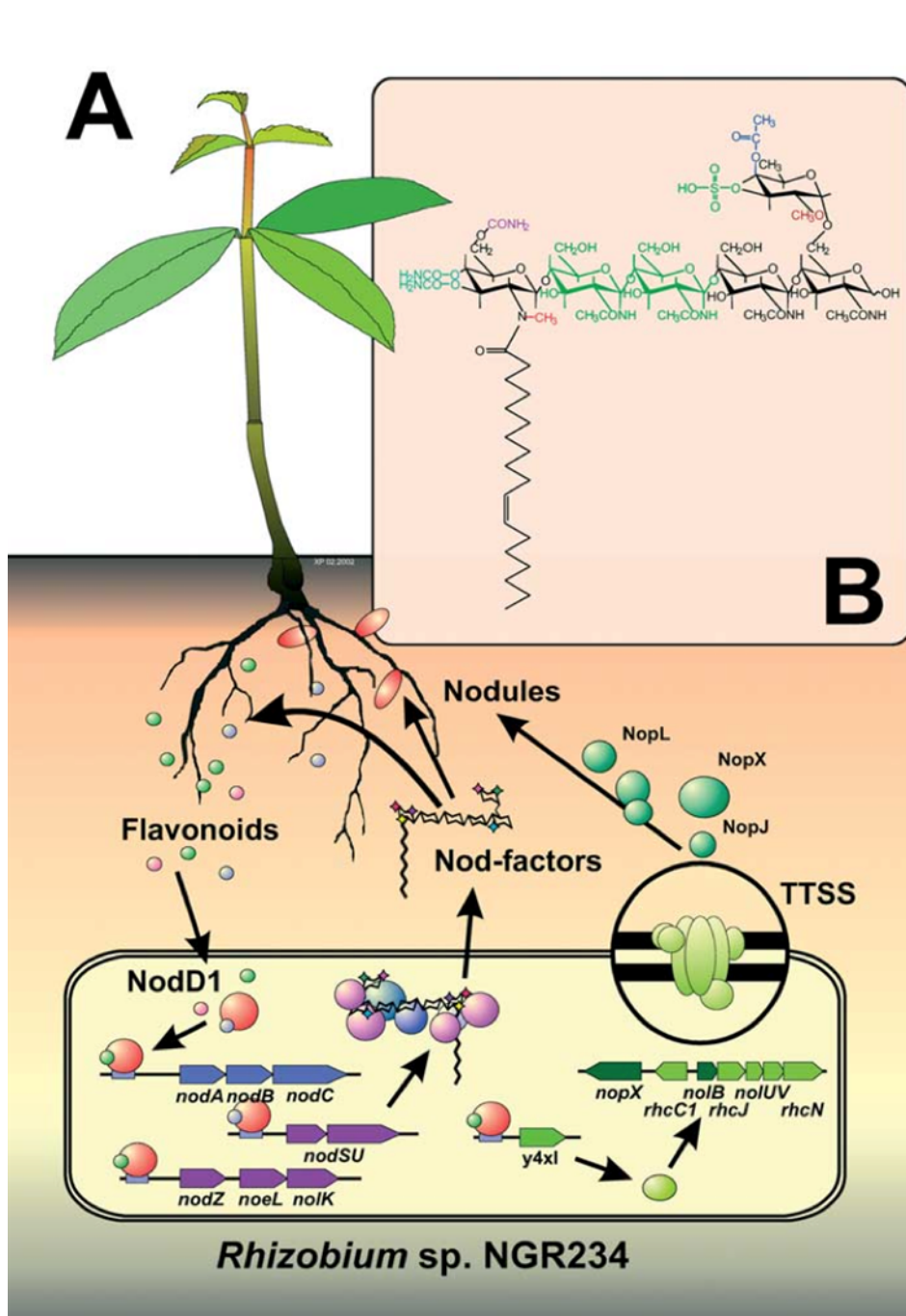
No Brasil os trabalhos quantificando o N_2 fixado por feijoeiro variou de 3 a 65 kg ha⁻¹ pelo processo biológico. A FBN é facilmente suprimida por aplicação de fertilizante nitrogenados, sendo a proporção de N derivado da fixação biológica será menor quando grandes quantidades desse fertilizante esta disponível no solo. Com isso a contribuição da FBN para o feijoeiro pode ser de 12 a 72% do necessário para a planta (GILLER, 2001).

A contribuição da FBN no aumento da produção do feijoeiro quando inoculado com a SEMIA 4080 foi observada em seis experimentos de campo no Paraná, sendo em média de 435 kg e de até 1000 kg em um experimento (HUNGRIA et al., 2003).

3.4 COMUNICAÇÃO ENTRE LEGUMINOSAS E RIZÓBIOS: SINAIS MOLECULARES E NODULAÇÃO

As interações simbióticas são controladas por sinais moleculares secretados pelas raízes das leguminosas que estimulam o crescimento da bactéria simbiote na rizosfera. Esse sistema faz com que bactérias vivendo saprofiticamente no solo percebam sinais químicos sintetizados pela planta hospedeira. Esses compostos secretados pelas plantas, denominados flavonoides e compostos fenólicos, são indutores de um conjunto de genes (*nod*, *nol* e *noe*) nas bactérias simbiotes, que atua no processo de interação com a planta hospedeira (Figura 2).

Figura 2 - Secreção de compostos flavonoides pela planta e ativação dos genes *nod* do *Rhizobium*.



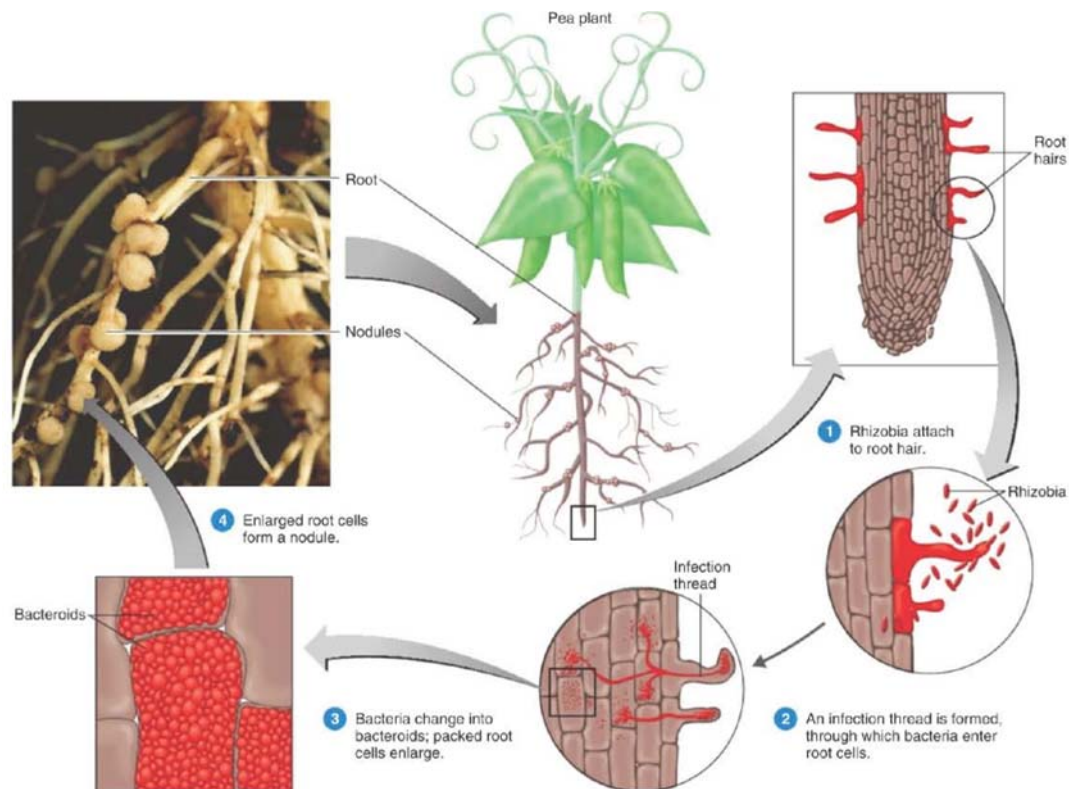
Fonte: (BROUGHTON et al., 2003).

No caso do feijão preto, trabalhos conduzidos por Hungria et al. (1991b; a) demonstraram que a planta exsuda flavonoides que induzem à expressão dos genes de nodulação que, por sua vez, induzirão o rizóbio à síntese de moléculas que são responsáveis por diversas alterações citológicas e no fenótipo das raízes,

tais como deformação e incremento no número de pelos radiculares, em pré estágios essenciais para a formação dos nódulos. Havendo a ligação das bactérias à superfície do pelo radicular, as células de rizóbios penetram nos pelos radiculares conforme apresentado na figura 3.

Após o contato inicial entre a planta hospedeira e o simbiote, o pelo radicular curva-se como resultado da ação de substâncias excretadas pela bactéria. Após o encurvamento, a bactéria diazotrófica penetra no pelo radicular e induz a planta a formar o cordão de infecção, o qual se dissemina ao longo do pelo radicular. Após esse processo é formado o nódulo conforme mostrado na figura 3 (HUNGRIA, M., 1994; HUNGRIA et al., 1997; BROUGHTON et al., 2003; TORTORA et al., 2012)

Figura 3 - Formação de nódulos nas raízes de leguminosas.



Fonte: (TORTORA et al., 2012).

A formação de nódulos é um processo complexo, que ocorre em várias etapas e envolve mudanças fisiológicas e morfológicas, tanto na célula hospedeira, como na bactéria simbiótica. 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,

enquanto que as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (HUNGRIA, M, 1994; BOTTOMLEY e MYROLD, 2007).

Esses micro-organismos procarióticos simbióticos adquiriram, durante sua evolução, a capacidade de sintetizar o complexo enzimático da nitrogenase, composto por duas proteínas diferentes, a dinitrogenase (Mo-Fe proteína) e a dinitrogenase-redutase (Fe-proteína), que catalisam a conversão de N_2 atmosférico a amônia. Essa amônia será subsequentemente assimilada em aminoácidos e proteínas pelas plantas (VARGAS e HUNGRIA, 1997).

Conforme mencionando anteriormente, a ligação do dinitrogênio é extremamente forte e por isso requer grande quantidade de energia para que seja convertido o NH_3 , envolvendo a transferência de seis elétrons são para reduzir N_2 a NH_3 . A FBN é inibida pelo oxigênio devido à rápida e irreversível inativação da dinitrogenase redutase pelo O_2 , mesmo em fixadores de nitrogênio aeróbios (HUNGRIA, M., 1994; HUNGRIA et al., 1997; BROUGHTON et al., 2003; MADIGAN et al., 2010).

3.5 EFICIÊNCIA AGRONÔMICA VISANDO INOCULANTES COMERCIAIS

A busca por novas estirpes capazes de fixar o N atmosférico quando em simbiose com o feijoeiro deve fazer parte de todo programa de pesquisa em agricultura sustentável. Além dos testes de eficiência em laboratório e casa de vegetação em solução nutritiva sem N e em solo, e das descrições relacionadas com as características morfológicas, bioquímicas e genéticas, também se faz necessário avaliar a eficiência agronômica das estirpes em diversas condições edafoclimáticas.

A utilização de inoculantes rizobianos tem se mostrado limitada, porque a maior parte das leguminosas é nodulada por estirpes nativas, nem sempre com alta eficiência em fixar N. No entanto, a introdução de uma estirpe considerada mais eficiente em fixar N em condições tropicais é quase sempre prejudicada pela alta competitividade dos rizóbios nativos, normalmente mais adaptados às condições edafoclimáticas da região (SANTOS et al., 2008).

A seleção de estirpes eficientes para otimizar o potencial de fixação do N_2 em leguminosas de importância econômica deve levar em conta, além da eficiência da estirpes, características como habilidade de competir com estirpes nativas por sítios de infecção, maior estabilidade genética, maior tolerância a

estresses, habilidade de sobreviver e se multiplicar no solo mesmo na ausência do hospedeiro, formação de nódulos sob larga faixa de temperatura e umidade do solo, dentre outras (HUNGRIA e STACEY, 1997; CHUEIRE et al., 2003).

Vários fatores interferem na eficiência simbiótica das estirpes em condições de campo. Alguns são intrínsecos à bactéria, outros são extrínsecos, envolvendo outros micro-organismos do solo, fatores determinados pelas plantas hospedeiras e, também, fatores nutricionais do solo, como deficiência de cálcio, molibdênio, magnésio e fosfato, além de toxidez de alumínio e manganês (STRALIOTTO, 2002). A fertilidade do solo é fator de destaque na eficiência da associação simbiótica, pois a planta tem que estar em condições favoráveis de nutrição (CORRÊA, 1989). Desse modo, a seleção de estirpes de rizóbios adaptadas às condições edafo-climáticas é essencial. No Brasil, três estirpes de *R. tropici* constam da lista das autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a produção de inoculantes comerciais: SEMIA 4077 (CIAT 899); SEMIA 4080 (PRF 81) e SEMIA 4088 (H 12). A estirpe SEMIA 4077 foi isolada de solos ácidos na Colômbia pelo Dr. Peter Graham e adaptou-se muito bem nos solos no Brasil. As outras duas estirpes, isoladas do Paraná e do Cerrado, foram avaliadas quanto à eficiência simbiótica em experimentos de campo em diferentes agrossistemas (RELARE, 2006). Essas estirpes foram caracterizadas também quanto a características morfo-bioquímicas e genéticas e estão classificadas como *Rhizobium tropici* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991; HUNGRIA et al., 2000; HUNGRIA et al., 2003).

3.6 TAXONOMIA DO RIZÓBIOS

A caracterização das espécie é a chave na sistemática dos procariotos (TINDALL et al., 2010). Embora novas metodologias com base em análises moleculares tenham sido aplicadas, aquelas consideradas tradicionais ainda são utilizadas para determinar se uma espécie pertence a novo táxon. No geral, a taxonomia é frequentemente utilizada como um sinônimo para sistemática e consiste na classificação, nomenclatura e identificação de um organismo (COWAN, 1968). Por sua vez, a classificação consiste no arranjo dos organismos em grupos (táxons) com base em similaridades, enquanto que a nomenclatura é a determinação de nomes para os grupos taxonômicos, de acordo com as regras

internacionais descritas pelo “*International Code of Nom enclature of Bacteria*” (SNEATH e SOKAL, 1973; SNEATH, 1992). Já a identificação é o uso prático da classificação a fim de determinar a identidade de um organismo isolado como membro, ou não, de uma unidade taxonômica. A classificação bacteriana consiste de diversos níveis sendo o maior, chamado de Domínio. Todos os procariotos são localizados dentro de dois Domínios, *Archaea* e *Bacteria*. Para cada Domínio são descritos os Filos, Classes, Ordens, Famílias, Gêneros, espécies e subespécies (GARRITY e HOLT, 2001).

O primeiro relato do gênero *Rhizobium* foi feito por Kirchner, 1886 (FRED et al., 1932; VINCENT, 1982). Naquela época, a classificação dos rizóbios foi baseada em sua especificidade com o hospedeiro, e as bactérias que nodulam o feijoeiro foram classificadas como pertencentes à espécie *Rhizobium phaseoli* (FRED et al., 1932; VINCENT, 1982). Após 50 anos, levando em consideração características fisiológicas, bioquímicas e genéticas, essas bactérias foram reclassificadas na espécie *Rhizobium leguminosarum* *bv phaseoli* (JORDAN, 1984). E ainda, Jordan, separou os rizóbios que tinham crescimento lento e rápido em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono, resultando em dois gêneros: *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, respectivamente (JORDAN, 1984).

A análise histórica dos trabalhos publicados nas últimas três décadas mostra um avanço a partir de 1980 e início da década de 1990, com o estudo de novos isolados bacterianos e o emprego de técnicas de biologia molecular, resultando em uma verdadeira revolução na taxonomia procariótica. Os estudos filogenéticos focaram nos genes ribossomais (RNAr), conseqüentemente, levando à alteração na taxonomia existente. Os resultados obtidos pela análise do gene ribossomal 16S, resultaram na escolha preferencial dessa molécula para estimar relações filogenéticas e, assim, determinar posições taxonômicas em procariotos (WOESE e FOX, 1977; GARRITY e HOLT, 2001).

Através dessas novas ferramentas constatou-se que as bactérias que nodulavam o feijoeiro apresentavam, características fisiológicas e genéticas distintas, levando à definição de novas espécies e biovares (MARTINEZ et al., 1985; QUINTO et al., 1985; BROM et al., 1988).

Com base nas análises fenotípicas e genéticas, os rizóbios são atualmente classificados em 13 gêneros, pertencente ao grupo Alfa-rizóbios: *Allorhizobium* (*Rhizobium*), *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*,

Mesorhizobium, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Shinella*, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*), *Rhizobium* dos quais estirpes podem formar associação simbiótica com plantas da família Leguminosae. Nos últimos anos, algumas espécies de bactérias que fazem simbiose com leguminosas foram descritas, mas incluem gêneros bastante distintos, por exemplo, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Herbaspirillum*, estes pertencente ao grupo Beta-rizóbios (ICSP Subcommittee on the taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* - diversity, phylogeny and systematics, 2012).

3.7 ANÁLISE MOLECULAR PARA DIVERSIDADE DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS

Nos últimos anos a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) está sendo utilizada em diferentes metodologias as quais possibilitaram a detecção, diversidade, classificação e filogenia de micro-organismos. A técnica de PCR é a base para aplicação utilizada em várias metodologias como: a análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), polimorfismo dos espaçadores do DNA ribossômico (IGS – intergene sequences), PCR de sequências repetitivas de DNA (rep-PCR usando “primers” REP, ERIC ou BOX), PCR com “primers” randômicos (RAPD) e análise que utiliza enzimas de restrições em determinadas regiões amplificadas pela PCR (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (LAGUERRE et al., 1994; STRALIOTTO et al., 1999; LAGUERRE et al., 2001; ANDRADE et al., 2002; KASCHUK et al., 2006a).

Dentre as técnicas citadas acima, o BOX-PCR é rápida, de fácil execução e baseia-se na amplificação de sequências repetitivas no genoma bacteriano. Quando um destes elementos repetitivos é detectado dentro de uma distância amplificável durante a reação de polimerase em cadeia, um produto de PCR é gerado com tamanho característico, de modo que o genoma possa gerar um padrão de polimorfismo, deixando uma impressão digital (“fingerprinting”) em um gel de agarose (VERSALOVIC et al., 1994).

3.8 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS MULTILOCUS (MLSA) EM ESTUDOS FILOGENÉTICOS

Em busca de marcadores moleculares universais, pesquisadores demonstraram a utilidade do RNA ribossomal especificamente da subunidade menor do ribossomo de procariotos e eucariotos (16S e 18S) respectivamente. Os principais motivos dessa escolha se devem ao fato de que estes genes são encontrados em todos os organismos vivos, uma vez que a síntese de proteínas ribossomais é obrigatória; expressam estruturas secundárias altamente conservadas, que são consideradas para o alinhamento correto das sequências destes genes. São componentes principais da estrutura dos ribossomos e, portanto, abundantes nas células, facilitando a sua identificação. Posições diferentes das sequências nesses genes evoluíram em taxas diferentes, permitindo que análises filogenéticas sejam realizadas em vários níveis de resolução taxonômica (WOESE e FOX, 1977; WOESE et al., 1990).

Com base nos estudos dos genes ribossomais 16S e 18S, uma árvore filogenética universal foi proposta, onde os organismos foram agrupados nos domínios Bacteria, Archaea e Eucarya. Houve, então, a criação de um banco público onde se pode depositar e consultar sequências de DNA. Com isso, pode-se identificar rapidamente um micro-organismo pela sequência do seu gene ribossomal 16S. Quando a similaridade entre a nova sequência e a estirpe tipo depositada for superior a 97%, indica que são pertencentes à mesma espécie (GEVERS et al., 2005).

Considerando que não só as bactérias podem sofrer transferência lateral de genes e recombinação genética, a análise filogenética bacteriana baseada no gene ribossomal 16S deve ser analisado cuidadosamente (VAN BERKUM et al., 2003; BARCELLOS et al., 2007). Estas observações implicam em que a análise filogenética bacteriana com base exclusivamente no gene ribossomal 16S pode nem sempre refletir exatamente a filogenia dos procariotos. Outra desvantagem do uso exclusivo desse gene nos estudos de taxonomia, filogenia e evolução é que espécies muito relacionadas nem sempre podem ser distinguidas, pelo fato destas apresentarem um alto nível de conservação nas sequências nucleotídicas do gene ribossomal 16S e, assim, as divergências evolutivas ocorridas podem não ser identificadas (STACKEBRANDT et al., 2002).

A técnica de hibridização DNA-DNA desenvolvida em 1970 é utilizada até o momento para definir espécies procarióticas. Nessa metodologia utiliza-se o DNA genômico de uma estirpe tipo para comparar com o DNA genômico do micro-organismo que se deseja identificar. Porém, essa metodologia possui alguns entraves; é um procedimento demorado, e ainda realizado por poucos laboratórios. Outra limitação é que se faz necessário ter o DNA genômico das estirpes tipo para comparação, ainda não é possível utilizar um banco de dados como referência nessa análise. A identificação de novas espécies se dá quando a hibridização DNA-DNA for inferior a 70% entre o genoma da amostra e o da estirpe tipo (GEVERS et al., 2005).

Atualmente, tem sido proposta uma nova estratégia para os estudos de taxonomia e filogenia bacteriana, a qual consiste na análise conjunta de múltiplos genes (*loci*), os quais apresentam uma taxa de evolução mais rápida em relação aos genes ribossomais, mas com um nível de conservação suficiente para conter informações evolutivas (STACKEBRANDT et al., 2002; GEVERS et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009). Desta forma, a análise conjunta de múltiplos genes poderia funcionar como um "tampão" contra efeitos de recombinação ou transferência lateral quando um único gene é analisado.

Genes utilizados como marcadores filogenéticos precisam ser conservados, estarem no genoma em uma única cópia, terem extensão nucleotídica suficiente que permita o sequenciamento e conter informações suficientes para que sejam correlacionados com o gene ribossomal 16S (THOMPSON et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009).

A metodologia de "Multilocus Sequence Analysis" (MLSA) consiste no sequenciamento e análise conjunta, após cada gene ser sequenciado separadamente e, analisado como uma única sequência concatenada de, no mínimo, cinco genes. Na técnica de MLSA, os genes utilizados para análise não precisam ser necessariamente "housekeeping", mas deve estar presentes em todos os organismos em análise (STACKEBRANDT et al., 2002; GEVERS et al., 2005).

Em estudos com rizóbios, utilizando a metodologia do MLSA, foi possível a separação de grupos de indivíduos que antes se acreditavam ser pertencente ao mesmo grupo, levando à identificação de novas espécies. Nesses estudos foram utilizados genes *gltA*, *rpoA*, *atpD*, *dnaK*, *glnII* e *recA* (MENNA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009; NETO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012). Para todas a

estirpes de rizóbios analisadas foram utilizadas as sequências do gene 16S rRNA concatenada com os outros genes selecionados para as análises de MLSA. Estes genes codificam importantes proteínas como: *atpD* codifica a cadeia beta da ATP sintase, *glnII* codifica a glutamina sintetase tipo II, *recA* codifica a proteína de recombinação A, *dnaK* codifica uma proteína chaperone 70kDa, *gltA* codifica citrato sintase tipo I e *rpoA* codifica o RNA da subunidade alfa polimerase.

3.9 DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE RIZÓBIOS NODULANTES DO FEIJOEIRO

Nas últimas décadas a diversidade de estirpes de rizóbios capazes de nodular o *P. vulgaris* tem sido assunto de vários trabalhos na América do Sul (AGUILAR et al., 1998; STRALIOTTO et al., 1999; BERNAL e GRAHAM, 2001; ANDRADE et al., 2002; GRANGE e HUNGRIA, 2004) e, em outros países da África (ANYANGO et al., 1995; BEYENE et al., 2004).

Possivelmente, devido à alta capacidade ou promiscuidade em formar nódulos, o feijoeiro é uma das plantas hospedeiras com maior número de espécies de rizóbios simbioses já descritas. Entre essas espécies estão o *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (JORDAN, 1984), *Rhizobium tropici*, inicialmente denominados de tipo IIA e IIB (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991), *Rhizobium etli* (SEGOVIA et al., 1993), *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* e *Rhizobium giardinii* bv. *giardini* (AMARGER et al., 1997), *Rhizobium lusitanum* sp. nov. (VALVERDE et al., 2006), *Rhizobium multihospitium* (HAN et al., 2008b), *Rhizobium miluonense* (GU et al., 2008), *Rhizobium rhizogenes* (VELÁZQUEZ et al., 2010) e *Rhizobium leucaenae* sp. nov. (RIBEIRO et al., 2012).

Para a definição de novas espécies de micro-organismos procarióticos, recomenda-se o uso da taxonomia polifásica com uma visão multidimensional, buscando interagir informações fenotípicas (morfológicas e bioquímicas) e genotípicas, sendo a árvore filogenética do gene 16S rRNA a base para construir a classificação (VANDAMME et al., 1996; MENNA et al., 2006; BARCELLOS et al., 2007; MENNA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009).

No caso do feijoeiro, possivelmente existam ainda diversas estirpes de rizóbios sem identificação taxonômica definida, podendo representar novas espécies, bem como selecionar bactérias de uma determinada espécie (GRANGE e HUNGRIA, 2004). No Brasil, a espécie *Rhizobium tropici* tem sido de interesse nos

testes de eficiência agrônômica devido a suas características intrínsecas relacionadas à tolerância a alta temperatura e acidez do solo. Recentemente, em um estudo com estirpes de *R. tropici* tipo A foi descrita uma nova espécie, *R. leucaenae* (RIBEIRO et al., 2012).

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DAS ESTIRPES DE RIZÓBIO

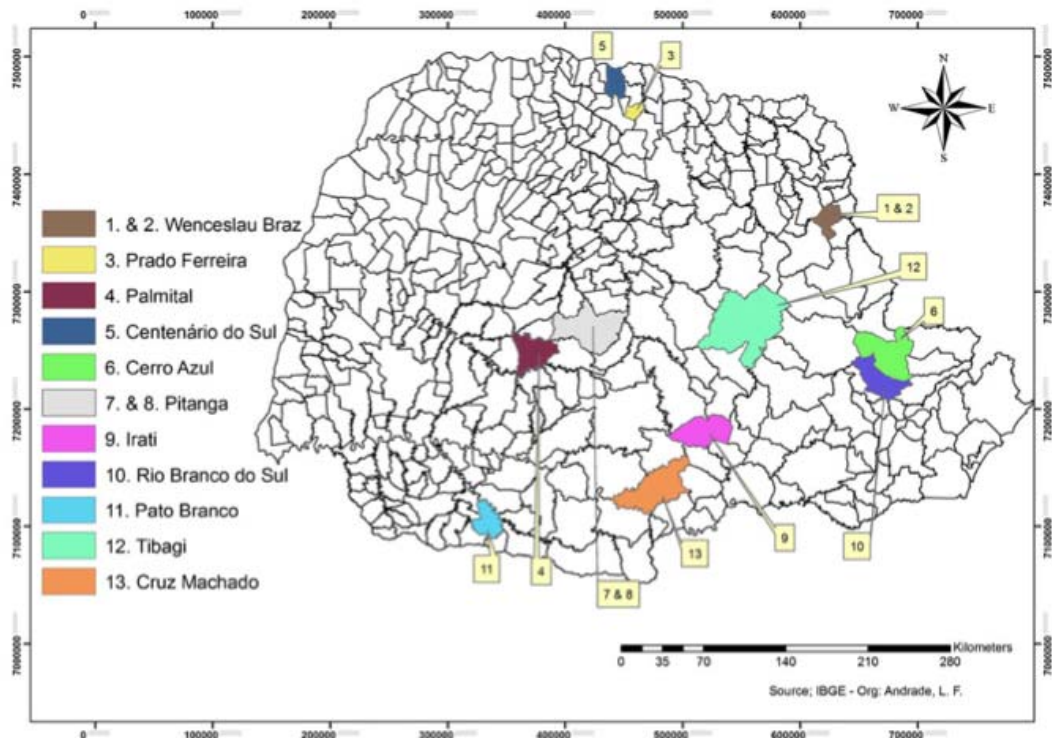
Foram utilizadas 45 estirpe de rizóbios isoladas de sementes, nódulos de feijoeiro, nódulos de amendoineiro (*Arachis hypogaea* L.) e mucuna anã (*Mucuna pruriens*) cultivadas em solos de diversos agroecossistemas. Estas estirpes foram pré-selecionadas de uma população de 1.500 isolados rizobianos de diferentes agro-ecossistemas. Esses isolados foram analisados quanto à eficiência simbiótica (número de nódulos, peso seco da parte aérea e N-total) quando inoculadas em plantas de feijoeiro cultivadas em condições de casa de vegetação, em vasos de Leonard contendo solução nutritiva sem N (listadas na Tabela 1 e figura 4). As estirpes estão depositadas na “Coleção de Microrganismos de Interesse do Agronegócio do Laboratório de Microbiologia do Solo”, IAPAR, Londrina, PR, e são codificadas com a sigla IPR-Pv, sendo que IPR identifica a instituição IAPAR e Pv as iniciais de *Phaseolus vulgaris* a planta hospedeira. Três estirpes de referência: SEMIA 4077 (= CIAT 899), SEMIA 4080 (= PRF 81) e SEMIA 4088 (= H 12)], que são utilizadas em inoculantes comerciais no Brasil para o feijoeiro, foram incluídas nos ensaios. As estirpes IPR sequenciadas estão depositadas também na Coleção SEMIA na Fepagro.

Tabela 1 - Origem e coordenadas geográficas, locais de amostragem e código das bactérias na coleção.

Município/ estado/coletor(s)/data de coleta	Coordenadas geográficas	Clima/ altitude	Cultura	IPR- código da bactéria* ^a
1 Wenceslau Bráz (Sitio Flor da Serra)/PR; D.S. Andrade (28/03/1989)	23° 52' 27" S 49° 49' 14" W	Cfa/850 m	<i>P. vulgaris</i>	Pv3087 ^d
2 Wenceslau Bráz/PR, D.S. Andrade (22/02/2001)	23° 52' 26" S 49° 48' 10" W	Cfa/841 m	<i>P. vulgaris</i>	Pv263 ^c ; Pv348 ^c ; Pv445 ^b ; Pv446 ^b ; Pv453 ^b ; Pv497 ^d ; 506 ^d ; Pv515 ^d ; Pv517 ^d ; Pv524 ^d
3 Prado Ferreira/PR; A.D. Campos (18/02/2000)	23° 02' 20" S 51° 26' 31" W	Cfa/651 m	<i>Coffea arabica</i>	Mp195 ^d ; Pv1045 ^c ; Ah367 ^d
4 Palmital/PR; W.M. Kranz (19/03/1990)	24° 53' 34" S 52° 12' 10" W	Cfb/840 m	<i>Zea mays</i>	Pv680 ^b
5 Centenário do Sul/PR; (30/05/1990)	22° 49' 15" S 51° 35' 42" W	Cfa/560 m	<i>P. vulgaris</i>	Pv685 ^b
6 Cerro Azul/PR; W.M. Kranz (29/03/1990)	24° 49' 26" S 49° 15' 39" W	Cfb/318 m	<i>P. vulgaris</i>	Pv1097 ^b
7 Pitanga (Capoeira velha)/PR; W.M. Kranz (19/03/1990)	24° 55' 35" S 51° 45' 39" W	Cfb/952 m	<i>Zea mays</i>	Pv1249 ^b
8-Pitanga (Boaventura)/PR; W.M. Kranz (19/03/1990)	24° 45' 25" S 51° 45' 39" W	Cfb/952 m	<i>Zea mays</i>	Pv1326 ^b
9 Irati/PR; D.S. Andrade 28/05/1992	25° 28' 01" S 50° 39' 03" W	Cfb/812 m	<i>P. vulgaris</i>	Pv1362 ^c
10 Rio Branco do Sul/PR; W.M. Kranz (28/03/1990)	25° 11' 24" S 49° 18' 50" W	Cfb/	<i>Zea mays</i>	Pv1252 ^b
11 Pato Branco/PR; D.S. Andrade (07/04/1989)	26° 13' 44" S 52° 40' 15" W	Cfa/760 m	<i>P. vulgaris</i>	Pv1281 ^b
12 Tibagi/PR; D.S. Andrade (26/01/04)	24° 30' 32" S 50° 24' 50" W	Cfb/740 m	<i>P. vulgaris</i>	Pv2604 ^d ; Pv2608 ^d
13 Cruz Machado/PR; W.M. Kranz (03/04/1990)	26° 01' 01" S 51° 20' 49" W	Cfb/950 m	<i>Manihot esculent/Oriza sativa</i>	Pv3085 ^b
14 Londrina/PR; D.S. Andrade (26/04/2001)			Sementes	Pv591 ^e ; Pv 598 ^e ; Pv 611 ^e ; Pv 615 ^e ; Pv 696 ^e ; Pv889 ^e ; Pv2230 ^e
Serrinha/MG; D.S. Andrade (20/04/2001)			Sementes	Pv 509 ^e ; Pv580 ^e ; Pv589 ^e ; 593 ^e ; 652 ^e ; Pv689 ^e ; Pv692 ^e ; Pv809 ^e
São Paulo/SP; D.S. Andrade (20/04/2001)			Sementes	Pv583 ^e ; Pv2231 ^e ; Pv2234 ^e ; Pv2248; Pv2303 ^e
Colômbia				SEMIA4077 (CIAT899) ¹
Irati/PR; D.S. Andrade (28/05/1992)	25° 28' 01" S 50° 39' 03" W	Cfb/812 m	<i>Zea mays</i>	SEMIA4080 (PRF81=IPR-Pv81 ^c) ²
Planaltina/Go				SEMIA 4088 (H-12) ³

*IPR Código da bactéria na Coleção de micro-organismo do Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil. ^aHospedeiro original dos nódulos isolados: Ah= *Arachis hypogaea*, Mp=*Mucuna pruriens* e Pv=*Phaseolus vulgaris*. ^bNódulos de plantas isoladas de vasos com solo; ^cNódulos de plantas inoculadas com suspensão de solo; ^dNódulos de plantas crescidas no campo; ^eNódulos de plantas inoculadas com suspensão de sementes; Estirpes referências, ¹(MARTINEZ-ROMERO et al., 1991); ²(HUNGRIA et al., 2000); ³(MOSTASSO et al., 2002).

Figura. 4 - Mapa do Estado do Paraná (Brasil) mostrando os locais de amostragem indicada por números no Estado do Paraná (Para detalhes, ver Tabela 2).



As estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4088 foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio / FEPAGRO, Brasil. Todas as estirpes são mantidas na coleção criopreservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizadas e para as amostras de trabalho foram mantidas em tubos contendo meio ágar levedura manitol (YMA) (VINCENT, 1970) com vermelho Congo (0,00125%), a $4 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA EM SOLO NÃO ESTÉRIL

4.2.1 Preparo do Solo e Adubação

A eficiência simbiótica das 45 estirpes elite de rizóbios foi confirmada em um experimento em casa de vegetação, usando feijoeiro da cultivar IPR-Colibri como planta hospedeira, do grupo carioca, e que apresenta ciclo precoce (65 dias). O experimento foi conduzido na estação experimental do IAPAR, Londrina, Paraná, Brasil. Os potes plásticos foram preenchidos com 3,5 kg de solo coletado da camada

superficial (0-20 cm) de um solo coberto com vegetação natural de gramíneas, sem histórico de cultivo de feijão.

O solo apresentou as seguintes propriedades químicas antes da correção: P (Mehlich) = 5,40 mg dm⁻³; C= 13,84 mg dm⁻³; pH (CaCl₂ 0,01 M)= 4,40; Al= 0,60 cmol_c dm⁻³; H+Al= 7,20 cmol_cdm⁻³; Ca (KCl M)= 1,20 cmol_c dm⁻³; Mg (KCl M)= 0,53 cmol_c dm⁻³; K (Mehlich)= 0,07 cmol_c dm⁻³; S= 1,80 cmol_c dm⁻³; T (capacidade de troca de cátions)= 9,00 cmol_c dm⁻³; V (saturação por bases) = 20%; saturação por Al= 25%

A acidez do solo foi corrigida com calcário dolomítico (29% CaO, MgO 20%) para alcançar 80% de saturação por bases. Após adicionar o calcário, o solo foi coberto com papel e mantidas em casa de vegetação (25 a 26°C) por 30 dias. Após esse período o pH foi determinado em subamostras para verificar a correção da acidez. Porções de 8 cm³ de solo fino e seco foram transferidas para um erlenmeyer de 100 mL contendo 20 mL da solução de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, agitadas por 15 min a 250 rpm e, após 30 min de repouso, foi efetuada a leitura do pH em potenciômetro.

Para a adubação cada vaso contendo 3,5 kg de solo recebeu 4,72 g de superfosfato triplo, 1,33 g de sulfato de potássio e, soluções contendo micronutrientes, em mg vaso⁻¹ (18,54 de H₃BO₃, 13,08 de ZnSO₄.7H₂O, 0,79 de CuSO₄.5H₂O, 9,23 de MnSO₄.H₂O, 0,18 de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 24,2 de FeCl₂.6H₂O.

4.2.2 Número Mais Provável de Rizóbio no Solo

A análise do número de rizóbios no solo foi realizada por número mais provável, segundo Andrade e Hamakawa (1994), em frascos de vidro de 750 mL, contendo 400 mL de solução nutritiva de Norris, suficiente para atender às exigências das plantas pelo período de condução até avaliação realizada. Foi utilizado papel germiteste como suporte, sendo 5 cm maior que o frasco. A folha de papel foi dobrada e teve suas abas fixadas às bordas do frasco com o auxílio de um fio de látex. A parte superior do papel conteve um canal, para segurar as sementes pré-germinadas, que foi formada entre duas folhas do papel e um orifício aberto no centro do canal. Após colocar a solução nutritiva nos frascos, o papel foi inserido já dobrado, cobriram-se os frascos com uma folha de papel alumínio e as duas abas

do papel germiteste foram fixadas ao frasco com o fio de látex. Os frascos foram autoclavados a 121°C durante 30 min. Após o resfriamento, foi realizado um pequeno orifício no papel alumínio, na mesma posição do papel germiteste, onde foi colocada a semente pré-germinada.

As sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão em etanol (95%) durante 1 min, seguido de hipoclorito de sódio (3%) por 3 min e enxaguado sete vezes com água destilada estéril. Após a desinfestação das sementes, essas foram distribuídas de forma individualizada sobre a superfície de um conjunto de duas folhas de papel germiteste e recobertas com mais uma folha do mesmo papel umedecida. O material foi acondicionado em saco plástico e conduzido a um germinador a temperatura de 25°C por 48 h (ANDRADE e HAMAKAWA, 1994). A semente de feijão utilizada foi da cultivar IPR Colibri. Os vasos foram envoltos com papel opaco, a fim de evitar a incidência de luz na região das raízes e levados para a câmara de crescimento. A câmara de crescimento é um local asséptico com: refrigeração com controle automático da temperatura de 28°C; luminosidade de 100 a 1000 lumens, fornecida por lâmpada fluorescentes branca-fria, controladas, automaticamente, por “timer” para fotoperíodo (10 h escuro/14 h claro); sistema automático de manutenção da umidade para 70% e estantes para receber as grades com os vasos de Leonard.

A inoculação das suspensões do solo ocorreu no segundo dia após a transferência das sementes pré-germinadas para os vasos. A diluição seriada decimal do solo foi preparada (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , e os vasos foram inoculados com 1 mL das quatro maiores diluições, em triplicata. Foram incluídos vasos como controles com as estirpes SEMIA-4077, -4080 e -4088 e sem inoculação. A avaliação foi realizada com 25 dias após a inoculação.

4.2.3 Semeadura e Tratamentos

Para a semeadura em vaso contendo solo foi aberto um sulco de aproximadamente, 1 cm de profundidade, colocando-se em média 12 sementes por vaso e aplicando-se o inóculo sobre as mesmas. A inoculação foi realizada com alíquotas de 1 mL de suspensão bacteriana contendo, em média 10^8 células mL⁻¹ de cada estirpe, crescida por 3 dias a 28°C em meio YM, por 72 h, com agitação a 28°C

(VINCENT, 1970). Após seis dias da emergência, foi realizado o desbaste, deixando-se três plantas por vaso.

Os tratamentos incluíram 45 estirpes elite (IPR-Pv) e as três de *R. tropici* autorizadas para inoculante comercial e que estão listadas na Tabela 2. Dois controles não inoculados foram incluídos, com e sem N mineral, este último consistindo de 777 mg N por vaso, divididos em dez vezes, semanalmente, usando uma solução de 2% NH_4NO_3 . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições.

Durante a condução do experimento na casa de vegetação, as plantas de feijão foram mantidas em temperatura controlada e a umidade do solo em torno de 60 a 70% da capacidade de retenção de água, pela adição de água destilada esterilizada pela manhã e à tarde.

No início do florescimento do feijoeiro, estágio fenológico R₆, (MARIOT, 1989), aos 42 dias após a emergência (DAE), as plantas foram coletadas para avaliar os seguintes parâmetros: massa seca da parte aérea (folhas, caule e pecíolos), massa seca das raízes; nodulação (número e massa secas de nódulos), N-total da parte aérea; na seiva do xilema, N-ureído (alantoína e ácido alantóico), N-nitrato e N-total.

4.2.4 Avaliações de Componentes da FBN

4.2.4.1 Coletas das raízes e nódulos do feijoeiro

As raízes do feijoeiro foram retiradas do solo e lavadas em peneira de malha fina (1 mm), desta forma, os nódulos que desprenderam no momento da lavagem foram recuperados. As raízes foram lavadas e congeladas para a separação dos nódulos.

4.2.4.2 Massa seca e nitrogênio total da parte aérea do feijoeiro

A parte aérea do feijoeiro foi lavada com água destilada, colocada em sacos de papel e em estufa de ventilação forçada a 60°C para secagem, até atingir peso constante. O material seco foi pesado para determinação da massa, e moído para a avaliação do teor de N acumulado, pelo método de micro Kjeldahl.

4.2.4.3 Determinação do N-ureído na Seiva do Xilema

Para as coletas da seiva das plantas do feijoeiro, foi adotado o procedimento descrito por Hungria (1994). De um modo geral, a seiva do xilema das leguminosas flui mais facilmente pela manhã e com o solo úmido. Portanto, na véspera da coleta, ao final da tarde os vasos foram irrigados com quantidade suficiente de água para obter a seiva do xilema com uma maior facilidade. No momento da coleta, pelo período da manhã, o caule foi lavado com água destilada para retirar as impurezas e evitar contaminação da seiva e, em seguida, foi cortado a 2-3 cm de distância do solo. O tempo de exsudação por planta foi monitorado durante 10 min. A seiva foi coletada com auxílio de micropipetas de 100 μL e colocada em tubos de microcentrifuga que foram mantidos em gelo e, logo em seguida, transferidos para um congelador (-18°C), e armazenados até o momento de análise.

A metodologia utilizada para determinação do teor de N-ureído foi baseada no método da hidrólise alcalina da alantoína (HUNGRIA e NEVES, 1987; HERRIDGE et al., 1990). Para a análise, da seiva retiraram-se alíquotas dos microtubos de armazenamento, retornando os rapidamente ao congelador e evitando ao máximo o descongelamento frequente. Foram utilizadas alíquotas de 5 μL de seiva e 745 μL de água destilada, em seguida, foram adicionados 250 μL de NaOH 0,5 N, procedeu-se à mistura em agitador tipo vórtex. Os tubos foram cobertos com papel de alumínio e aquecidos em banho-maria, a 100°C , por 8 min. Os tubos foram resfriados em um recipiente contendo cubos de gelo picado, foram adicionados 250 μL de HCl 0,65 N e os tubos foram novamente aquecidos por 4 min a 100°C . A seguir, foram resfriados em gelo, adicionados 250 μL de tampão fosfato 0,4 M, pH 7,0 e, em seguida, 250 μL de fenilhidrazina, retirando-se do gelo, homogeneizando-se no agitador vórtex, e deixando-se os tubos em temperatura ambiente por 5 min. Os tubos foram colocados em gelo, e adicionados 1,25 mL de HCl concentrado pré-resfriado a 0°C e, em seguida, 250 μL de ferricianeto de potássio, também pré-resfriado. Os tubos foram então retirados do gelo, homogeneizados e após 10 min foi realizada a leitura em absorbância a 535 nm em espectrofotômetro.

A curva de calibração foi construída com padrões preparado nas concentrações de 0,000, 0,930, 1,867, 3,733, 5,600 e 7,460 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de alantoína.

Para isso, pipetaram-se 0, 25, 50, 100, 150 e 200 μL de alantóina 0,5 nM (79 mg 100 mL^{-1} de água). Cada tubo de ensaio foi completado para 750 μL com água destilada e procedido como para as amostras. Para não ocorrer a perda da cor da solução, a leitura das amostras foi realizada em 20 a 30 min.

Na hidrólise ácida para determinar o ácido alantóico, a metodologia utilizada foi a descrita por (HUNGRIA e NEVES, 1987; HERRIDGE et al., 1990). Uma alíquota de 5 μL de seiva foi adicionada em um tubo de ensaio, e junto com a seiva, 995 μL de água destilada. A seguir, foram adicionados 250 μL de HCl 0,15 M, os tubos foram cobertos com papel alumínio e colocados em banho-maria a 100 °C por 4 min. A seguir, os tubos foram resfriados em cubos de gelo e adicionaram-se 250 μL de tampão fosfato 0,4 M pH 7,0 e, em seguida, 250 μL de fenilhidrazina. Procedeu-se à homogeneização em agitador do tipo vórtex e os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 5 min. Com os tubos na capela de exaustão e no gelo, adicionaram-se 1,25 mL de HCl concentrado e pré-resfriado e, em seguida, 250 μL de ferricianeto de potássio, também pré-resfriado. Retiraram-se os tubos do gelo, homogeneizou-se e, após 10 min, foi realizada a leitura da absorbância a 535 nm em espectrofotômetro.

A curva de calibração da hidrólise ácida foi constituída nas concentrações de 0,000, 0,693, 1,2785, 2,5570, 3,8355 e 5,1140 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido alantóico. Para isso, pipetaram-se 0, 25, 50, 100, 150, e 200 μL de ácido alantóico 0,5 nM (0,0093 g 100 mL^{-1} de água). O volume de cada tubo foi completado para 1 mL de água destilada, seguindo-se todos os procedimentos tomados como para as amostras. As leituras foram feitas em 20 a 30 min, pois após este período, começa a ocorrer perda de cor.

A solução de fenilhidrazina foi preparada diluindo-se 8,25 mg de fenilhidrazina em 25 mL de água destilada e preparada uma solução de ferricianeto de potássio, diluindo-se 417 mg de ferricianeto de potássio em 25 mL de água destilada.

4.2.4.4 Determinação do N-total na seiva

A determinação do N-total acumulado na seiva do xilema foi determinada pela digestão de micro Kjeldahl e as leituras em espectrofotômetro. Alíquotas de 5 µL de seiva foram colocados em tubos de digestão e adicionado 0,05 mL da mistura de Kjeldahl (203 g de Na₂SO₄. 10 H₂O, dissolvidos em 300 mL de água deionizada, 230 mL de ácido sulfúrico concentrado, 5,4 g de HgCl₂ dissolvidos em 200 mL de água deionizada). Os tubos foram colocados no bloco digestor a 150°C por 60 min para evaporação da água, em seguida, aumentando a temperatura para 300°C por 90 min. Resfriou-se à temperatura ambiente e adicionou-se 0,5 mL de água deionizada. A seguir, adicionaram-se 2,5 mL da solução A (5 g de fenol + 0,025 g de nitroprussiato de sódio em 500 mL de água deionizada) e 2,5 mL da solução B (15 g de NaOH + 0,31 g de dicloroisocianurato de sódio em 500 mL de água deionizada). Após 30 min, realizou-se a leitura da absorbância a 630 nm em espectrofotômetro (HUNGRIA e NEVES, 1987; HERRIDGE et al., 1990).

4.2.4.5 Cálculo da eficiência relativa

A capacidade relativa simbiótica foi calculada com base no N total na parte aérea das plantas inoculadas e os tratamentos com N mineral, enquanto a capacidade de nodulação foi com base na massa de nódulos dos tratamentos inoculados com as estirpes IPR e com o controle do tratamento inoculado com a SEMIA4077. A formula foi adaptada de Brockell et al (1966) como a seguir:

$$C_{sn} = (I-U)/(N-U) \times 100$$

Onde:

I = média do nitrogênio total na parte aérea das plantas do tratamento inoculado ou massa de nódulos;

U = média do nitrogênio total na parte aérea das plantas do tratamento não inoculado ou massa de nódulos;

N = média do nitrogênio total na parte aérea das plantas do tratamento que recebeu N mineral ou massa de nódulos do tratamento inoculado com a estirpe SEMIA4077.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados originais de componentes de planta e da fixação biológica de N₂ foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando o F foi significativo (1 ou 5%), foi aplicado o teste de médias Scott Knott a 5% de probabilidade.

Para obter as componentes principais, os dados foram submetidos à análise utilizando o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System) utilizando o procedimento "PRINCOMP" (SAS, 1999). As variáveis principais selecionadas foram baseadas nos seguintes dados: massa da parte aérea seca, concentração de N total na parte aérea (g kg⁻¹), N total na parte aérea (mg planta⁻¹), N-ureído (nmol) na seiva do xilema.

A partir dos dados gerados da análise de componentes principais (ACP) usou-se o "PROC CLUSTER" e o método "COMPLETE" como técnica para gerar o dendrograma por meio do procedimento "PROC TREE" do SAS (SAS, 1999). Ao final desta análise, obteve-se um dendrograma a partir de matriz de distância euclidiana.

4.4 ANÁLISE MORFO-FISIOLOGICAS E MOLECULAR

4.4.1 Caracterização Morfo-Fisiológicas das Estirpes de Rizóbio

Para verificar a alteração de pH do meio, as estirpes de rizóbio foram inoculadas em meio de cultura YMA (VINCENT, 1970), modificado pela adição de 10 mL L⁻¹ de azul de bromotimol. Após sete dias a 28°C, a alteração ou não da coloração do meio de cultura foi anotada, sendo: azul reação alcalina; coloração amarela, reação ácida; e a não alteração da cor do meio de cultura, considerada neutro.

A detecção da produção de melanina pelas estirpes de rizóbio foi realizada conforme Cubo (1997). As estirpes foram repicadas em meio de cultura TYA, suplementado com 1,2 mg de L-tirosina e 40 µg de sulfato de cobre em 1000 mL de água destilada. Após sete dias crescimento a 28°C no escuro adicionou-se solução de SDS 10% (peso/volume) sobre as colônias, para lisar a parede celular, deixou-se em temperatura ambiente (25°C) e depois de 6 h verificou-se a alteração

de coloração das colônias. As colônias que não apresentaram pigmentação não produzem melanina, e as colônias que apresentaram coloração marrom ou preta produzem melanina (ANDRADE et al., 2002).

As características morfológicas das colônias de rizóbios foram caracterizadas quanto ao tamanho, forma, elevação, bordos, estrutura, brilho, cor, aspecto e produção de goma após crescimento em placas contendo meio de cultura solidificado, seguindo as metodologias descritas por Vincent (1970; 1994).

4.4.2 Agrupamento das Estirpes com Base em Dados Morfo-Fisiológicos

Com base nos fenótipos das culturas de rizóbio foi construída uma matriz binária dos dados originais com as características morfo-fisiológicas e suas variações, para as 45 estirpes (IPR) e das estirpes recomendadas comercialmente para a cultura do feijoeiro. Para cada característica foram atribuídos valores de 1 (presente) ou 0 (ausente). A análise de agrupamento de similaridade e as diferenças foram estimadas pela distância euclidiana com a opção UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic averages). As estirpes foram agrupadas e representadas graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 2.1t) (ROHLF, 1994).

4.4.3 Extração de DNA Genômico

Para a extração de DNA genômico, as bactérias foram crescidas em meio YMA com agitação por três dias a 28°C. As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 min e lavadas por três vezes com solução salina (NaCl 0,85%). Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 400 µL de TE 50/20 (Tris a 50 mM, pH 8,0; 10 mM de NaCl e 10 mM de EDTA pH 8,0). Após a adição de 50 µL de SDS a 10% (10 g de lauril sulfato de sódio em 100 mL de água), 5 µL de proteinase K (20 mg mL⁻¹ de água, mantida a -18°C), 10 µL de lisozima (5 mg mL⁻¹ de água, mantida a -18°C), 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, as amostras foram incubadas por 1 h a 37°C. Após esse período, as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de uma pipeta, movimentando para dentro e para fora por três vezes, para retirar a viscosidade. Foram acrescentadas soluções de NaCl 5 M para uma

concentração final de 250 mM e AcONa 5 M para uma concentração final de 300 mM. As amostras foram bem homogeneizadas e permaneceram em repouso por 1 h a 4°C. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 g por 15 min, recolhendo-se 300 µL do sobrenadante e adicionando-se 2 volumes de etanol absoluto gelado a 95%. As amostras foram armazenadas por 1 noite à -20°C ou 15 min à -72°C e, depois, centrifugadas a 12.000 g por 15 min e o etanol descartado. Adicionou-se etanol gelado a 70% para lavar o DNA precipitado, retirando o excesso de sais. As amostras foram novamente centrifugadas e após secagem em temperatura ambiente os precipitados foram ressuspensos em TE 10:1 (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8.0). As soluções de NaCl, Tris-HCl, EDTA Na₂, SDS, AcONa e TE usadas na extração do DNA foram previamente autoclavadas.

As amostras de DNA foram corridas em gel de agarose de 8 x 20 cm a 0,9%, durante 30 min a 90 V. A seguir, foi realizada a coloração com brometo de etídio durante 20 min e visualizada em transluminador emitindo luz ultra-violeta de comprimento curto. Pode-se então confirmar a concentração e a pureza das amostras de DNA extraído.

4.4.4 Análise de PCR-RFLP do Gene Ribossomal 16S

Uma alíquota de DNA extraído de cada estirpe de rizóbios foi submetida à amplificação com os oligonucleotídeos fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') que amplifica a região do DNA que codifica o 16S rDNA (WEISBURG et al., 1991), uma região altamente conservada entre as eubactérias (LAGUERRE et al., 1994). Para a reação de PCR-16S foram utilizados 36,3 µL de água bidestilada estéril, 3 µL de dNTPs (1,5 mM de solução para cada um dos quatro nucleotídeos), 5 µL tampão 10X, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,5 µL de cada oligonucleotídeo fD1 e rD1 (10 pmol µL⁻¹), 1 µL de Taq polimerase (1U µL⁻¹) e 1 µL de DNA (50 ng/µL). Para as reações de amplificações, os termocicladores utilizados foram os modelos MJ Research Inc. PTC-100TM e Techne TC-412, com os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 2 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 s, 93°C por 45 s, anelamento dos oligonucleotídeos a 55 °C por 45 s e extensão a 72°C por 2 min; 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 min; manutenção a 4°C.

A análise de RFLP foi realizada como descrito por Laguerre et al. (1994), em que o produto da amplificação obtido com os oligonucleotídeos fD1 e rD1 da região 16S rDNA foi digerido com as enzimas de restrição *Msp* I (=Hsp I) (5' - C/CGG -3'), *Hinf* I (5' - G/ANTC - 3'), *Rsa* I (5' - GT/AC - 3'), e *Hha* I (=CfoI) (5' - GCG/C - 3') (InvitrogenTM, Life Technologies). Para cada reação, foi preparada uma mistura contendo 6 µL do produto do PCR; 1 µL de tampão específico (10X) para cada enzima; 0,5 µL de enzima (10U µL⁻¹) e 2,5 µL de água milli-Q estéril. As misturas foram incubadas a 37°C por no mínimo 12 h. Os fragmentos obtidos foram analisados em gel eletroforese horizontal contendo 3% de agarose, em 3,7 volts cm⁻¹ por 4 h. Foi aplicado 0,4 µL do padrão de peso molecular de 100 Kb Plus Dna Ladder. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas visualizadas em transluminador com lâmpada ultravioleta.

4.4.5 Amplificação do PCR com Oligonucleotídeo Específico BOX

A partir do DNA total extraído dos isolados, procedeu-se à amplificação de regiões repetitivas do DNA utilizando BOX -A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC et al., 1994). Foram, então, utilizados 5 µL de água (mili Q esterilizada); 6 µL de dNTPs [1,5mM de solução para cada um dos quatro nucleotídeos (C, G, T e A)]; 2,5 µL de tampão 10 X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3); 1,2 µL de MgCl₂ 50 mM; 1,5 µL do "primer" (50 pmol µL⁻¹); 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U µL⁻¹) e 1 µL de DNA (50 ng), tendo um volume final de 18,9 µL. O programa para amplificação consistiu de: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 7 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 40°C por 1 min e extensão a 65°C por 8 min; 1 ciclo final de extensão a 65°C por 16 min; mantendo-se a 4°C. Os fragmentos do produto da amplificação foram separados em um gel de agarose (20 x 25 cm) a 1,5%, e utilizado 4 µL do padrão de peso molecular de 1kb (plus DNA LadderTM-Gibco- Life Technologies). A eletroforese foi feita sob corrente elétrica de 3 volts cm⁻¹ por 6 h. Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados em transluminador com lâmpada ultravioleta.

4.4.6 Agrupamento das Estirpes

A análise do agrupamento foi realizada com os perfis do RFLP-PCR e com BOX A1R-PCR com auxílio do programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v.4.6), usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J) (SNEATH e SOKAL, 1973) com tolerância de 2% para o RFLP-PCR e 10% para o BOX-PCR.

4.4.7 Sequenciamento de Genes

Para o sequenciamento do gene 16S, foram utilizados produtos da amplificação do PCR de 17 estirpes obtidos com os oligonucleotídeos fD1 e rD1 da região 16S rRNA, conforme descrito anteriormente na seção 6.4.4.

4.4.7.1 Purificação do produto da PCR

O produto de PCR foi purificado segundo o protocolo do kit de purificação PureLink (Invitrogen ®). Foram adicionados 200 µL de tampão de purificação PureLink “binding buffer” ao tubo contendo o produto da PCR. A solução foi homogeneizada e transferida para a coluna de purificação, centrifugada a 12.000 g por 1 min e o conteúdo do filtrado descartado. No centro da coluna foram adicionados então 650 µL do tampão de lavagem PureLink “wash buffer” e centrifugado novamente a 12.000 g durante 1 min. Este novo filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para um tubo do tipo eppendorf com capacidade para 1,5 mL, onde foram adicionados 50 L do tampão de separação de DNA PureLink “elution buffer”. Após 3 min de incubação em temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada por 2 min a 12000 g. O volume eluído foi quantificado em gel de agrose a 0,8%, corado com brometo de etídio, para visualização da qualidade das bandas.

4.4.7.2 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Como a região do gene 16S rRNA contém aproximadamente 1.500 pb, foram utilizados cinco oligonucleotídeos para obter a região completa. Os oligonucleotídeos foram fD1 e Y2 (WEISBURG et al., 1991; YOUNG et al., 1991) (região alvo do gene em *Escherichia coli* K12362-339); 362f (região alvo 339-362) (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-3'), 786f (região alvo 764-786) (5'-CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3) e 1203f (região alvo 1179-1203) (5'-GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC-3') (MENNA et al., 2006).

4.4.7.3 Sequenciamento de genes para análise por MLSA

A partir do DNA de seis estirpes que apresentaram dissimilaridade do gênero *Rhizobium* pela análise das sequências do gene 16S rRNA, foram amplificadas as regiões do DNA codificado para três genes (Tabela 2).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos e seus respectivos ciclos utilizados para amplificação de três genes utilizados nas análises de MLSA.

Gene (pb)	Primer	Sequencia 5' – 3'	Ciclos	Ref.
gltA (1290)	gltA428F gltA1111R	CSGCCTTCTAYCAYGACTC GGGAAGCCSAKCGCCTTCAG	5 min 95°C, 3x (2 min 94°C, 2 min 53°C, 1 min 72 °C), 30x (30 s 94°C, 1 min 53°C, 1 min 72 °C), 5 min 72°C	(MARTENS et al., 2007)
recA (1090)	recA6F recA555R	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT	5 min 95°C, 32x (45 s 94°C, 1 min 60°C, 1 min 30 s 74°C), 5 min 72°C	(GAUNT et al., 2001)
rpoA (1010)	RRrpoaf RRrpoar	GGAAATCGCCATCAAGATGG GGAAATCGCCATCAAGATGG	5 min 94°C, 30x (30 s 94°C, 45 s 56°C, 45 s 72 °C,) 10 min 72°C	(RIBEIRO et al., 2009)

Após os ciclos de amplificação os produtos foram confirmados em gel de agarose a 0,8% e corados com brometo de etídeo e visualizados em transluminador com lâmpada ultravioleta. As amostras que apresentaram amplificação foram purificadas com Kit de purificação Purelink como descrito anteriormente.

4.4.7.4 Reações de sequenciamento

Para cada reação foi utilizado 0,5 μL de Big Dye Terminator (Kit Big Dye terminator 3.1), 2 μL de tampão de sequenciamento (200 mM TrisHCl e 5 mM MgCl_2), 1 μL de oligonucleotídeo (3,2 pmol), 40 ng de produto de PCR purificado e completado com água para volume final de 20 μL de reação. As PCR foram realizadas em microplacas de 96 poços. O mesmo programa foi utilizado com todos os iniciadores, como se segue: desnaturação inicial de 95°C por 2 min; 30 ciclos de desnaturação a 95°C para 10 s, anelamento do oligonucleotídeo de 50°C por 4 s, e extensão a 60°C por 4 min e, após os ciclos, temperatura de 4°C.

4.4.7.5 Precipitação dos produtos amplificados

Após a amplificação foram adicionados 80 mL de isopropanol 85% (temperatura ambiente). A placa foi selada, homogeneizada em vórtex por 10 s e deixada em repouso por 15 min a temperatura ambiente no escuro e centrifugada a 4.000 g durante 45 min. O sobrenadante foi descartado sobre papel absorvente para secar. Após a secagem, o sedimento recebeu 100 μL de etanol a 70%, preparado no momento, e a placa foi selada, homogeneizada novamente e centrifugada a 4000 g durante 45 min, e o sobrenadante descartado. A placa foi centrifugada invertida sobre papel absorvente a 300 g durante 10 s. O pellet foi seco a 95°C por 30 s em termociclador e ressuspenso em 10 μL de formamida HiDi (Applied Biosystems). A placa foi selada e agitada em vórtex por 10 s e desnaturada em termociclador a 95°C por 2 min. Após a desnaturação, as amostras foram colocadas imediatamente no gelo por 2 min e centrifugadas para remover as bolhas. Os produtos foram então colocados no sequenciador automático Applied Biosystems 3130 xl.

4.4.8 Análise e Agrupamento das Sequências

As sequências foram analisadas e corrigidas manualmente com o programa BioEdit (HALL, 1999), submetidas no banco de dados GenBak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para alinhamento significativo. As sequências obtidas no estudo e do GenBank foram alinhadas utilizando o clustalW (THOMPSON et al., 1994) no programa MEGA versão 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

(TAMURA et al., 2011). O programa MEGA 5 foi utilizado também para o cálculo das distâncias, posições nucleotídicas variáveis pelo algoritmo neighbor-joining (SAITOU e NEI, 1987). O suporte estatístico das árvores foi dado pela análise de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 repetições (HEDGES, 1992).

4.4.9 Amplificação do Gene *nifH*

O DNA extraído das estirpes IPR-*Pv* 515, 583, 615, 689, 696, 1281, 1252, 2608 e 3085 e o das três SEMIAS (4077, 4080 e 4080) utilizadas como referência foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos *nifH* - *nifHF* (5'-TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA-3') e *nifHI* (5'-AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA-3') (LAGUERRE et al., 2001). O volume final da reação foi de 50 µL e os ciclos de amplificação foram realizados como segue: inicial de 30 s por 95°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s à 63°C, 2min a 72°C e final de 3 min a 72°C. A amplificação foi confirmada em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado em luz UV.

4.4.10 Índices de diversidade

Com base nos agrupamentos formados pelas análises de eficiência simbiótica, morfo fisisológica, caracterização BOX PCR, análise RFLP-PCR 16S RNA e o sequenciamento do gene 16S RNA, foram calculados os índices de diversidade e riqueza. Os cálculos foram realizados com auxílio do programa PAST (HAMMER et al., 2001).

RESULTADOS

5.1 Eficiência Simbiótica das Estirpes de Rizóbios IPR

A massa seca das plantas de feijoeiro variou de 4,21 a 7,52 g planta⁻¹, quando inoculadas com as estirpes IPR-Pv 2604 e Pv-445, respectivamente. O N total na parte aérea também foi alterado significativamente conforme as estirpes inoculadas, variando de 62 a 198 mg planta⁻¹. Com base no N total da parte aérea, dois grupos principais foram observados, um grupo constituído de 11 estirpes bastante eficientes, acumulando de 138 a 198 mg N planta⁻¹ sem diferir do tratamento com aplicação de N mineral. O segundo grupo apresentou menos N total do que as plantas supridas com N mineral. A quantidade de N-ureído variou de 33% a 87% nas plantas inoculadas, os maiores e menores valores obtidos foram com as estirpes IPR-Pv 509 e Pv-591, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Variáveis associadas com fixação biológica de N₂ com cultivar de feijoeiro IPR Colibri obtidos no experimento realizado em casa de vegetação em vasos contendo solo não estéril

IPR-	Massa seca (g plant ⁻¹)	N na parte aérea (mg plant ⁻¹)	N Total da seiva do xilema (µg mol mL ⁻¹)	N-ureido (%)	Número de nódulos	Massa total de Nódulos (mg dry weight plant ⁻¹)	Massa individual Nódulos	Índice de eficiência relativa (IER)	
								Ntotal	Nod
Mp 195	4,26 A	106 A	115,5 A	63,6 B	602,4 B	564 C	0,9384 B	20	200
Pv 263	6,01 A	145 B	66,8 A	82,7 C	485,6 B	406 C	0,8696 B	54	140
Pv 348	5,40 A	110 A	110,4 A	68,1 B	393,2 B	428 C	1,1724 B	23	148
Ah 367	7,51 B	198 B	94,9 A	62,3 B	664,9 B	494 C	0,7920 A	100	173
Pv 445	7,52 B	156 B	60,3 A	74,9 C	497,6 B	433 C	0,8903 B	63	150
Pv 446	5,82 A	125 A	227,8 A	63,9 B	655,9 B	526 C	0,8080 A	37	185
Pv 453	4,87 A	111 A	115,9 A	73,2 C	454,9 B	443 C	0,9728 B	24	154
Pv 497	5,20 A	108 A	112,0 A	74,7 C	652,3 B	499 C	0,7655 A	22	175
Pv 506	4,81 A	107 A	88,7 A	78,0 C	465,2 B	465 C	1,0546 B	21	162
Pv 509	5,38 A	75 A	157,8 A	33,4 A	608,9 B	355 C	0,5848 A	-7	120
Pv 515	5,91 A	140 B	70,8 A	59,2 B	281,7 A	196 A	0,5126 A	50	60
Pv 517	4,53 A	115 A	136,1 A	61,3 B	342,0 A	235 B	0,6317 A	28	75
Pv 524	5,74 A	138 B	137,4 A	71,2 C	417,9 B	475 C	1,1330 B	48	166
Pv 580	7,02 B	162 B	60,0 A	79,2 C	229,2 A	146 A	0,5960 A	69	41
Pv 583	4,36 A	89 A	95,4 A	81,3 C	206,1 A	162 A	0,5086 A	5	47
Pv 589	6,75 B	110 A	89,6 A	74,1 C	501,4 B	375 C	0,7568 A	23	128
Pv 591	5,51 A	130 A	107,1 A	86,8 C	512,6 B	488 C	0,9779 B	41	171
Pv 593	6,57 B	175 B	85,8 A	73,4 C	343,4 A	243 B	0,7697 A	80	78
Pv 598	5,46 A	118 A	93,7 A	69,5 C	365,3 A	291 B	0,8214 A	30	96
Pv 611	5,49 A	119 A	188,0 A	78,9 C	423,4 B	428 C	1,0597 B	31	148
Pv 615	7,44 B	126 A	105,0 A	77,5 C	485,7 B	291 B	0,5897 A	37	96
Pv 652	6,81 B	169 B	50,0 A	77,2 C	593,2 B	458 C	0,8115 A	75	159
Pv 680	5,93 A	136 A	113,2 A	70,4 C	435,4 B	493 C	1,1656 B	46	173
Pv 685	5,46 A	123 A	163,2 A	57,9 B	452,8 B	468 C	1,0535 B	35	163
Pv 689	5,53 A	96 A	93,7 A	65,0 B	406,4 B	304 B	0,7480 A	11	101
Pv 692	7,10 B	103 A	96,1 A	63,1 B	589,5 B	404 C	0,6891 A	17	139
Pv 696	4,81 A	92 A	82,5 A	72,8 C	440,6 B	468 C	1,2564 B	8	163
Pv 809	5,05 A	89 A	102,6 A	68,0 B	412,3 B	425 C	1,0383 B	5	147
Pv 889	5,24 A	103 A	115,9 A	71,4 C	488,6 B	477 C	1,0649 B	17	167
Pv 1045	6,02 A	110 A	105,3 A	72,8 C	561,6 B	520 C	0,9254 B	23	183
Pv 1097	5,70 A	134 A	115,9 A	67,9 B	330,4 A	246 B	0,7226 A	44	79
Pv 1249	5,67 A	111 A	109,2 A	65,8 B	518,1 B	507 C	0,9798 B	24	178
Pv 1252	4,90 A	120 A	101,3 A	64,6 B	537,0 B	484 C	0,9236 B	32	169
Pv 1281	5,69 A	128 A	127,5 A	63,0 B	478,6 B	472 C	1,0347 B	39	165
Pv 1326	7,13 B	169 B	87,1 A	74,4 C	495,8 B	472 C	1,0730 B	75	165
Pv 1362	4,69 A	103 A	119,7 A	56,6 B	543,4 B	500 C	0,9866 B	17	175
Pv 2230	4,80 A	95 A	138,9 A	71,7 C	424,8 B	344 B	0,8190 A	10	116
Pv 2231	5,02 A	114 A	152,5 A	65,8 B	492,9 B	372 C	0,7551 A	27	127
Pv 2234	5,92 A	115 A	125,8 A	72,5 C	403,4 B	416 C	1,0296 B	28	143
Pv 2248	5,94 A	118 A	131,8 A	54,3 B	459,2 B	366 C	0,7769 A	30	124
Pv 2303	4,63 A	87 A	101,2 A	78,5 C	491,0 B	416 C	0,8465 B	3	143
Pv 2604	4,21 A	62 A	110,9 A	57,7 B	417,8 B	379 C	0,9073 B	-18	129
Pv2608	7,34 B	172 B	163,0 A	61,0 B	546,5 B	263 B	0,4809 A	77	85
Pv3085	5,81 A	126 A	107,7 A	73,2 C	594,0 B	529 C	0,8891 B	37	186
Pv3087	7,36 B	164 B	77,7 A	77,3 C	451,1 B	325 B	0,7163 A	70	109
4077	7,60 B	131 A	102,6 A	77,5 C	673,3 B	302 B	0,4477 A	42	100
4080	6,68 B	114 A	99,4 A	75,6 C	545,3 B	365 C	0,6617 A	27	124
4088	7,44 B	99 A	98,3 A	66,4 B	749,8 B	303 B	0,4234 A	14	100
Controle	5,53 A	83 A	83,2 A	63,2 B	208,0 A	39 A	0,2675 A	0	0
Nitrogênio	11,23 C	198 B	99,9 A	57,0 B	510,7 B	202 A	0,4498 A	100	62
Pr > F	<0,0001	0,0003	0,0006	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002		
CV (%)	16,65	28,17	33,98	9,26	14,37	25,70	30,71		

Médias seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5% de acordo com Scott Knott. Índice de Eficiência Relativa (IER) = (T - C/ N-C) X 100, onde T, C e N = Ntotal parte aérea em cada tratamento, no controle e no com N mineral, respectivamente.

A população naturalizada dos rizóbios no solo do estudo foi estimada em 10^6 UFC por g, apesar de não ter histórico recente de cultivo com feijoeiro na área de onde foi proveniente. Portanto, as plantas dos tratamentos não inoculados formaram nódulos, e o N-ureído foi estimado em 57% e 63% nos tratamentos controle com e sem N mineral, respectivamente.

Em geral, o feijoeiro apresentou nódulos pequenos, no entanto, em alguns tratamentos inoculados, os nódulos apresentaram massa individual maior do que 1 mg. O índice de eficiência relativa simbiótica com base no N total na parte aérea e na massa de nódulos revelou que algumas estirpes IPR tiveram alta eficiência, por exemplo, IPR-*Ah* 367 e IPR-*Mp* 195, respectivamente, enquanto outras, como a estirpe IPR-*PV* 2604, apresentou baixo índice fixador de N_2 (Tabela 3).

Os componentes relacionados à FBN foram submetidos a uma análise estatística multivariada: massa seca da parte aérea, N total da parte aérea, N total na seiva do xilema, percentual de N-ureído, massa seca de nódulos individuais e massa total de nódulos secos por planta. A associação entre as técnicas de análise multivariada de componente principal (Principal Component Analysis, PCA) e análise de agrupamento foi utilizada para auxiliar na seleção de estirpes eficientes, um procedimento recomendado quando mais de quatro variáveis são analisadas. Os auto-valores da matriz de correlação foram escolhidos com base em três componentes principais, explicando 81% de variação.

Os auto-valores foram de 2,38 para PC1, 1,35 para PC2, e 1,10 para PC3, e as proporções de variância foram de 40%, 22% e 18%, respectivamente.

Os coeficientes de correlação de Pearson e suas probabilidades são apresentados na tabela 5. As variáveis de massa seca da parte aérea ($r = 0,784$, $p < 0,0001$ **), massa seca de nódulos ($r = 0,720$, $p < 0,0001$ **), e massa seca de nódulos individuais ($r = 0,772$, $p < 0,0001$ **) foram altamente correlacionados com o primeiro componente. Por outro lado, a variável que representa o N total na parte aérea (mg por planta) correlacionou-se significativamente com o segundo componente ($r = 0,782$, $p < 0,001$ *), enquanto as variáveis relacionadas com N total na seiva do xilema ($r = 0,682$, $p < 0,001$ *) e para a % de N-ureído ($r = 0,698$, $p < 0,001$ *) mostrou correlação significativa com o terceiro componente (Tabela 4).

Tabela 4 - Coeficientes de correlação de Pearson (N = 50) entre variáveis associadas à FBN.

	Massa seca (g)	N na parte aérea (mg)	N Total da seiva do xilema	N-ureído (%)	Nódulos totais (mg)	Nódulos individual (mg)	PC1 (Y1)	PC2 (Y2)	PC3 (Y3)
Massa seca (g)	1.000	0.718**	-0.187ns	-0.178ns	-0.269ns	-0.423*	-0.784**	0.462**	0.199ns
N na parte aérea (mg)		1.000	-0.187ns	-0.046ns	-0.072ns	-0.111ns	-0.577**	0.728**	0.190ns
N Total da seiva do xilema			1.000	0.266ns	0.184ns	0.079ns	0.401*	-	0.682**
N-ureído (%)				1.000	0.159ns	0.191ns	0.389*	0.094ns	0.698**
Massa de nódulos (mg pl ⁻¹)					1.000	0.780**	0.720**	0.575**	-0.135ns
Massa nódulo individual (mg)						1.000	0.772**	0.503**	-0.235ns

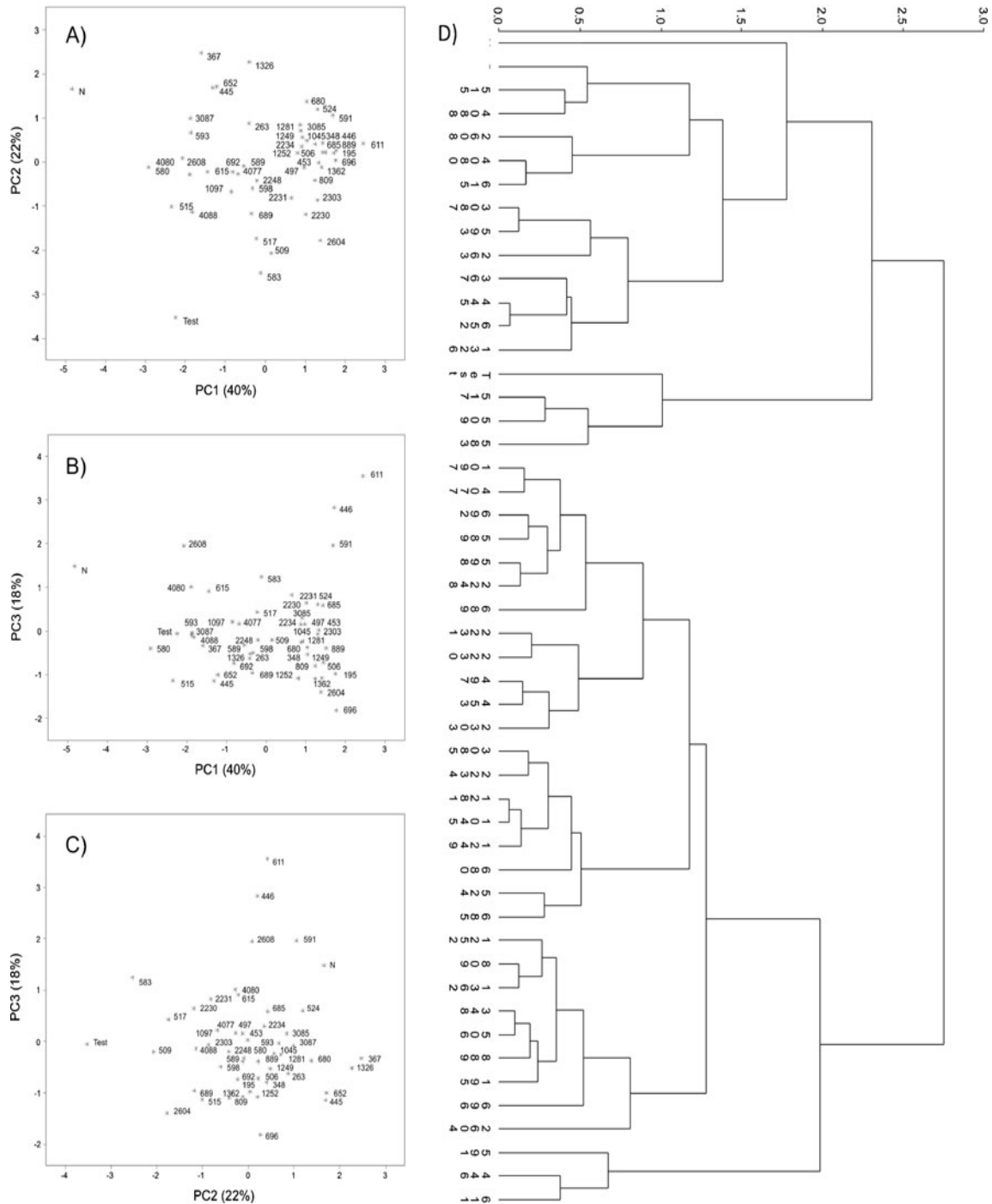
PC1 (Componentes principais eixos 1, 2 e 3). * $p < 0.001$; ** $p < 0.0001$. Número de nódulos não foi incluído porque foi discrepante.

Pela figura 5a observa-se que as estirpes IPR-*Pv* 583, -591 e -611 se separaram dos demais tratamentos, com valores positivos tanto para o primeiro componente (PC1) indicador da massa seca da parte aérea e nodulação, e segundo componente (PC2) representado pelo N na parte aérea. Quando comparado com os outros tratamentos, o tratamento com N mineral ocupou uma posição isolada.

A Figura 5b mostra que as estirpes de IPR-*Pv* 446, 591 e 611, embora exibindo valores elevados em Y1 (primeiro componente principal), não foram elevados no eixo Y3 (terceiro componente). No gráfico de dispersão dos tratamentos, terceiros e segundo componentes (Y3 = fixação de nitrogênio e Y2 = crescimento de plantas), a estirpe IPR- *Ah* 367 se destacou das demais, enquanto que as estirpes IPR-*Pv* 652, 593 e 580 ficaram numa posição intermediária. A estirpe IPR-*Pv* 2604 ocupou um lugar isolado, com um índice negativo de eficiência simbiótica relativa (-18) e, conseqüentemente, valores mais baixos para N total na parte aérea e massa seca da parte aérea (Fig. 5c).

A análise de agrupamento dividiu as estirpes em dois grupos principais. Trinta e uma estirpes IPR e a estirpe comercial SEMIA 4080, isolada de solo cultivado com milho no centro sul do Paraná, ficaram no primeiro grupo. O segundo grupo foi composto por 14 estirpes IPR e por duas SEMIAs (4077 e 4088) e pelos tratamentos não inoculados, com e sem N mineral (Fig. 5d).

Figura 5 - Gráfico de dispersão de estirpes de rizóbios de acordo com a análise de componente principal (PCA): (a) primeiro e segundo componentes; (b), primeiro e terceiro componentes; e (c) segundo e terceiro componentes. (d) Dendrograma mostrando agrupamento das estirpes elite IPR e tratamentos não-inoculados com (N) e sem N mineral (Test). A PCA foi com base nas variáveis relativa à FBN (massa seca, N total na parte aérea, N total e % N-ureídeos na seiva do xilema, massa seca individual de nódulos totais e massa seca de nódulos.



4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA

As características morfológicas predominantes das colônias das estirpes crescidas em meio YMA foram: diâmetro superior a 2 mm, circular, não viscosas, com produção de goma, elevação convexa, bordos lisos e transparência opaca. Características semelhantes foram observadas em colônias das estirpes de *R. tropici* SEMIAs 4077, 4080 e 4088 utilizadas como referência. Trinta e oito das 45 estirpes avaliadas apresentaram reação ácida em meio de cultura contendo manitol como fonte de C, enquanto que o restante apresentou reação alcalina. Das 45 estirpes de rizóbios analisadas, 14 produziram melanina.

A análise de agrupamento baseada na matriz e distância Euclidiana, utilizando 20 características fenotípicas mostrou claramente a diferenciação das estirpes em grupos fenéticos (Fig. 6 e Tabela 5).

Figura 6 - Análise de agrupamento de quarenta e oito estirpes de rizóbio isoladas de nódulos de plantas de feijoeiro crescidas no campo, inoculados com suspensões de solo ou semente. Dendograma foi gerado com base na matriz binária e distância euclidiana usando doze características fenotípicas.

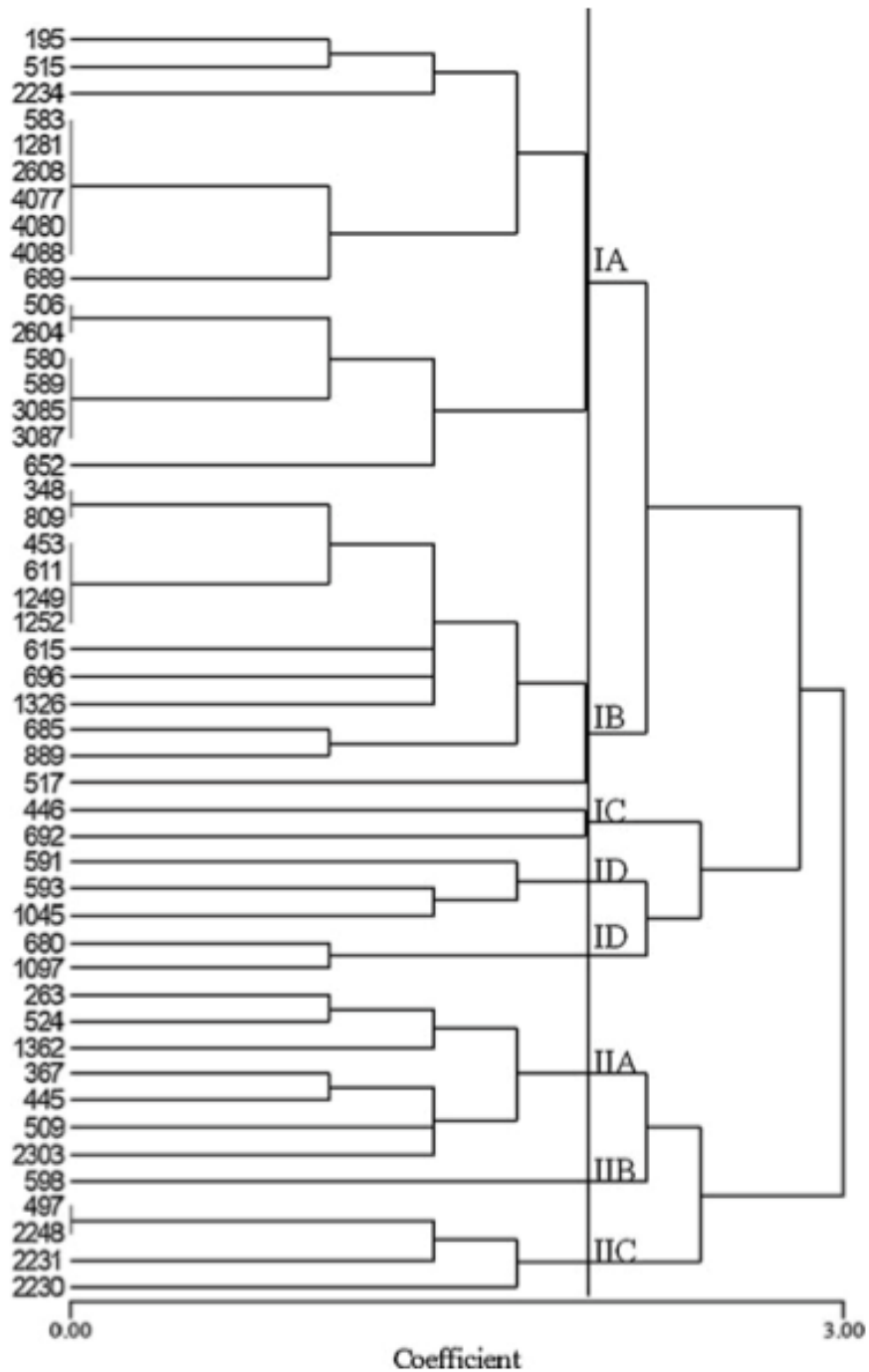


Tabela 5 - Características fenotípicas e perfis de RFLP-PCR do 16S rRNA de rizóbios com as enzimas de restrição *RsaI*, *HinfI*, *HpaII* e *HaeIII*.

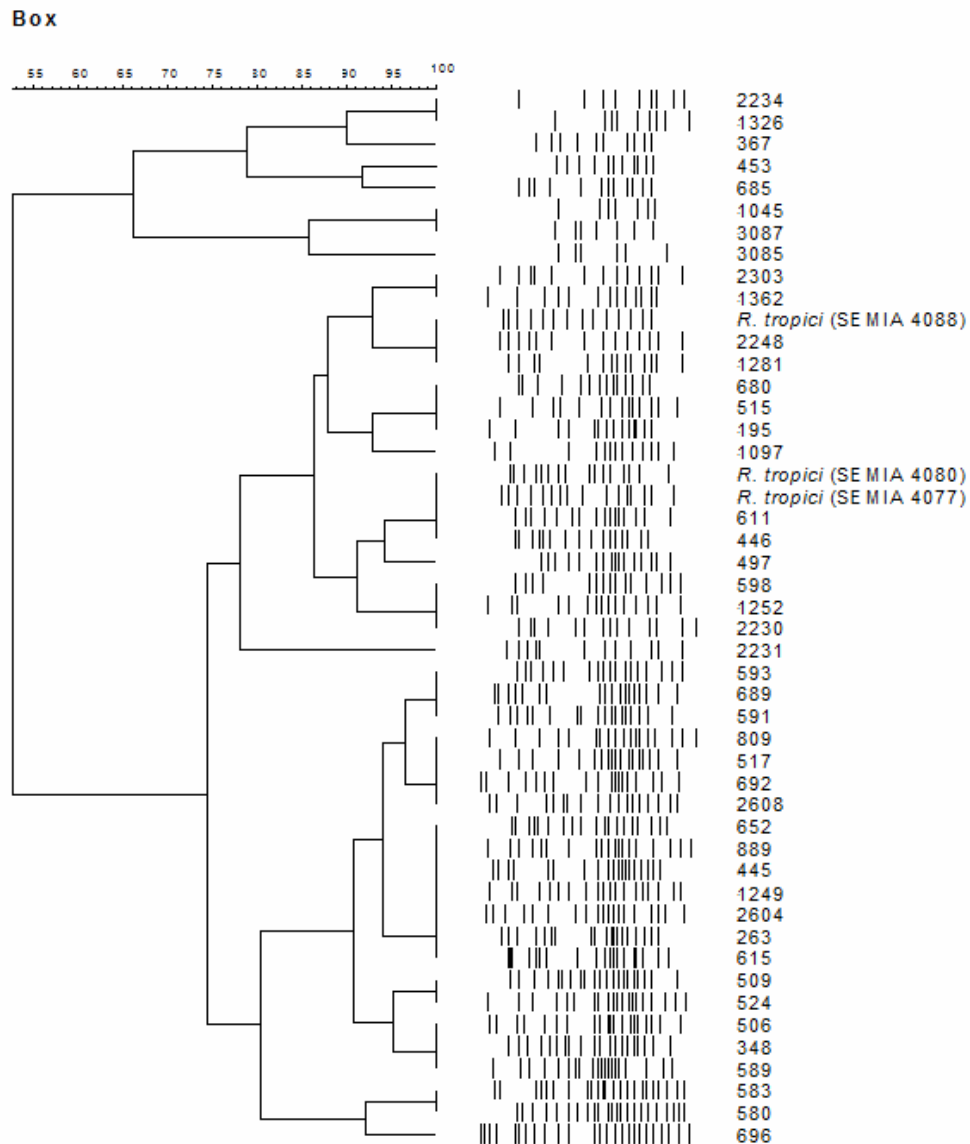
	Grupos fenotípicos								
	1A ^a	1B	1C	1D	1E	2A	2B	2C	
Números de estirpes	17	12	2	3	2	7	1	4	
Tamanho da colônia (A)	>2mm	>2mm	>2mm	>2mm	>2mm	<2mm	>2mm	>2mm	
Forma (B)	Circular	Circular	No circular	Circular	Circular	Circular	No circular	Circular	
Textura (C)	Não viscosa	Viscosa	Não viscosa	Não viscosa	Viscosa	Viscosa	Viscosa	Viscosa	
Absorve corante (D)	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	
Produção de goma (E)	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	
Elevação da colônia (F)	Convexa	Convexa	Plano	Convexa	Convexa	Plano	Convexa	Plano	
Borda da colônia (G)	Liso	Liso	Liso	Liso	Liso	Liso	Liso	Liso	
Estrutura (H)	Liso	Liso	Liso	Ondulado	Ondulado	Liso	Liso	Ondulado	
brilho (I)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	
Transparência (J)	Opaco	Translúcida	Opaco	Translúcida	Translúcida	Opaco	Translúcida	Translúcida	
Ácido/alcalina (L)	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	
Melanina (M)	Mel ⁻	Mel ⁻	Mel ⁻	Mel ⁻	Mel ⁻	Mel ⁻	Mel ⁺	Mel ⁺	
Grupos genotípicos RFLP	II; III; IV; V; VI; VII	I; II; III; IV; V; VI	II; VII	III; IV; VI	I; II	II; III; IV; IX	II	IV; VII	

As avaliações foram realizadas com três repetições. * Incluindo as estirpes de *R. tropici* (SEMIA 4077, 4080 e 4088) recomendadas para inoculantes comerciais no Brasil, exceto que estas apresentam textura viscosa.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES POR BOXA1R-PCR

Quando as quarenta e cinco estirpes IPR- utilizadas neste estudo e as estirpes de *R. tropici* (SEMIAs) foram amplificadas com o iniciador BOXA1R, dois principais grupos foram obtidos, similaridade final de (53%). O grupo I composto por oito estirpes e grupo II com 37 estirpes IPR, além das três SEMIAs. Em geral, foram observados 21 perfis distintos do BOX-PCR (Fig. 7). As estirpes apresentaram-se em três grupos diferentes, considerando a semelhança de 70%, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Figura 7 - A análise de agrupamento (UPGMA com o coeficiente de índice de Jaccard e 10% de tolerância no programa Bionumerics) dos produtos de PCR obtidos por análise BOX-PCR de quarenta e cinco estirpes IPR e SEMIA4077 (CIAT899), 4080 (IPR *P. vulgaris* 81) e 4088 (H20).



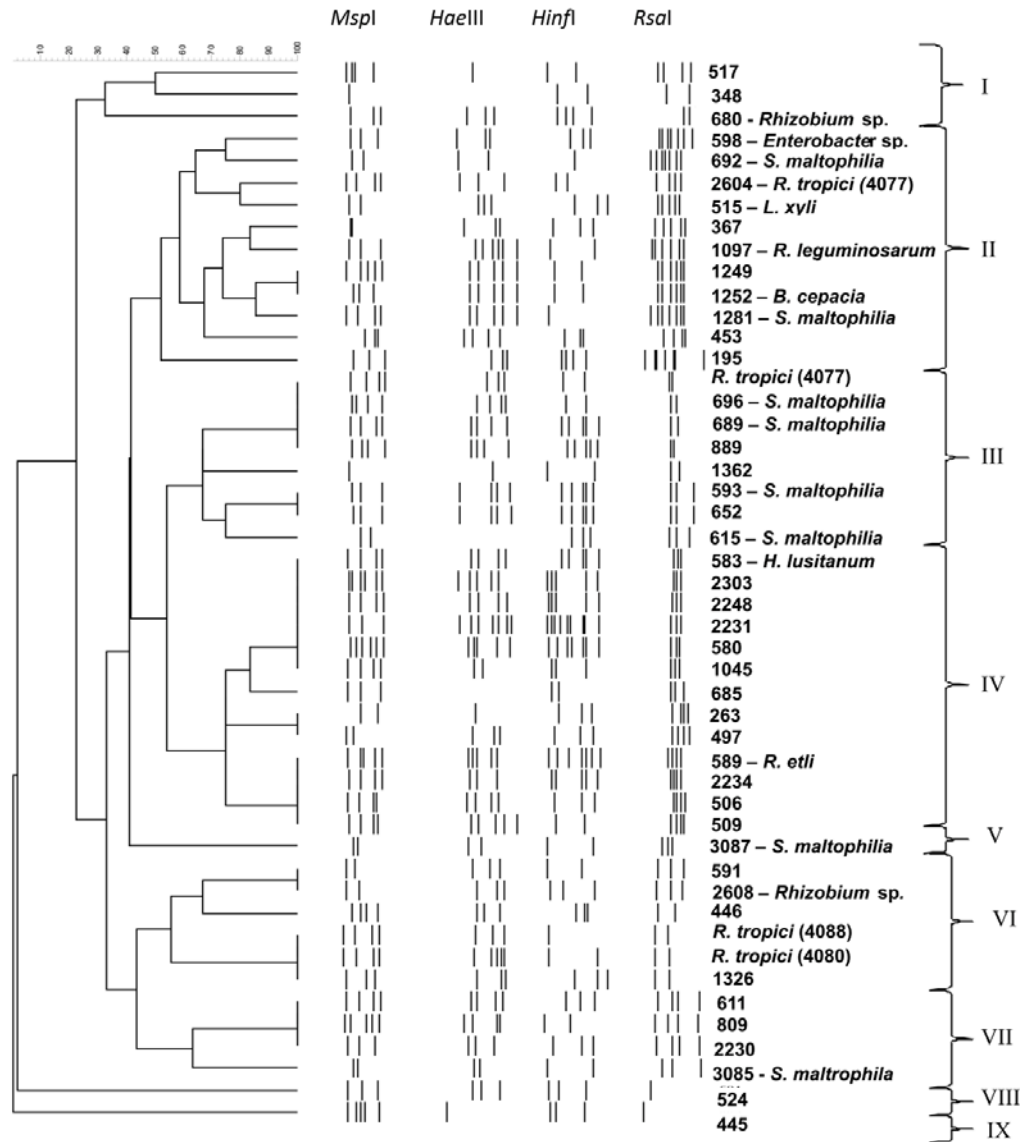
4.7 PERFIS DE RFLP-PCR DA REGIÃO 16S rDNA

Nas análises de PCR-RFLP do 16S rDNA com quatro enzimas de restrição, nove grupos foram observados, três deles constituído por estirpes com perfis únicos, por exemplo, os grupos V, VIII, IX com IPR-*Pv* 3087, 445 e 524, respectivamente (Fig. 8). As estirpes do grupo I, IPR-*Pv* 517, 348 e 680 foram isoladas de nódulos de plantas cultivadas em campo, plantas inoculadas com suspensão de solo e nódulos de plantas crescidas em vasos com solo, respectivamente. No grupo II, foram observados perfis semelhantes de 11 estirpes, que incluíam IPR-*Mp* 195; *Ah* 367 e *Pv* 453, a primeira e a segunda estirpes foram isoladas de nódulos de mucuna anã (*Mp*) e amendoim cavalo (*Ah*) cultivados nas entrelinhas do cafeeiro (*Coffea arabica* L.), e o terceiro de uma área tradicionalmente cultivada com feijoeiro. O grupo III incluiu a estirpe referência de *R. tropici* (SEMIA 4077 = CIAT 899) e sete estirpes IPR-*Pv*. O grupo IV foi o maior com 13 estirpes, apenas cinco (IPR-*Pv* 263, 497, 506, 1045 e 685) as quais foram isoladas de nódulos de feijoeiro no Estado do Paraná e, o restante isoladas de sementes comercializadas nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Neste grupo, a estirpe IPR-*Pv* 583 isolada de suspensão de sementes apresentou semelhança com as IPR-*Pv* 2303, 2248, 2231 e 580 que, também foram isoladas a partir de sementes comercializadas em Minas Gerais e São Paulo e com a estirpe IPR-*Pv* 1045, isolada de nódulo de feijoeiro inoculadas com suspensão de solo coletado da entrelinha do cafeeiro (Fig. 8).

Tabela 6 - Identificação das estirpes com base na similaridade das sequências de 16S rRNA utilizando sequências disponíveis no GenBank (NCBI).

estirpes (IPR-Pv)	SEMIA	Número de pares de base	Sequências mais similares encontradas no GenBank (NCBI)			Número de acesso no GenBank das estirpes
			Espécies	Similaridade (%)	Número de acesso	
515	4090	1385	<i>Leifsonia xyli</i> (CV86)	99	AJ717351.1	JN208893
583	4091	1391	<i>Herbaspirillum lusitanum</i> (P6-12)	99	NR028859.1	JN208894
589	4092	1425	<i>Rhizobium etli</i> (CIAT151)	100	AF313904.1	JN208895
593	4093	661	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1)	94	FJ765513.1	JN208896
598	4094	1546	<i>Enterobacter sp.</i> (B901-2)	96	AB114268.1	JN208897
615	4095	1537	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (K279a)	99	AM743169.1	JN208898
680	4096	1417	<i>Rhizobium sp.</i> (SEMIA 6435)	100	FJ025130.1	JN208899
689	4097	1539	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (K279a)	99	AM743169.1	JN208900
692	4098	999	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (CCF0025)	89	GU391033.1	JN208901
696	4099	1526	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (ZZ7)	90	DQ113454.1	JN208902
1097	4100	950	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (RVS11)	100	FJ595998.1	JN208903
1252	4101	1403	<i>Burkholderia cepacia</i> (ATCC 53795)	99	AY741354.1	JN208904
1281	4102	1524	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (IAM 12423)	96	AB294553.1	JN208905
2604	4103	1475	<i>Rhizobium tropici</i> (SEMIA 4088)	99	FJ025131.1	JN208906
2608	4104	1442	<i>Rhizobium sp.</i> (R-32539)	99	AM691584.1	JN208907
3085	4105	1533	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (pp5c)	96	GQ360071.1	JN208908
3087	4106	1475	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (PSM-1)	94	FJ888386.1	JN208909

Figura 8 - Dendrograma mostrando a diversidade genética de quarenta e cinco estirpes IPR de rizóbio com base nos perfis de RFLP-PCR da região 16S rRNA analisado com as enzimas de restrição *RsaI*, *HinfI*, *HpaII* e *HaeIII*. Para análise de agrupamento foi utilizado algoritmo UPGMA com o coeficiente de Jaccard. As estirpes SEMIA4077 (CIAT899) e -4080 (IPR 81) e -4088 (H12) são recomendadas para a produção comercial de inoculantes no Brasil foram incluídas.



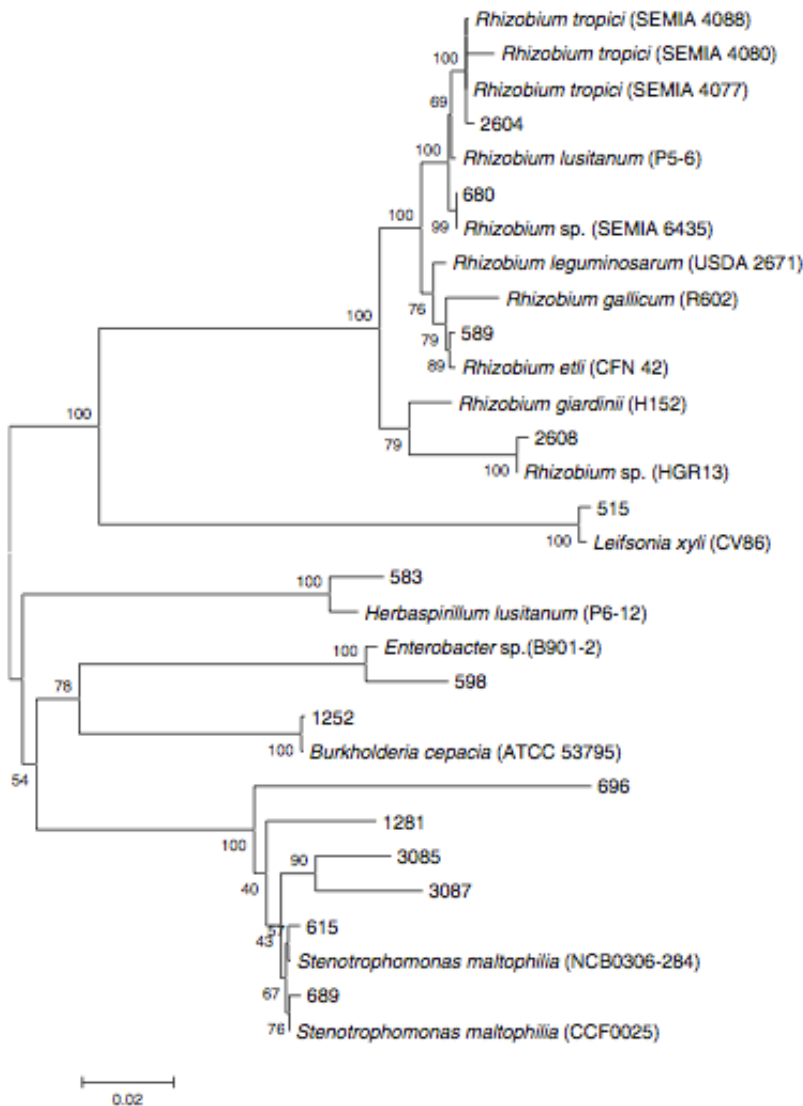
4.8 ANÁLISE FILOGENÉTICA BASEADA EM GENES 16S RRNA

Dezessete estirpes foram sequenciadas utilizando o gene 16S rRNA (Fig. 9 e Tabela 6). Considerando o Blastn, cinco estirpes apresentaram semelhanças com o gênero *Rhizobium*, oito estirpes com *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Leifsonia*, *Herbas pirillum* e *Enterobacter* (Tabela 6). Dessas 17 estirpes, as IPR-Pv 589, 680 e 1097 apresentaram 100% de similaridade com

Rhizobium etli (CIAT151), *Rhizobium* sp. (SEMIA 6435), e *Rhizobium leguminosarum* (RVS11), respectivamente. As estirpes IPR-Pv 692 e 696 apresentaram similaridade inferior a 90% com o gênero *Stenotrophomonas*. Em termos de características fenotípicas (Fig. 6 e Tabela 5), a estirpe IPR-Pv 1281 foi agrupada com as três SEMIAs e com cinco IPR-Pv estirpes do gênero *Rhizobium*.

Treze sequências com mais de 1.385 pb foram alinhadas e utilizadas para construir a árvore filogenética, juntamente com as estirpes de referência, os grupos principais foram agrupados no nível de gênero (Fig. 9).

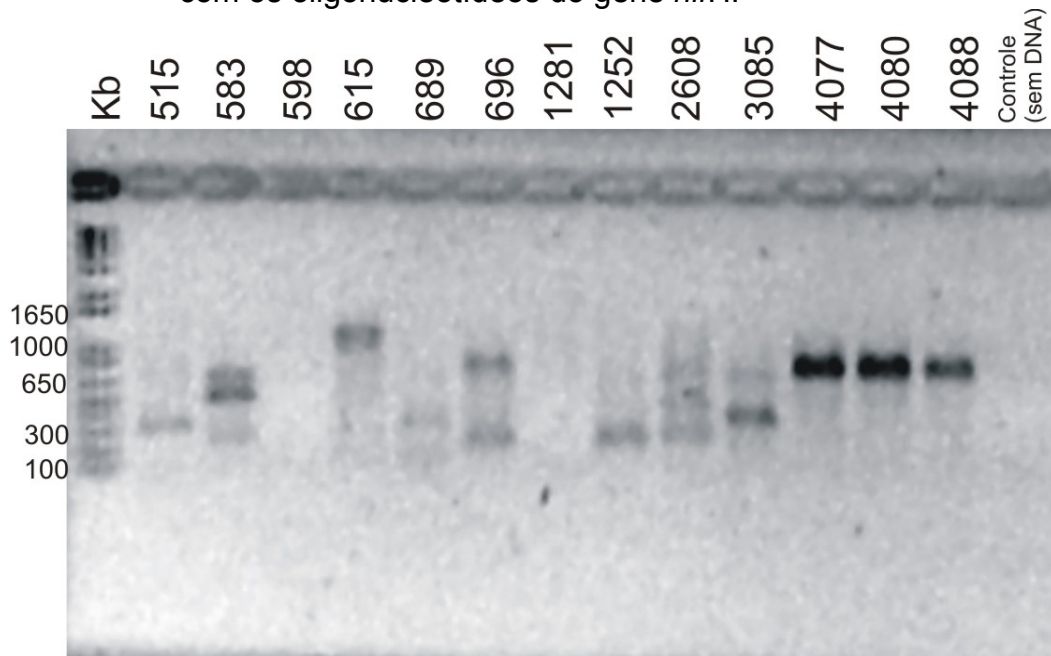
Figura 9 - Árvore filogenética com base nas sequências de 16S rRNA de treze estirpes (IPR-Pv). Números acesso no GeneBank estão disponíveis na Tabela 7. Árvore filogenética foi gerada usando o programa MEGA versão 5.0 com parâmetros padrão, o modelo de distância K2P e o algoritmo “neighbor-joining”.



4.9 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *nifH*

A figura 10 mostra o polimorfismo do produto da amplificação com os oligonucleotídeos do gene *nifH* das estirpes IPR-Pv 515, 583, 615, 689, 696, 1281, 1252, 2608 e 3085 e as três SEMIAS (4077, 4080 e 4080). As seis estirpes utilizadas no sequenciamento com o gene “housekeeping” nesse estudo amplificaram com os oligonucleotídeos do gene *nifH*, quando submetido a técnica de PCR (Figura 10).

Figura 10 - O produto da amplificação do DNA das estirpes de rizóbios IPR com os oligonucleotídeos do gene *nifH*.



4.10 ANÁLISE DE SEQUÊNCIA MULTILOCUS (MLSA) EM ESTUDOS FILOGENÉTICOS

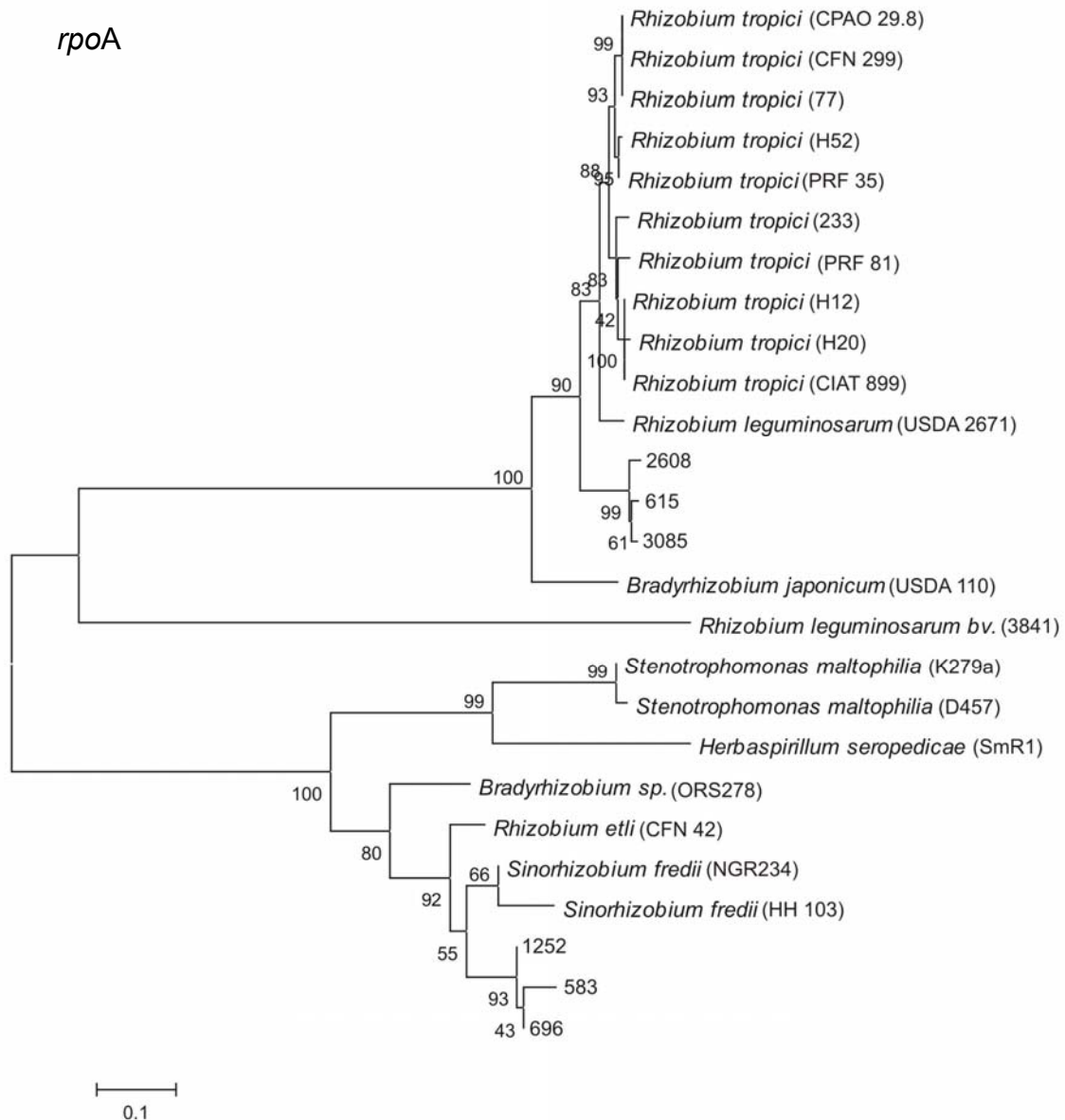
O comprimento do alinhamento dos genes foram de 473 pb para o *gltA*, 487 pb para o *recA* e 546 pb para o gene *rpoA*. Análise das árvores filogenéticas dos genes individuais, geradas a partir dos alinhamentos de sequências das estirpes e das espécies referência descritos, revelaram diferença nos agrupamentos com base no gene 16S rRNA.

Para todos os três genes formaram se dois grupos, no primeiro houve o agrupamento de 10 estirpes referência de *Rhizobium tropici*. No gene *gltA*, no grupo de *Rhizobium tropici* agrupam-se as IPR-Pv 696 e 3085 (= *S. maltophilia*),

1252 (= *Burkholderia cepacia*), 2608 (= *Rhizobium* sp.), entre parênteses a identificação pelo gene 16S rRNA e uma estirpes referência de *R. leguminosarum*. Com 39% de confiabilidade pelo “bootstrap” ficou próximo a esse grupo a IPR-Pv 615 (= *S. maltophilia*). Ainda nesse grande grupo ficaram as estirpes referência de *Bradyrhizobium*. As estirpes de referência de *S. maltophilia*, *H. seropedicae*, *Sinorhizobium fredii* e IPR-Pv 583 (= *H. lusitanum*) ficaram no segundo grupo (Figura 11a).

A análise das árvores construídas com os genes *recA* e *rpoA* mostrou que as estirpes IPR estudadas tiveram os mesmos agrupamentos (fig. 11b e 11c). As três estirpes, IPR-Pv 615, 3085 (= *S. maltophilia*) e 2608 (= *Rhizobium* sp.), agruparam-se no grande grupo de *R. tropici*. A diferença ficou com as estirpes referência entre os dois genes. Enquanto as outras três, IPR-Pv 583 (= *H. lusitanum*), 696 (= *S. maltophilia*) e 1252 (= *Burkholderia cepacia*) ficaram no grupo das *S. maltophilia*, *H. seropedicae*. Por outro lado, a estirpe de *Sinorhizobium fredii* que tinha agrupado com as *S. maltophilia* nos genes *gltA* e *rpoA*, quando analisada com o gene *recA* agrupou-se com os *R. tropici*.

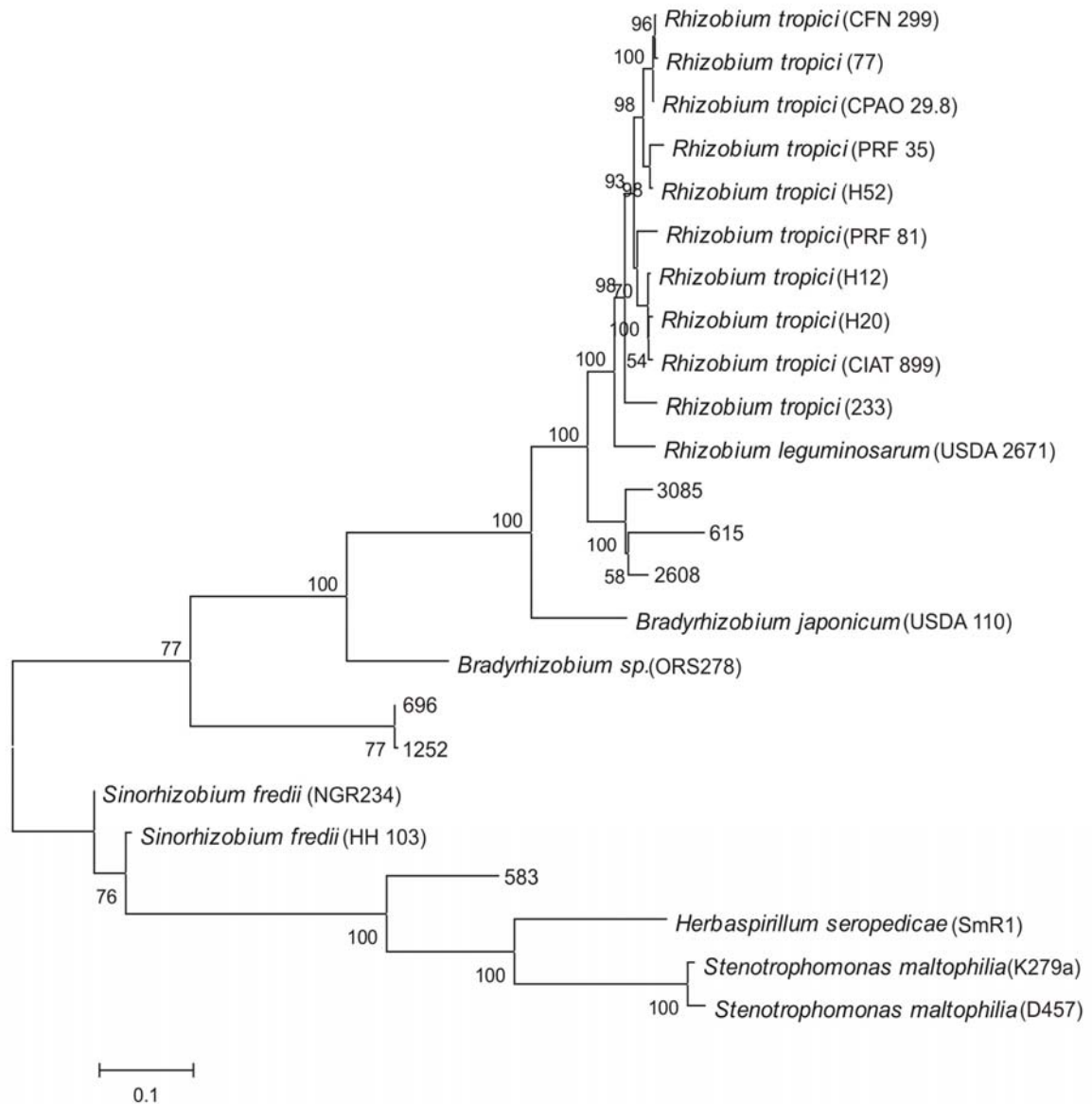
Figura 11 - Árvores filogenéticas baseadas nas sequências dos genes *gltA*, *recA* e *rpoA*, mostrando as relações entre os simbiontes de *Phaseolus vulgaris*. A árvore foi construída pelo método Neighbor-Joining com 1000 repetições usando o programa MEGA 5.



Com os genes *gltA*, *rpoA* e *recA*, concatenados foi construída a árvore filogenética com as sequências, formando 1.517 pb (incluindo os “gaps”). As estirpes IPR-Pv 615, 3085 (= *S. maltophilia*) e 2608 (= *Rhizobium* sp.) agruparam-se entre si e ficaram no grupo dos *R. tropici* com 100% de repetibilidade pelo “bootstrap”. As estirpes IPR-Pv 696 (= *S. Maltophilia*) e 1252 (= *Burkholderia cepacia*) agruparam-se entre si, próximas ao grupo de *Bradyrhizobium*. Outro grupo, a IPR-Pv

583 (= *H. lusitanum*) ficou próximo da estirpe referência de *H. seropedicae* (Figura 12).

Figura 12 - Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas de três genes (*gltA*, *recA* e *rpoA*), mostrando as relações entre os simbiontes de *Phaseolus vulgaris*. A árvore foi construída pelo método Neighbor-Joining com 1000 repetições usando o programa MEGA 5.



Para calcular os índices de diversidade foram considerando o número de estirpes pertencentes a cada grupo formados nos dendrogramas a nível de 70% de similaridade dos dados de eficiência agrônômica, características morfo-fisiológicas, produtos amplificado do BOX-PCR A1R, RFLP-PCR e da árvore

filogenética do sequenciamento da região 16S rRNA. Dos diversos índices usados para medir a diversidade, o de Shannon tem sido o mais utilizado nos trabalhos de micro-organismos. Quanto menor o valor do índice, menor a diversidade da amostra. Observa-se que a diversidade do índice de Shannon avaliado variou-se de 1,134 a 1,895 dos agrupamento dos produtos de BOX-PCR e RFLP-PCR do gene 16S rRNA, respectivamente (tabela 7). Outro índice bastante utilizado e o de Simpson, onde os valores foram de 0,598 a 0,825 com base nos dendrogramas da eficiência simbiótica e RFLP-PCR do gene 16S rRNA, respectivamente (tabela 7). Esse índice mostra a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Seus valores varia de 0 a 1, sendo quanto mais alto for, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior a dominância e menor a diversidade.

Os índices de Simpson, Shannon, Menhinick, Margalef e Equitability, foram mais altos nos dados obtidos com o RFLP-PCR do gene 16S rRNA. Já os menores valores foram em relação da eficiência simbiótica nos índices de Simpson, Evenness, Margalef e Equitability. No entanto, os dados de eficiência simbiótica foram altos no índice de dominância e mais baixo com os dados de RFLP-PCR do gene 16S rRNA (tabela 7).

Tabela 7 - Número de grupos de cada característica com seus respectivos índices de dominância, Simpson, diversidade de Shannon (H), Evenness, Menhinick, riqueza (Margalef) e Equitability das 45 estirpes IPR mais 3 SEMIAS.

	Grupos		Dominância	Simpson	Shannon	Evenness	Menhinick	Margalef	Equitability
		Indivíduos	D	1-D	H	e ^H /S			J
Eficiência									
simbiótica	6	48	0,402	0,598	1,278	0,5985	0,866	1,292	0,7135
Lower*	5	48	0,285	0,448	0,944	0,4478	0,7217	1,033	0,5496
Upper	6	48	0,551	0,713	1,493	0,7471	0,866	1,292	0,8363
Morfo									
fisiológica	8	48	0,224	0,776	1,721	0,6986	1,155	1,808	0,8275
Lower	6	48	0,181	0,681	1,387	0,5634	0,866	1,292	0,7203
Upper	8	48	0,318	0,819	1,857	0,8562	1,155	1,808	0,9166
BOX	4	48	0,365	0,634	1,134	0,7772	0,5774	0,775	0,8182
Lower	3	48	0,308	0,533	0,907	0,6366	0,4330	0,5166	0,6742
Upper	4	48	0,467	0,692	1,262	0,8936	0,5774	0,775	0,9159
RFLP-16S									
PCR	9	48	0,175	0,825	1,895	0,7393	1,299	2,067	0,8626
Lower	6	48	0,152	0,753	1,598	0,66	0,866	1,292	0,8031
Upper	9	48	0,245	0,846	1,991	0,9026	1,299	2,067	0,9462
16 S RNA	6	17	0,308	0,692	1,400	0,6756	1,455	1,765	0,7811
Lower	3	17	0,225	0,491	0,846	0,6389	0,7276	0,7059	0,6892
Upper	6	17	0,509	0,768	1,599	0,9322	1,455	1,765	0,9430

*Bootstrap com 95% de probabilidade.

6 DISCUSSÃO

A análise de componentes principais tem sido amplamente utilizada em várias áreas de pesquisa, e em nosso estudo, a sua aplicação com os dados de parâmetros relacionados com fixação N_2 foi claramente eficaz na redução do número de variáveis necessárias para avaliar a eficiência do processo biológico. Por exemplo, foi importante a constatação que na simbiose do feijoeiro, o parâmetro número de nódulos não é relevante para a seleção de estirpes com maior capacidade de fixação de N_2 .

A maioria dos locais em nosso estudo não tinha histórico da inoculação do feijoeiro, e muitos também não tinham histórico de plantio do feijoeiro. Por exemplo, as estirpes IPR-Pv 3085 e 1249 foram isoladas de solos cultivados com mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e milho (*Zea mays* L.), respectivamente. O isolamento de rizóbio em solos sem histórico de cultivo do feijoeiro pode ser atribuído à baixa especificidade dessa leguminosa em nodular com várias espécies de rizóbio, aparentemente resultante da capacidade da planta hospedeira em perceber sinais moleculares de uma variedade de rizóbios (MICHIELS et al., 1998). Infelizmente, em geral, a baixa especificidade da nodulação em feijoeiro não está relacionada com eficiência na fixação N_2 , o que representa a principal limitação para a exploração agrônômica da simbiose (GRAHAM et al., 1991; HUNGRIA e VARGAS, 2000). No entanto, dentro de populações nativas de rizóbios, podem ser identificadas estirpes elite, e esta abordagem tem sido utilizada com sucesso no Brasil (HUNGRIA et al., 2000; HUNGRIA et al., 2003). Também em nosso estudo, a estimativa do índice de eficiência relativa, tendo em conta o N total na parte aérea revelou várias estirpes elite com grande potencial biotecnológico, como IPR-Ah 367, surpreendentemente isolada de campo com plantio de *A. hypogaea*, essa estirpe acumulou nas plantas de feijoeiro grandes quantidades de N, comparável ao controle que recebeu N mineral e com os tratamentos inoculados com as SEMIAs.

A maioria das estirpes em nosso estudo foi classificada como de crescimento rápido e com reação ácida em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono (JORDAN, 1984; ANDRADE et al., 2002). A produção de melanina por rizóbios nodulantes em feijoeiro tem sido descrita antes (CUBO et al., 1997; ANDRADE et al., 2002); esse polímero foi sugerido por Geng et al. (GENG et al., 2010) como um possível "DNA-sensing" que protege a célula de propagação até que

o dano ao DNA seja reparado antes da duplicação, uma característica muito importante sob condições de estresse comuns nos solos tropicais. É interessante observar que, das 14 estirpes produtoras de melanina oito (IPR-Pv 509, 580, 589, 598, 652, 2231, 2234 e 2248), possivelmente, permaneceram em condições de estresses, uma vez que foram isoladas de tegumentos de grãos de feijão.

Tanto o BOX-PCR quanto o RFLP-PCR do 16S rRNA foram marcadores utilizados para determinar a diversidade de rizóbios (LAGUERRE et al., 1994; GRANGE e HUNGRIA, 2004; KASCHUK et al., 2006a; BINDE et al., 2009), e em nosso estudo revelou grande diversidade entre as estirpes. Embora seja importante, BOX-PCR e PCR-RFLP do rRNA 16S não podem determinar a filogenia ou posições taxonômicas das estirpes, conseqüentemente, foram selecionadas estirpes para realizar a análise do sequenciamento do gene 16S rRNA.

A análise do sequenciamento das 17 estirpes IPR-Pv indicou gêneros além das espécies tradicionais de *Rhizobium*. A espécie de *Herbaspirillum lusitanum* (VALVERDE et al., 2003) foi relatada como simbiote de feijoeiro, e neste estudo foram identificadas estirpes pertencentes a este gênero. *Burkholderia* e *Enterobacter* têm sido descritas como bactérias com potencial tanto para fixação biológica de N₂ quanto promotoras de crescimento em plantas (BALDANI et al., 1986; DÔBEREINER, 1992; JAMES, 2000), no entanto, este é o primeiro relato de isolamento desses gêneros a partir de nódulos de feijoeiro. A estirpe IPR-Pv 515 foi identificada como *Leifsonia x yli*, uma espécie relatada como causadora de raquitismo de soqueira de cana (*Saccharum* spp.) (GAGLIARDI e CAMARGO, 2009).

A identificação de oito estirpes pertencentes ao gênero *Stenotrophomonas* em simbiose com o feijoeiro foi surpreendente. Estirpes pertencentes a este gênero foram encontradas como endófitas de cana-de-açúcar e trigo (*Triticum aestivum* L.) e foram relatadas como promotoras de crescimento de girassóis em experimentos de casa de vegetação (FAGES e ARSAC, 1991). Também foram relatadas como promotoras de crescimento de milho, produzindo ácido indol acético na presença de triptofano e metabólicos antifúngicos para vários patógenos do solo (MEHNAZ et al., 2010). *Stenotrophomonas maltophilia* é uma espécie encontrada em uma ampla gama de ambientes, e é geralmente mencionada como um agente de infecções nosocomiais, representando um oportunista em humanos. Isolados de *S. maltophilia* tem apresentado resistência intrínseca a muitos

agentes antimicrobianos que são receitados frequentemente, particularmente *Beta*-lactamases e aminoglicósidos, podendo desenvolver resistência a vários fármacos que têm sido utilizados para tratar infecções (DENTON e KERR, 1998). A espécie também é relatada como uma bactéria promotora de crescimento de várias espécies de plantas (HAUBEN et al., 1999). A capacidade de *Stenotrophomonas* para fixar N₂ atmosférico foi sugerida com base em resultados de ensaios de redução do acetileno e pela detecção de sequências de genes *nifH* (TEIXEIRA et al., 2007; REINHARDT et al., 2008). No entanto, as estirpes isoladas no nosso estudo mostraram baixa semelhança para *Stenotrophomonas* a partir da base de dados GenBank e, na árvore filogenética, foram agrupadas em um grupo diferente, portanto, podem representar uma nova espécie. Realçam-se os valores elevados de percentagem de N-ureído obtidos com essas estirpes quando em simbiose com o feijoeiro, com valores próximos ou maiores do que as SEMIAs utilizadas como inoculantes comerciais no Brasil.

A habilidade das estirpes em formar nódulos quando inoculadas em leguminosas indica que houve a interação entre micro-organismo e planta hospedeira (GRAHAM et al., 1991). A formação dos nódulos é um processo extremamente laborioso, a planta hospedeira libera compostos identificados como flavonoides, esses compostos induzem o micro-organismo à indução de uma série de genes. Os genes *nod A, B, C* e *D*, foram encontrados em todos os rizóbios, sendo essencial para o início da nodulação já que são responsáveis pela condução do micro-organismo até a raiz (HUNGRIA et al., 1991b; a; PERRET et al., 2000; LAGUERRE et al., 2001; BOTTOMLEY e MYROLD, 2007).

No entanto, somente a formação de nódulos nas raízes das plantas não é um indicativo de que o micro-organismo é um fixador de nitrogênio. Existem alguns métodos disponíveis para avaliar a fixação de nitrogênio, como por exemplo, massa seca e N-total na parte aérea das plantas. Com os avanços na biologia molecular, é possível avaliar se o micro-organismo dispõe de genes específicos relacionados com a fixação do nitrogênio. É essencial que um micro-organismo fixador de nitrogênio possui os genes *nif* (MERRICK e DIXON, 1984; RUBIO e LUDDEN, 2002). Dentro dos 29 genes *nif* descritos todos relacionados com a fixação de N₂ (RUBIO e LUDDEN, 2002), o gene *nifH* tem pelo menos três funções no sistema enzimático da nitrogenase. Primeiro serve como doador de elétrons para a nitrogenase, segundo, participa na biossíntese de FeMo-co, e terceiro, é

necessário para a maturação da dinitrogenase a uma forma ativável do FeMo-co (RUBIO e LUDDEN, 2002).

Através da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos que flanqueiam o gene *nifH* (LAGUERRE et al., 2001; GRANGE et al., 2007), pode-se dizer que os micro-organismos possuem o gene de fixação de nitrogênio. A checagem desses genes é de grande importância, uma vez que estes estão normalmente em plasmídeos simbióticos nas espécies do gênero *Rhizobium* (ECKHARDT, 1978; BROM et al., 1988; BROM et al., 2002). Como estes plasmídeos não são essenciais a sobrevivência do rizóbio podem ser perdidos durante sua replicação (AMARGER et al., 1997; BROM et al., 2002).

Como o grupo de rizóbios analisados nesse trabalho mostrou uma diversidade do 16S, algumas estirpes foram amplificadas com genes buscando entender a evolução dos simbiossomas do feijoeiro que ocorre nos solos paranaenses, bem como os que são carregados via sementes. Três genes que codificam proteínas foram selecionados para aumentar as análises filogenéticas das estirpes isoladas de feijoeiro. Estes marcadores filogenéticos provaram ser úteis na filogenia de bactérias. Estes genes foram utilizados para descrever diferentes espécies de rizóbios, como por exemplo, *Rhizobium m ultihospitium* (HAN et al., 2008b), *Rhizobium miluonense* (GU et al., 2008), *Rhizobium rhizogenes* (VELÁZQUEZ et al., 2010), *Rhizobium leucaenae* sp. nov. (RIBEIRO et al., 2012) e *Rhizobium nepotum* sp. nov (PULAWSKA et al., 2012). Essa técnica também é bastante utilizada nos estudos de diversidade, taxonomia e filogenia desses simbiossomas (MARTENS et al., 2007; HAN et al., 2008a; RIBEIRO et al., 2009; RIVAS et al., 2009; DEGEFU et al., 2011; ASERSE et al., 2012a; ASERSE et al., 2012b; CARRO et al., 2012; LI et al., 2012; RAMÍREZ-BAHENA et al., 2012; STEPKOWSKI et al., 2012).

O índice de diversidade levando em conta o número de indivíduos, bem como o número de grupos (taxa), varia de zero (0) para comunidades (populações) com apenas um simples grupo (taxa) até altos valores para comunidades com muitos grupos, cada um com poucos indivíduos (HAMMER et al., 2001). Trabalhos sobre a diversidade de rizóbio nodulante do feijoeiro avaliam os mais diversos efeitos, por exemplo, tipo de amostragem do rizóbio (ALBERTON et al., 2006), doses de calcário em solo ácido (ANDRADE et al., 2002), comparando plantio direto e convencional (KASCHUK et al., 2006b). Nesse trabalho não foi

separado nenhum efeito sobre a diversidade das estirpes com origem em diferentes agroecossistemas, o objetivo foi apenas mostrar a diversidade do grupo.

Nesse estudo observa-se que os solos tropicais possuem diversidade de rizóbios nodulantes do feijoeiro quando caracterizados pelos perfis fenotípicos e genotípicos. Kaschuk et al. (2006b) trabalhando com 120 estirpes de feijoeiro de solos sob plantio direto, convencional e pastagem encontraram 47 perfis de RFLP-PCR do gene 16S rRNA, com índice de Shannon de 2,09 a 3,12 e os autores consideraram esse índice como alto. Também em plantio direto e convencional, Grange e Hungria (2004) obtiveram um baixo índice de Shannon de 1,41 a 1,91, com perfis de RFLP-PCR, enquanto, a diversidade avaliada com os perfis de BOX-PCR o índice de Shannon foi maior 2,82 a 2,98. Um dos fatores para a alta diversidade encontrada pelas estirpes de rizóbios é devido a baixa especificidade do feijoeiro em nodular com diversas espécies (MICHIELS et al., 1998) e até gêneros (CARDOSO et al., 2012). Ribeiro et al. (2009) mencionam que essa alta diversidade fenotípica e genotípica pelas estirpes de rizóbios simbiotes de feijoeiro encontrado nos solos brasileiros poderia ser classificada como novas espécies.

7 CONCLUSÕES

Pela análise de componentes principais constatou-se que o parâmetro número de nódulos não é relevante para a seleção de estirpes com maior capacidade de fixação de N_2 com o feijoeiro, reduzindo o número de variáveis para experimentos em casa de vegetação com solo não estéril.

Algumas estirpes IPR apresentaram potencial de eficiência simbiótica para testes de eficiência agrônoma, uma vez que acumularam N total na parte aérea equivalente ao tratamento com N mineral e superior aos inoculados com as estirpes autorizadas para inoculante do feijoeiro.

Existe diversidade no grupo de estirpes elite de rizóbio simbiontes do feijoeiro, utilizando abordagem polifásica, com base nas características morfo-fisiológica, genética e eficiência simbiótica.

Pela técnica do MLSA formou-se agrupos diferentes quando analisado somente com as sequências do gene 16S rRNA, podendo ser novas espécies.

O estudo mostra uma perspectiva na identificação de prováveis novas espécies com potencial biotecnológico.

REFERENCIAS

- AGUILAR, O. M.; et al. Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.9, p.3520-3524, 1998.
- ALBERTON, O.; KASCHUK, G. ; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.1298 - 1307, 2006.
- AMARGER, N.; MACHERET, V. ; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, n.4, p.996-1006, 1997.
- 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. e ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF, v.EMBRAPA-SPI, 1994. p.63-94.
- ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J. ; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus*-Nodulatin rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.8, p.4025-4034, 2002.
- ANYANGO, B. et al. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.11, p.4016-4021, 1995.
- ARAÚJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAÚJO, R. S. e HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. p.91-120.
- ASERSE, A. A. et al. Phylogenetically diverse groups of *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Crotalaria* sp., *Indigofera* sp., *Erythrina brucei* and *Glycine max* growing in Ethiopia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n.0, 2012a.
- ASERSE, A. A. et al. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, n.2, p.120-131, 2012b.
- BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov.: a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.
- BARCELLOS, F. G. et al. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant strain to Indigenous Diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.8, p.2635-2643, 2007.

BERNAL, G. ; GRAHAM, P. H. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Equador, and comparisons with mexican bean rhizobia. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, n.6, p.526-534, 2001.

BEYENE, D. et al. Ethiopian soils harbor natural populations of rhizobia that form symbioses with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Archives of Microbiology**, v.181, p.129-136, 2004.

BINDE, D. R. et al. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.83, p.897-908, 2009.

BITOCCHI, E. et al. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. **PNAS** v.109, n.14, p.788-796, 2012.

BOTTOMLEY, P. J. ; MYROLD, D. D. Biological N inputs. In: PAUL, E. A. (Ed.). **Soil microbiology, ecology, and biochemistry**. 3rd ed. Hardcover – Academic Press, 2007. p.365-387.

BROCKWELL, J.; HELY, F. W. ; NEAL-SMITH, C. A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal**, v.6, p.365-370, 1966.

BROM, S. et al. Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p.2555-2561, 2002.

BROM, S. et al. Narrow- and broadhost range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1280-1283, 1988.

BROUGHTON, W. J. et al. Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. **Plant and Soil**, v.252, p.129-137, 2003.

CARDOSO, J.; HUNGRIA, M. ; ANDRADE, D. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.93, n.5, p.2035-2049, 2012.

CARRO, L. et al. Diversity of *Micromonospora* strains isolated from nitrogen fixing nodules and rhizosphere of *Pisum sativum* analyzed by multilocus sequence analysis. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, n.2, p.73-80, 2012.

CHUEIRE, L. M. O. et al. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.833-840, 2003.

CONAB, C. N. D. A. Avaliação da safra de grãos 2010/2011. [_http://www.conab.gov.br/download/safra/boletim.pdf_](http://www.conab.gov.br/download/safra/boletim.pdf). Acesso em mar. 2012.

CORRÊA, J. R. V. Efeitos de *Rhizobium*, molibdênio e cobalto sobre o feijoeiro comum cv. Carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.4, p.513-519, 1989.

COSTA, J. G. C. ; VIEIRA, N. R. A. Qualidade, classificação comercial e manejo pós-colheita. In: YOKOYAMA, L. P. e STONE, L. F. (Ed.). **Cultura do feijoeiro no Brasil: Características e produção**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p.51-64.

COWAN, S. T. A dictionary of microbial taxonomic usage. **Oliver & Boyd, Edinburgh**, 1968.

CUBO, T. et al. Expression of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli mela* gene in other rhizobia does not require the presence of the *nifA* gene. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.24, p.195-203, 1997.

DEGEFU, T.; WOLDE-MESKEL, E. ; FROSTEGARD, A. Multilocus sequence analyses reveal several unnamed *Mesorhizobium* genospecies nodulating *Acacia* species and *Sesbania sesban* trees in Southern regions of Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology**, v.34, n.3, p.216-226, 2011.

DENTON, M. ; KERR, K. G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.57-80, 1998.

DÔBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v.13, p.1-13, 1992.

ECKHARDT, T. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. **Plasmid**, v.1, p.578-588, 1978.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **Sistemas de produção do feijoeiro**, p.Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br>> acesso em dezembro de 2005.

FAGES, J. ; ARSAC, J. F. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.137, p.87-90, 1991.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, top production beans, dry - 2010. <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> acesso em agosto de 2012.

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

FERREIRA, M. C. et al. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. **Soil Biology & Biochemistry**, v.32, p.627-637, 2000.

FRANCO, M. C. et al. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.8, p.1145-1150, 2002.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L. ; MCCOY, W. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin, 1932. 343 p.

GAGLIARDI, P. R. ; CAMARGO, L. E. A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciência Rural**, v.39, p.1211-1214, 2009.

GALLOWAY, J. N. et al. The nitrogen cascade. **Bioscience**, v.53, p.341-356, 2003.

GARRITY, G. M. ; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G. M.;BOONE, D. R., *et al* (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology. 9th ed.** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. New York: The Williams & Wilkins, Springer-Verlag, 2001. p.119-154.

GAUNT, M. W. et al. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.6, p.2037-2048, 2001.

GENG, J. et al. Bacterial melanin interacts with double-stranded DNA with high affinity and may inhibit cell metabolism in vivo. **Archives of Microbiology**, v.192, p.321-329, 2010.

GEVERS, D. et al. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews**, v.3, p.733-739, 2005.

GILLER, K. E. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems** (2nd ed). CAB International, Wallingford, UKed, 2001. 423 p.

GRAHAM, P. H. et al. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root and stem nodulating bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, n.4, p.582-587, 1991.

GRANGE, L. ; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1389-1398, 2004.

GRANGE, L. et al. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.867-876, 2007.

GU, C. T. et al. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from Lespedeza root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, n.6, June 1, 2008, p.1364-1368, 2008.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

HAMMER, Ø. et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v.4, n.1, p.9pp, 2001.

HAN, T. X. et al. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with wild legumes native to Xinjiang, China. **Systematic and Applied Microbiology**, v.31, n.4, p.287-301, 2008a.

HAN, T. X. et al. *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, n.7, p.1693-1699, 2008b.

HAUBEN, L. et al. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1749-1760, 1999.

HEDGES, S. B. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap p-value in phylogenetic studies. **Mol. Biol. Evol.**, v.9, p.366-369, 1992.

HERRIDGE, D. F.; BERGERSEN, F. J. ; PEOPLES, M. B. Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural N abundance methods. **Plant Physiology**, v.93, p.708-716, 1990.

HUNGRIA, M. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nodulos. In: HUNGRIA, M. e ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF, v.EMBRAPA-SPI, 1994. p.249-279.

HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira Ciencia do Solo**, v.18, p.339-364, 1994.

HUNGRIA, M. et al. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.32, p.1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. ; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja: (Embrapa Soja. Circular Técnica 35. Embrapa Cerrados. Circular Técnica 13).ed, 2001a. 48 p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. ; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v.39, p.88-93, 2003.

HUNGRIA, M. et al. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.33, p.387-394, 2001b.

HUNGRIA, M.; JOSEPH, C. M. ; PHILLIPS, D. A. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, v.97, p.751-758, 1991a.

HUNGRIA, M.; JOSEPH, C. M. ; PHILLIPS, D. A. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, v.97, p.759-764, 1991b.

HUNGRIA, M. ; NEVES, M. C. P. Cultivar and *Rhizobium* strain effects on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. . **Plant and Soil**, v.103, p.111-121, 1987.

HUNGRIA, M. ; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.819-830, 1997.

HUNGRIA, M. ; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. ; ARAUJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T., HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, Brazil, 1997. p.189-295.

ICSP. ICSP Subcommittee on the taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* - diversity, phylogeny and systematics. <<http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/node/4>> acesso em agosto de 2012.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v.65, n.2-3, p.197-209, 2000.

JORDAN, D. C. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. . In: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p.235-244.

KASCHUK, G. et al. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.32, p.210-220, 2006a.

KASCHUK, G. et al. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil & Tillage research**, v.87, p.205-217, 2006b.

LAGUERRE, G. et al. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.56-63, 1994.

LAGUERRE, G. et al. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v.147, n.4, p.981-993, 2001.

LI, M. et al. Genetic diversity, community structure and distribution of rhizobia in the root nodules of *Caragana* spp. from arid and semi-arid alkaline deserts, in the north of China. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, n.4, p.239-245, 2012.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. . Porto Alegre: Artmed, v.12ed, 2010. 1160 p.

MARIOT, E. J. Ecofisiologia do feijoeiro. . In: IAPAR (Ed.). **O feijão no Paraná**. Londrina, IAPAR, Circular, 63, 1989. p.25-41.

- MARTENS, M. et al. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.489-503, 2007.
- MARTINEZ, E. et al. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, v.131, n.7, p.1779-1786, 1985.
- MARTINEZ-ROMERO, E. et al. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.417-426, 1991.
- MEHNAZ, S. et al. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, n.10, p.1848-1856, 2010.
- MENNA, P.; BARCELLOS, F. G. ; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.2934-2950, 2009.
- MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.4, p.315-332, 2006.
- MERRICK, M. ; DIXON, R. Why don't plants fix nitrogen? **Trends in Biotechnology**, v.2, n.6, p.162-166, 1984.
- MICHIELS, J. et al. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, n.3, p.193-205, 1998.
- MOSTASSO, L. et al. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian cerrados. **Field Crops Research**, v.73, p.121-132, 2002.
- NETO, I. V. R.; RIBEIRO, R. A. ; HUNGRIA, M. Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and *glnII* genes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.1291-1302, 2010.
- ORMEÑO-ORRILLOA, E. et al. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and Applied Microbiology** v.29, p.253–262, 2006.
- PARRA, M. S. Calagem e adubação-Instituto Agronômico do Paraná. In: (Ed.). **Feijão-tecnologia de produção**. Londrina, 2000.
- PERRET, X.; STAEHELIN, C. ; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v.64, n.1, March 1, 2000, p.180-201, 2000.
- PULAWSKA, J. et al. *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, n.4, p.215-220, 2012.

- QUINTO, C.; DE LA VEGA, H. ; FLORES, M. Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.82, n.4, p.1170-1174, 1985.
- RAMÍREZ-BAHENA, M. H. et al. Mesorhizobial strains nodulating *Anagyris latifolia* and *Lotus berthelotii* in Tamadaya ravine (Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, *Mesorhizobium tamadayense* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, n.5, p.334-341, 2012.
- REINHARDT, É. L. et al. Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.414-422, 2008.
- RELARE. Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola. v.13, 2006.
- RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; C, F. L. T. ; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v.160, p.297-306, 2009.
- RIBEIRO, R. A. et al. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. . **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, p.1179-1184, 2012.
- RIVAS, R. et al. Multilocus sequence analysis of the genus Bradyrhizobium. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, n.2, p.101-110, 2009.
- ROBERTSON, G. P. ; GROFFMAN, P. M. Nitrogen Transformations. In: PAUL, E. (Ed.). **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 3rd ed. Hardcover – Academic Press, 2007. p.341-364.
- ROHLF, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1 user guide. **Exeter Software**, p.39, 1994.
- RUBIO, L. M. ; LUDDEN, P. W. Chapter 4 - The Gene Products of the nif Regulon. In: LEIGH, G. J. (Ed.). **Nitrogen Fixation at the Millennium**. Amsterdam: Elsevier Science, 2002. p.101-136.
- SAITOU, N. ; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425, 1987.
- SANTOS, C. E. R. S. et al. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M. D. V. B. (Ed.). **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p.17-41.
- SAS, I. **SAS/ STAT User's Guide**. v.12, p.Cary, N. C, USA. SAS Institute Inc, 1999.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W. ; MARTINEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, n.2, p.374-377, 1993.

SNEATH, P. H. A. ; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: W. H. Freeman.ed, 1973. 573 p.

SNEATH, P. H. A. I. **International code of nomenclature of bacteria**. American Society for Microbiology, Washington, DC.ed, 1992

STACKEBRANDT, E. et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.1043-1047, 2002.

STEPKOWSKI, T. et al. Distinct *Bradyrhizbium* communities nodulate legumes native to temperate and tropical monsoon Australia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.63, n.2, p.265-277, 2012.

STRALIOTTO, R. A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro. Embrapa, CNPAB. Disponível em http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fbni_inocula_feijoeiro Acesso em: ago. 2012.

STRALIOTTO, R. et al. Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L) isolated from Brazilian tropical soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.71, p.3-11, 1999.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, n.10, October 1, 2011, p.2731-2739, 2011.

TEIXEIRA, M. A. et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.42-49, 2007.

THOMPSON, F. L. et al. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.5107-5115, 2005.

THOMPSON, J. D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TINDALL, B. J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v.60, p.249–266, 2010.

TISDALE, S. L. ; NELSON, W. L. Soil and fertilizer nitrogen. In: TISDALE, S. L. e NELSON, W. L. (Ed.). **Soil and fertilizer nitrogen**. New York : Macmillan, 3.ed 1975. p.122-188.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. ; CASE, C. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed. 10. ed, 2012. 934 p.

VALVERDE, A. et al. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2631-2637, 2006.

VALVERDE, A. et al. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.1979-1983, 2003.

VAN BERKUM, P. et al. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of Rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.10, p.2988-2998, 2003.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v.60, p.407-438, 1996.

VARGAS, M. A. T. ; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja In: Vargas, M. A. T., Hungria, M. **Bilogia dos solos dos Cerrados**, p.527, 1997.

VELÁZQUEZ, E. et al. Analysis of core genes supports the reclassification of strains *Agrobacterium radiobacter* K84 and *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 into the species *Rhizobium rhizogenes*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, n.5, p.247-251, 2010.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

VINCENT, J. M. The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. In: VINCENT, J. M. (Ed.). **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific.: IBP Handbook, 1970. p.1-13.

VINCENT, J. M. **Nitrogen fixation in legumes**. Sidney: Academic Pressed, 1982. 288 p.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991.

WOESE, C. R. ; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n.11, p.5088-5090, 1977.

WOESE, C. R.; KANDLER, O. ; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p.4576-4579, 1990.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L. ; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v.73, p.2271-2277, 1991.

ZIMMERMANN, M. J. D. O. ; TEIXEIRA, M. G. Origem e evolução In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A., et al (Ed.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. p.57-70.

ANEXOS

ANEXO A
Applied genética and molecular biotechnology

Appl Microbiol Biotechnol (2012) 93:2035–2049
DOI 10.1007/s00253-011-3708-2

APPLIED GENETICS AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY

Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Juscélio Donizete Cardoso · Mariangela Hungria · Diva S. Andrade

Received: 27 July 2011 / Revised: 22 October 2011 / Accepted: 4 November 2011 / Published online: 9 December 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a legume that has been reported as highly promiscuous in nodulating with a variety of rhizobial strains, often with low effectiveness in fixing nitrogen. The aim of this work was to assess the symbiotic efficiency of rhizobial strains isolated from common bean seeds, nodules of *Arachis hypogaea*, *Mucuna pruriens*, and soils from various Brazilian agroecosystems, followed by the characterization of elite strains identified in the first screening. Forty-five elite strains were analyzed for symbiotic properties (nodulation, plant-growth, and nitrogen-fixation parameters) under greenhouse conditions in pots containing non-sterile soil,

and variation in symbiotic performance was observed. Elite strains were also characterized in relation to morpho-physiological properties, genetic profiles of repolymerase chain reaction (PCR; BOX), and restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR of the 16S rRNA. Sequence analyses of the 16S rRNA were obtained for 17 strains representative of the main groups resulting from all previous analyses. One of the most effective strains, IPR-Pv 2604, was clustered with *Rhizobium tropici*, whereas strain IPR-Pv 583, showing lower effectiveness in fixing N₂, was clustered with *Herbaspirillum lusitanum*. Surprisingly, effective strains were clustered with unusual symbiotic genera/species, including *Leifsonia xyli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia*, and *Enterobacter*. Some strains recognized in this study were outstanding in their nitrogen-fixing capacity and therefore, show high biotechnological potential for use in commercial inoculants.

J. D. Cardoso
Department of Microbiology, Universidade Estadual de Londrina,
Cx. Postal 60001,
86051-990 Londrina, Paraná, Brazil
e-mail: juscelio.cardoso@yahoo.com.br

J. D. Cardoso · M. Hungria
Embrapa Soja,
Cx. Postal 231,
CEP 86001-970 Londrina, Paraná, Brazil

M. Hungria
e-mail: hungria@cnpso.embrapa.br

M. Hungria
e-mail: hungria@pq.cnpq.br

J. D. Cardoso · D. S. Andrade
Instituto Agronômico do Paraná,
Cx. Postal 481,
CEP 86047-902 Londrina, Paraná, Brazil

D. S. Andrade (✉)
IAPAR,
Cx. Postal 481,
CEP 86047-902 Londrina, Paraná, Brazil
e-mail: diva@iapar.br

Keywords Biological nitrogen fixation · BOX-PCR · RFLP-PCR · 16S rRNA · *Phaseolus vulgaris* · Principal component analysis (PCA)

Introduction

Phaseolus vulgaris L., known as common bean, is widely cultivated in Central and South America and in many countries of Africa and Asia, representing an important source of protein for human consumption. The crop can greatly benefit from its nitrogen (N₂)-fixing symbiosis with soil-borne bacteria belonging mainly to the genus *Rhizobium*. However, an important limitation to the nitrogen supplied by the root nodules has been attributed to the highly promiscuous nature of the legume in nodulating with

a variety of bacteria, often not symbiotically effective (e.g., Hungria et al. 2000, 2003; Michiels et al. 1998).

The efficacy of rhizobial strains in nodulating and fixing atmospheric nitrogen (N_2) with common bean is influenced by both the host and the bacterium genotypes, and broad variability in symbiotic performance has been reported (Aguilar et al. 1998; Michiels et al. 1998; Moawad et al. 1998; Caballero-Mellado and Martinez-Romero 1999). Although, nowadays, Brazil is the main producer and consumer of common bean worldwide and the legume has been cultivated in all Brazilian ecosystems for centuries, very few reports have described diversity of common-bean rhizobia (Andrade et al. 2002; Grange and Hungria 2004; Giongo et al. 2007; Stocco et al. 2008; Mostasso et al. 2002; Grange et al. 2007).

In this work, rhizobial strains isolated from common bean seeds, nodules of *Arachis hypogaea*, *Mucuna pruriens*, and from soils of various agroecosystems in Brazil were characterized in terms of phenotypic, genotypic, and symbiotic properties. Novelty was found in relation to unusual symbiotic genera/species associated with the legume. In addition, elite strains with biotechnological potential for use as inoculants were identified, and approaches towards speeding strain-selection programs are discussed.

Materials and methods

Bacterial strains

Approximately 1,500 isolates from different agroecosystems were analyzed in this study. They have been isolated from common bean seeds, nodules of nodules of *A. hypogaea* L., *M. pruriens* Linn, and soils from several Brazilian ecosystems. Strains were evaluated for symbiotic effectiveness (nodulation and shoot dry weight and total N) when used as inoculants for common bean plants grown under controlled greenhouse conditions in 500-mL glass jars containing sterile N-free nutrient solution as substrate. Two replicates were taken per site, and plants were grown for 3 weeks, when nodules were detached proceeding to the isolation of bacteria (data not shown). Forty-five strains were selected out of the 1,500 isolates and were used in this study (listed in Table 1 and Fig. 1). As some of the strains were kept for over 20 years, before starting the experiment, they were checked for the capacity of nodulating common bean under axenic conditions (Vincent 1970), with growth in 1,000-mL flasks filled with paper and sterile nitrogen-free nutrient solution.

All strains are kept cryopreserved at -80°C and lyophilized at the “Collection of Microorganisms of Interest of Agribusiness of the Laboratory of Soil Microbiology”, IAPAR, Londrina, PR, Brazil, and are designed as IPR- and according to original hosts of nodule isolates: *A. hypogaea*,

M. pruriens, and *P. vulgaris*. Three reference strains SEMIA 4077 (CIAT 899), SEMIA 4088 (H 12) (kindly supplied by FEPAGRO, Brazil), and SEMIA 4080 (PRF 81) that are used as commercial inoculants in Brazil for common bean were included in all assays (Table 1). For working samples, strains were maintained in tubes containing yeast mannitol agar medium (YMA) (Vincent 1970) with Congo red (0.00125%), at $4\pm 2^\circ\text{C}$.

Symbiotic efficiency in greenhouse soil pot experiment

Experiment conduction and harvest

The symbiotic efficiency of the 45 elite rhizobial strains was verified in one greenhouse experiment using as host plant common bean cultivar IPR Colibri, characterized by an early maturing group (65 days to complete growth cycle) and colored seeds. The experiment was carried out at the experimental station of IAPAR, Londrina, Paraná, southern Brazil. Plastic pots were filled with 3.5 kg of soil collected from the surface layer (0–20 cm) of a soil covered with natural vegetation composed by grasses, with no history of common bean cultivation. Soil chemical properties at sowing were determined after Pavan et al. (1992), and the results obtained were: soil $\text{pH}_{(\text{CaCl}_2\ 0.01\text{M})}$ 4.40; exchangeable aluminum $0.60\ \text{cmol}_c\ \text{kg}^{-1}$; exchangeable acidity $7.20\ \text{cmol}_c\ \text{kg}^{-1}$; Ca^{2+} (KCl 1 N) $1.20\ \text{cmol}_c\ \text{kg}^{-1}$; Mg^{2+} (KCl 1 N) $0.53\ \text{cmol}_c\ \text{kg}^{-1}$; K^+ (Mehlich-1) $0.07\ \text{in cmol}_c\ \text{kg}^{-1}$; $5.40\ \text{mg dm}^{-3}$ for P (Mehlich) and 13.84 for total C in mg dm^{-3} ; base saturation of 20%, and effective aluminum saturation of 25%. Before sowing, soil acidity was corrected with dolomitic limestone (29% CaO, 20% MgO) to reach 80% of saturation of bases. Each pot received 4.72 g of triple superphosphate, 1.33 g of sulfate of potassium (K_2SO_4), and 100 mL of a micronutrient solution contained $18.54\ \text{mg L}^{-1}$ of H_3BO_3 , $13.08\ \text{mg L}^{-1}$ of $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.79\ \text{mg L}^{-1}$ of $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $9.23\ \text{mg L}^{-1}$ of $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, $0.18\ \text{mg L}^{-1}$ of $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, and $24.2\ \text{mg L}^{-1}$ of $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

At sowing, the number of rhizobia in the soil was assessed by the most probable number method and the statistical table of Andrade and Hamakawa (1994). Inoculation treatments included the 45 elite strains (IPR-*A. hypogaea*, *M. pruriens*, and *P. vulgaris*) identified in this study, and the three commercial strains of *R. tropici* (Table 1 and Fig. 1). The experimental design was completely randomized with three replicates. Before sowing, seeds were surface-sterilized by immersion in alcohol (95%) for 1 min, followed by sodium hypochlorite (3%) for 3 min, and washed seven times with sterile distilled water. Three plants were grown per pot. For inoculants production bacteria were grown for 3 days at 28°C in YM broth (Vincent 1970) and equalized to a concentration

Table 1 Geographical origin, geographic coordinates, and land use of sampling sites and collection code of bacteria used in this study

Municipality/state/collector(s)/source (day/month/year collected)	Geographic coordinates	Climate/ altitude	Land use	IPR- code of bacteria ^a	Reference
Wenceslau Bráz (Sítio Flor da Serra)/PR; DS Andrade (28/03/1989)	23°52'27" S 49°49'14" W	Cfa/850 m	Pv	Pv 3087 ^b Pv 263 ^c ; 348 ^c ; 445 ^b ; 446 ^b ; 453 ^b ; 497 ^d ; 506 ^c ; 515 ^d	This study
Wenceslau Bráz/PR; DS. Andrade (22/02/2001)	23°52'26" S 49°48'10" W	Cfa/841 m	Pv	Pv 517 ^d ; 524 ^d	This study
Prado Ferreira/PR; AD Campos (18/02/2000)	23°02'20" S 51°26'31" W	Cfa/651 m	<i>C. arabica</i>	Mp 195 ^d ; Pv 1045 ^c ; Alh 367 ^d	This study
Palmital/PR; WM Kranz (19/03/1990)	24°53'34" S 52°12'10" W	Cfb/840 m	<i>Z. mays</i>	Pv 680 ^b	This study
Centenário do Sul/PR; DS Andrade (30/05/1990)	22°49'15" S 51°35'42" W	Cfa/560 m	Pv	Pv 685 ^b	This study
Cerro Azul/PR; WM Kranz (29/03/1990)	24°49'26" S 49°15'39" W	Cfb/318 m	Pv	Pv 1097 ^b	This study
Pitanga (Capocira velha)/PR; WM Kranz (19/03/1990)	24°55'35" S 51°45'39" W	Cfb/952 m	<i>Z. mays</i>	Pv 1249 ^b	This study
Pitanga (Boaventura)/PR; WM Kranz (19/03/1990)	24°45'25" S 51°45'39" W	Cfb/952 m	<i>Z. mays</i>	Pv 1326 ^b	This study
Irati/PR; DS Andrade 28/05/1992	25°28'01" S 50°39'03" W	Cfb/812 m	Pv	Pv 1362 ^c	This study
Rio Branco do Sul/PR; WM Kranz (28/03/1990)	25°11'24" S 49°18'50" W	Cfb/960 m	<i>Z. mays</i>	Pv 1252 ^b	This study
Pato Branco/PR; DS Andrade (07/04/1989)	26°13'44" S 52°40'15" W	Cfa/760 m	Pv	Pv 1281 ^b	This study
Tibagi/PR; DS Andrade (26/01/04)	24°30'32" S 50°24'50" W	Cfb/740 m	Pv	Pv 2604 ^d ; 2608 ^d	This study
Cruz Machado/PR; WM Kranz (03/04/1990)	26°01'01" S 51°20'49" W	Cfb/950 m	<i>M. esculenta/ Oryza sativa</i>	Pv 3085 ^b	This study
Londrina/PR; DS Andrade (26/04/2001)			Seeds	Pv 591 ^c ; 598 ^c ; 611 ^c ; 615 ^c ; 696 ^c ; 889 ^c ; 2230 ^c	This study
Serrinha/MG; DS Andrade (20/04/2001)			Seeds	Pv 509 ^c ; 580 ^c ; 589 ^c ; 593 ^c ; 652 ^c 689 ^c ; 692 ^c ; 809 ^c	This study
São Paulo/SP; DS Andrade (20/04/2001)			Seeds	Pv 583 ^c ; 2231 ^c ; 2234 ^c ; 2248 ^c ; 2303 ^c	This study
Colombia				SEMIA4077 (CIAT899)	<i>R. tropici</i> ^f
Irati/PR; DS Andrade (28/05/1992)	25°28'01" S 50°39'03" W	Cfb/812 m	<i>Z. mays</i>	SEMIA4080 (PRF81=IPR- Pv 81 ^c)	<i>R. tropici</i> ^g
Planaltina/Go				SEMIA 4088 (H-12)	<i>R. tropici</i> ^h

PR Paraná, SP São Paulo, MG Minas Gerais, Go Goiás

^aIPR-code of bacteria from Culture Collection of Agronomic Institute of Paraná, Londrina, Paraná, Brazil

^bNodule from plants growing in soil in pot

^cNodule from plants inoculated with soil suspension

^dNodule from field-grown legumes

^eNodule from plants inoculated with seeds suspension

^fMartinez-Romero et al. (1991)

^gHungria et al. (2000)

^hMostasso et al. (2002)

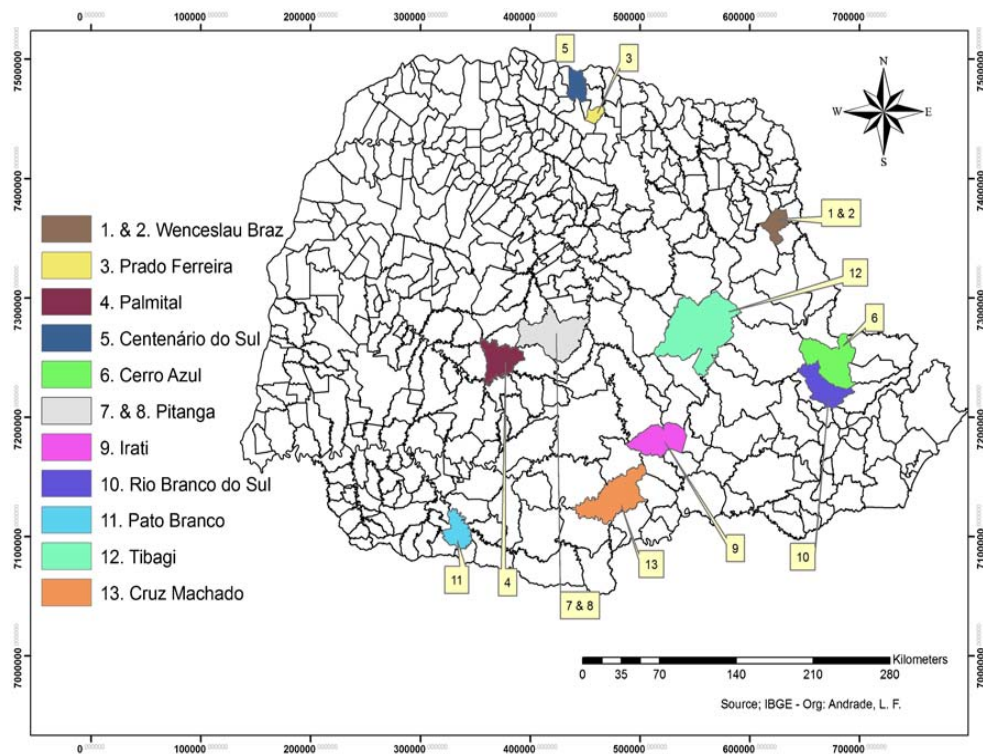


Fig. 1 Map of Paraná state (Brazil) showing the sampling sites indicated by numbers (For details see Table 1)

of 10^8 cells mL^{-1} . Surface sterilized seeds were immersed in the inoculants consisted of single strains. Two non-inoculated controls were included, without or with mineral N. Treatment with mineral N received 777 mg of N per pot containing three plants, split ten times, weekly, by using a solution of 2% NH_4NO_3 .

During the experiment, soil moisture was kept around 60% to 70% of water hold capacity by irrigating daily with distilled sterile water. At 42 days after emergence (DAE)—flowering stage—plants were collected to evaluate the following parameters: shoot dry weight (leaves, stems, and petioles), nodulation (nodule number and dry weight), total N in shoots, total N, *N*-ureide (allantoin and allantoic acid), and *N*-nitrate in the xylem sap. Xylem sap was collected at 42 DAE from 6:00 AM to 8:00 AM. For sap collection, shoots were cut at the stem base close to the internodes, washed with sterile water, and then dried with sterile cotton. The sap, exuding from the three decapitated plants in each pot, was recovered with a sterile pipette after 10 to 15 min, bulked, immediately placed on ice, and then taken to the laboratory, where it was frozen till the analysis of total N, *N*-ureide, and *N*-nitrate.

Plant harvest and analyses

After sap collection, roots were removed, washed, and nodules were also removed. Plant material was placed in a

forced-air dryer at 65°C till constant weight (approximately 72 h). Nodulation parameters evaluated included nodule number and dry weight.

Total N in shoots was evaluated in the dried (65 °C) and grinded tissues and in the xylem sap, by the Kjeldahl digestion method (Bremner and Keeney 1966). The determination of *N*-ureide in the xylem sap was based on the method of alkaline hydrolysis of allantoin and acid hydrolysis to determine the allantoic acid content (Herridge et al. 1990). Nitrate in the xylem sap was evaluated by the salicylic acid method as described elsewhere (Miyazawa et al. 1985). Percentage of *N*-ureide was calculated as described by (Herridge DF, Peoples MB 1990).

The relative efficiency index (Brockwell et al. 1966) that measures the accumulation of N fixed in relation to the controls was defined as $\text{REI} = (T - C/N - C) \times 100$, where T, C, and N = dry weight of shoots in each treatment, in control, and in nitrogen treatments, respectively.

Statistical analyses

Data obtained from the greenhouse experiment were subjected to the analysis of variance, and when *F* was significant, the Scott Knott test of means was applied with 5% of probability using the SAS statistical software (Statistical Analysis System), with the procedure “PRIN-

COMP” (SAS 1999). For the principal components analysis (PCA) the variables selected were based on the following data: shoot dry weight (grams per plant), total N in shoots (milligrams per plant), total N in the xylem sap (micrograms mole per milliliter), N-ureide (percent), dry weight of individual nodule (milligrams per nodule), and nodule dry weight per plant (milligrams per plant). From the data generated in the PCA the “PROC CLUSTER” and “COMPLETE”, methods were applied to generate the dendrogram using the procedure “PROC TREE” from the matrix D2 of Euclidean distance (SAS 1999).

Morpho-physiological characterization

Colony morphology (size, shape, texture, gum production, elevation, borders, structure, brightness, and transparency) was assessed in bacteria grown in YMA medium containing Congo red (0.00125%) after 3 days of growth in the dark at 28°C. Acid/alkaline reaction was evaluated after 3 days of growth in YMA-containing bromothymol blue (0.00125%) as indicator, also after 3 days of growth in the dark at 28°C. Melanin production by strains was evaluated as previously described (Cubo et al. 1997). Briefly, each strain was grown for 6 days in plates containing tryptone agar medium supplemented with 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of L-tyrosine and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of copper (III) sulphate. A solution of 10% (w/v) lauryl sulphate (SDS) sodium salt was sprayed over the rhizobia colonies, which were then kept at room temperature for at least 6 h. The data were record as absence (0) or presence (1) of melanin.

Data from morpho-physiological characterization were transformed into a binary matrix, and cluster analysis was performed by using NTSYS-pc (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System, version 2.1, Exeter Software, USA).

Genetic characterization

DNA extraction

DNA of each strain was extracted according to the procedure of Kaschuk et al. (2006). Integrity of the DNA was confirmed by electrophoresis in 0.8% agarose gels, for 50 min, at 80 V, using as a comparison Low DNA Mass™ Ladder (Invitrogen™, Life Technologies). Gels were stained with ethidium bromide and visualized under UV light. Before all polymerase chain reaction (PCR) analyses, the extracted DNA was quantified using microspectrophotometer (Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer, Uniscience), with readings at a wavelength of 280 and 260 nm. When necessary, the DNA was diluted to perform PCR.

PCR fingerprinting with specific BOX A1R primer

The DNA of each bacterium was amplified by PCR with the BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3', Invitrogen™, Life Technologies) primer (Versalovic et al. 1994). The PCR reaction and cycles were performed according to Kaschuk et al. (2006). The reactions were carried out in an MJ Research Inc. PTC-100™ thermocycler and amplified fragments were separated by horizontal electrophoresis on a 1.5% agarose gel at 100 V, for 6 h. Gels were stained with ethidium bromide, visualized under UV light, and photographed with a Kodak Digital Science 120 apparatus.

Cluster analysis was performed with the BOX-PCR-amplified products using the Bionumerics program (Applied Mathematics, Kortrijk, v.4.6), with the UPGMA algorithm (unweighted pair-group method with arithmetic mean) and the coefficient of Jaccard (*J*) (Sneath and Sokal 1973).

Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rDNA genes

The DNA of each bacterium was amplified with primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al. 1991). PCR products were digested with the restriction endonucleases *MspI* (=HpaII) (5'-C/CGG-3'), *HinfI* (5'-G/ANTC-3'), *RsaI* (5'-GT/AC-3'), and *HaeIII* (5'-GG/CC-3') (Invitrogen™, Life Technologies), following the manufacturer's specifications. Fragments obtained were analyzed by horizontal electrophoresis on a 3% agarose gel, at 120 V for 4 h and then photographed.

Sequence analysis of the DNA region coding for the 16S rRNA gene

For direct sequencing of the 16S rRNA gene, 17 strains were selected, representative of the main restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR groups and of the cluster analysis based on the PCA of symbiotic characteristics. These strains were deposited at the “Collection of Rhizobium of the FEPAGRO”, Porto Alegre, RS, Brazil, and are designed as SEMIA (Table 5). The DNA of each bacterium was amplified with the universal primers fD1, and rD1 and the sequencing was performed with internal primers, as described by Menna et al. (2006), in an ABI 3031xl (Applied Biosystems) sequencing analyzer.

The sequences obtained for each strain were assembled into contigs using the programs phred (Ewing et al. 1998; Ewing and Green 1998), phrap (www.phrap.org), and Consed (Gordon et al. 1998) and were submitted to the

Table 2 Variables associated with biological N₂ fixation with common bean cultivar IPR Colibri obtained in the experiment performed under greenhouse conditions in pots containing soil

IPR-	Shoot dry weight, g plant ⁻¹	Shoot N, mg plant ⁻¹	Total N (TN) of xylem sap, µg mol mL ⁻¹	N-ureide ^a , %	Nodule number ^b	Total nodule, mg dry weight plant ⁻¹	Individual nodule, mg dry weight plant ⁻¹	Relative efficiency index (REI)	
								TN	Nod
<i>Mp</i> 195	4.26 A	106 A	115.5 A	63.6 B	602.4 B	564 C	0.9384 B	20	200
<i>Pv</i> 263	6.01 A	145 B	66.8 A	82.7 C	485.6 B	406 C	0.8696 B	54	140
<i>Pv</i> 348	5.40 A	110 A	110.4 A	68.1 B	393.2 B	428 C	1.1724 B	23	148
<i>Ah</i> 367	7.51 B	198 B	94.9 A	62.3 B	664.9 B	494 C	0.7920 A	100	173
<i>Pv</i> 445	7.52 B	156 B	60.3A	74.9 C	497.6 B	433 C	0.8903 B	63	150
<i>Pv</i> 446	5.82 A	125 A	227.8 A	63.9 B	655.9 B	526 C	0.8080 A	37	185
<i>Pv</i> 453	4.87 A	111 A	115.9 A	73.2 C	454.9 B	443 C	0.9728 B	24	154
<i>Pv</i> 497	5.20 A	108 A	112.0 A	74.7 C	652.3 B	499 C	0.7655 A	22	175
<i>Pv</i> 506	4.81 A	107 A	88.7 A	78.0 C	465.2 B	465 C	1.0546 B	21	162
<i>Pv</i> 509	5.38 A	75 A	157.8 A	33.4 A	608.9 B	355 C	0.5848 A	-7	120
<i>Pv</i> 515	5.91 A	140 B	70.8 A	59.2 B	281.7 A	196 A	0.5126 A	50	60
<i>Pv</i> 517	4.53 A	115 A	136.1 A	61.3 B	342.0 A	235 B	0.6317 A	28	75
<i>Pv</i> 524	5.74 A	138 B	137.4 A	71.2 C	417.9 B	475 C	1.1330 B	48	166
<i>Pv</i> 580	7.02 B	162 B	60.0 A	79.2 C	229.2 A	146 A	0.5960 A	69	41
<i>Pv</i> 583	4.36 A	89 A	95.4 A	81.3 C	206.1 A	162 A	0.5086 A	5	47
<i>Pv</i> 589	6.75 B	110 A	89.6 A	74.1 C	501.4 B	375 C	0.7568 A	23	128
<i>Pv</i> 591	5.51 A	130 A	107.1 A	86.8 C	512.6 B	488 C	0.9779 B	41	171
<i>Pv</i> 593	6.57 B	175 B	85.8 A	73.4 C	343.4 A	243 B	0.7697 A	80	78
<i>Pv</i> 598	5.46 A	118 A	93.7 A	69.5 C	365.3 A	291 B	0.8214 A	30	96
<i>Pv</i> 611	5.49 A	119 A	188.0 A	78.9 C	423.4 B	428 C	1.0597 B	31	148
<i>Pv</i> 615	7.44 B	126 A	105.0 A	77.5 C	485.7 B	291 B	0.5897 A	37	96
<i>Pv</i> 652	6.81 B	169 B	50.0 A	77.2 C	593.2 B	458 C	0.8115 A	75	159
<i>Pv</i> 680	5.93 A	136 A	113.2 A	70.4 C	435.4 B	493 C	1.1656 B	46	173
<i>Pv</i> 685	5.46 A	123 A	163.2 A	57.9 B	452.8 B	468 C	1.0535 B	35	163
<i>Pv</i> 689	5.53 A	96 A	93.7 A	65.0 B	406.4 B	304 B	0.7480 A	11	101
<i>Pv</i> 692	7.10 B	103 A	96.1 A	63.1 B	589.5 B	404 C	0.6891 A	17	139
<i>Pv</i> 696	4.81 A	92 A	82.5 A	72.8 C	440.6 B	468 C	1.2564 B	8	163
<i>Pv</i> 809	5.05 A	89 A	102.6 A	68.0 B	412.3 B	425 C	1.0383 B	5	147
<i>Pv</i> 889	5.24 A	103 A	115.9 A	71.4 C	488.6 B	477 C	1.0649 B	17	167
<i>Pv</i> 1045	6.02 A	110 A	105.3A	72.8 C	561.6 B	520 C	0.9254 B	23	183
<i>Pv</i> 1097	5.70 A	134 A	115.9 A	67.9 B	330.4 A	246 B	0.7226 A	44	79
<i>Pv</i> 1249	5.67 A	111 A	109.2 A	65.8 B	518.1 B	507 C	0.9798 B	24	178
<i>Pv</i> 1252	4.90 A	120 A	101.3 A	64.6 B	537.0 B	484 C	0.9236 B	32	169
<i>Pv</i> 1281	5.69 A	128 A	127.5 A	63.0 B	478.6 B	472 C	1.0347 B	39	165
<i>Pv</i> 1326	7.13 B	169 B	87.1 A	74.4 C	495.8 B	472 C	1.0730 B	75	165
<i>Pv</i> 1362	4.69 A	103 A	119.7 A	56.6 B	543.4 B	500 C	0.9866 B	17	175
<i>Pv</i> 2230	4.80 A	95 A	138.9 A	71.7 C	424.8 B	344 B	0.8190 A	10	116
<i>Pv</i> 2231	5.02 A	114 A	152.5 A	65.8 B	492.9 B	372 C	0.7551 A	27	127
<i>Pv</i> 2234	5.92 A	115 A	125.8 A	72.5 C	403.4 B	416 C	1.0296 B	28	143
<i>Pv</i> 2248	5.94 A	118 A	131.8 A	54.3 B	459.2 B	366 C	0.7769 A	30	124
<i>Pv</i> 2303	4.63 A	87 A	101.2 A	78.5 C	491.0 B	416 C	0.8465 B	3	143
<i>Pv</i> 2604	4.21 A	62 A	110.9 A	57.7 B	417.8 B	379 C	0.9073 B	-18	129
<i>Pv</i> 2608	7.34 B	172 B	163.0 A	61.0 B	546.5 B	263 B	0.4809 A	77	85
<i>Pv</i> 3085	5.81 A	126 A	107.7 A	73.2 C	594.0 B	529 C	0.8891 B	37	186
<i>Pv</i> 3087	7.36 B	164 B	77.7 A	77.3 C	451.1 B	325 B	0.7163 A	70	109

Table 2 (continued)

IPR-	Shoot dry weight, g plant ⁻¹	Shoot N, mg plant ⁻¹	Total N (TN) of xylem sap, μgmolL ⁻¹	N-ureide ^a , %	Nodule number ^b	Total nodule, mg dry weight plant ⁻¹	Individual nodule, mg dry weight plant ⁻¹	Relative efficiency index (REI)	
								TN	Nod
4077	7.60 B	131 A	102.6 A	77.5 C	673.3 B	302 B	0.4477 A	42	100
4080	6.68 B	114 A	99.4 A	75.6 C	545.3 B	365 C	0.6617 A	27	124
4088	7.44 B	99 A	98.3 A	66.4 B	749.8 B	303 B	0.4234 A	14	100
Control	5.53 A	83 A	83.2 A	63.2 B	208.0 A	39 A	0.2675 A	0	0
Nitrogen	11.23 C	198 B	99.9 A	57.0 B	510.7 B	202 A	0.4498 A	100	62
Pr > F	<0.0001	0.0003	0.0006	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0002		
CV, %	16.65	28.17	33.98	9.26	14.37	25.70	30.71		

^aData transformed to arcsine and ^bsquare root, respectively. Means followed by the same letter are not statistically different at 5% level according to Scott Knott multiple range test. Relative efficiency index (REI)=(T-C/N-C)X 100, where T, C, and N = dry weight of shoots in each treatment, in control, and in nitrogen treatment, respectively

GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) to seek for significant alignments.

The sequences obtained in this study and from the GenBank (Table 5) were aligned with the ClustalX version 1.83 (Thompson et al. 1997). The phylogenetic tree was generated using the MEGA program version 5 (Kumar et al. 2004) with the neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei 1987). Statistical support for the tree nodes was evaluated by bootstrap analyses (Felsenstein 1985) with 2,000 samplings (Hedges 1992).

Results

Symbiotic efficiency

In the greenhouse experiment performed in pots containing soil, shoot dry weight ranged from 4.21 to 7.52 g plant⁻¹, referring to inoculation with strains IPR-*Pv* 2604 and *Pv*-445, respectively. Total N in shoots also was significantly affected by strains, ranging from 62 to 198 mg plant⁻¹. Based on shoot total N, two main groups were

observed, one consisting of 11 very effective strains, accumulating from 138 to 198 mg N plant⁻¹ and without statistical difference from the treatment receiving mineral N. The second group contained significantly less total N than the plants supplied with mineral N. The fraction of N-ureide ranged from 33% to 87% in inoculated plants, with the highest and lowest values obtained with strains IPR-*Pv* 509 and *Pv*-591, respectively (Table 2).

The indigenous population of rhizobia was estimated at 10⁶ CFU (grams per dry soil), even though the soil had no history of common bean cultivation. Therefore, non-inoculated treatments plants were nodulated, and the ureide-N was estimated at 57% and 63% in the control treatments with and without mineral N, respectively. In general, common bean has small nodules; however, in some of the inoculated treatments, individual nodules were heavier than 1 mg of dry weight nodule⁻¹. The relative symbiotic efficiency index based on total N in the shoot and nodule mass revealed that some IPR- strains had high efficiencies, for example, IPR-*Ah* 367 and IPR-*Mp* 195, respectively, whereas others, such as strain IPI-*Pv* 2604, were poor N₂ fixers (Table 2).

Table 3 Pearson's correlation coefficients (N=50) among N₂-fixation variables and select multivariate variables

	Dry shoot, g	Shoot N, mg	Total N of xylem	N-ureide, %	Total nodule, mg	Individual nodule, mg	PC1 (Y1)	PC2 (Y2)	PC3 (Y3)
Dry shoot, g	1.000	0.718**	-0.187 ns	-0.178 ns	-0.269 ns	-0.423*	-0.784**	0.462**	0.199 ns
Shoot N, mg		1.000	-0.187 ns	-0.046 ns	-0.072 ns	-0.111 ns	-0.577**	0.728**	0.190 ns
Total N of xylem			1.000	0.266 ns	0.184 ns	0.079 ns	0.401*	-0.146 ns	0.682**
N-ureide, %				1.000	0.159 ns	0.191 ns	0.389*	0.094 ns	0.698**
Total nodule, mg					1.000	0.780**	0.720**	0.575**	-0.135 ns
Individual nodule, mg						1.000	0.772**	0.503**	-0.235 ns

PC1 (principal component axes 1, 2, and 3)

p*<0.001; *p*<0.0001. Number of nodule was not included because of outliers

Six components of plant variables related to N₂ fixation were subjected to a multivariate analysis: shoot dry mass, total N in shoots, total N in the xylem of sap, percent of ureide-N, dry weight of individual nodules, and total nodule dry weight per plant. The association between multivariate analysis techniques (PCA) and cluster analysis was used to assist the selection of efficient strains, a procedure recommended when more than four variables are analyzed. Auto-values of the correlation matrix were

chosen based on three principal components, explaining 81% of the variables. The auto-values were of 2.38 for PC1, 1.35 for PC2, and 1.10 for PC3, and the proportion of variance was of 40%, 22%, and 18%, respectively. The percentage of accumulated variance was of 40% for the first principal component (PC1), 62% for the second (PC2), and 81% for the third (PC3).

The coefficients of Pearson correlation and their probabilities are presented in Table 3. The variables of shoot dry

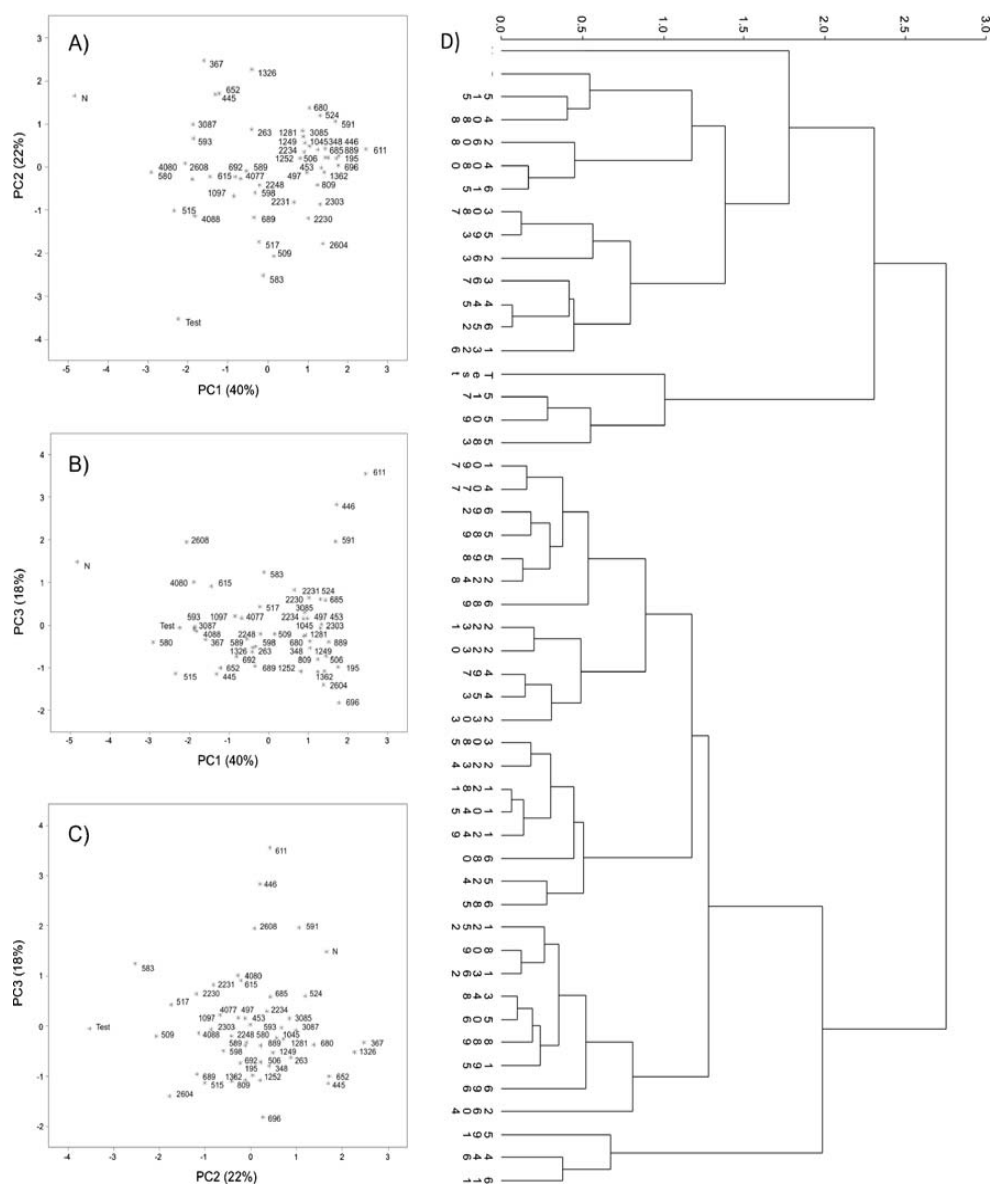


Fig. 2 Dispersion of rhizobial strains according to principal component analysis (PCA): **a** first and second; **b** first and third; and **c** second and third components. **d** Dendrogram showing clustering of the IPR-elite strains of and non-inoculated treatments (with (N) and without

mineral N (test)) with PCA based on N₂-fixation variables (shoot dry weight, total N in shoot, total N, and %N-ureide in the xylem sap, dry weight of nodules, and individual nodule dry weight)

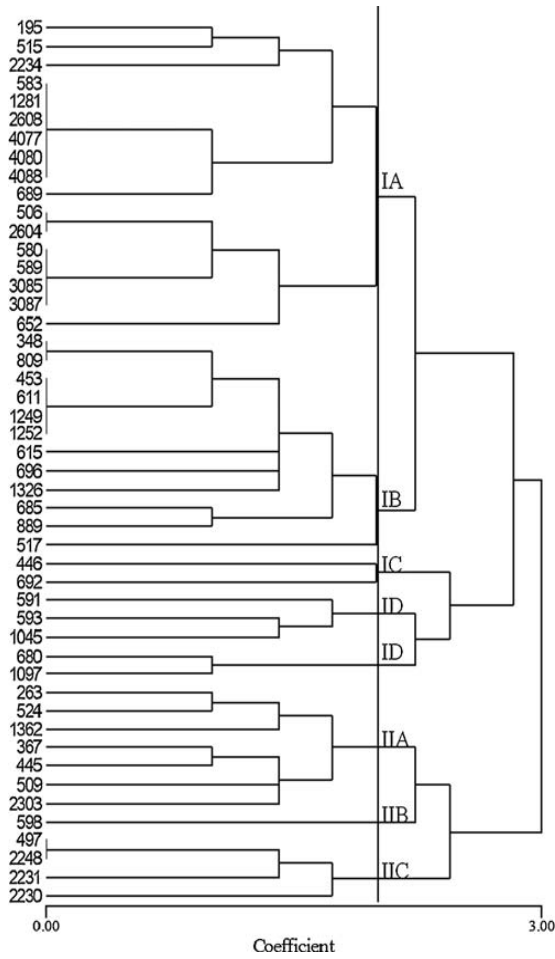


Fig. 3 Cluster analysis of 48 common-bean rhizobial strains isolated from nodules of field-grown plants, inoculated with soil or seed suspensions. Dendrogram was created based on binary matrix and Euclidean distance using 12 phenotypic traits

weight ($r=-0.784, p<0.0001^{**}$), nodule dry weight ($r=0.720, p<0.0001^{**}$), and dry weight of individual nodules ($r=0.772, p<0.0001^{**}$) were highly correlated with the first component. On the other hand, the variable representing the total N in shoots (milligrams per plant) correlated significantly with the second component ($r=0.782, p<0.001^{*}$), whereas the variables related to total N in the xylem sap ($r=0.682, p<0.001^{*}$) and to the % of *N*-ureide-*N* ($r=0.698, p<0.001^{*}$) showed significant correlation with the third component.

Figure 2a shows that strains IPR-*Pv* 583, 591, and 611 formed a group separate from the other treatments, with positive values for both the first (shoot dry weight and nodulation) and second component (PC2) (shoot N) indicators. When compared with the other treatments, mineral N treatment occupied an isolated position.

Table 4 Rhizobial phenotypic traits and profiles of RFLP-PCR of the 16S rRNA with the restriction enzymes *RsaI*, *HinfI*, *HpaII*, *HaeIII*

Phenotypic clusters	Phenotypic clusters								
	IA ^a	IB	IC	ID	IE	2A	2B	2C	
Number of strains	17	12	2	3	2	7	1	4	
Colony size (A)	>2 mm	>2 mm	>2 mm	>2 mm	>2 mm	<2 mm	>2 mm	>2 mm	
Shape (B)	Circular	Circular	Not circular	Circular	Circular	Circular	Not circular	Circular	
Texture (C)	Not viscous	Viscous	Not viscous	Not viscous	Viscous	Viscous	Viscous	Viscous	
Absorbing dye (D)	Yes	Not	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	
Gum production (E)	Yes	Yes	Yes	Not	Yes	Not	Not	Not	
Colony elevation (F)	Convex	Convex	Flat	Convex	Convex	Flat	Convex	Flat	
Colony borders (G)	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	
Structure (H)	Smooth	Smooth	Smooth	Corrugated	Corrugated	Smooth	Smooth	Corrugated	
Brightness (I)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	
Transparency (J)	Opaque	Translucent	Opaque	Translucent	Translucent	Opaque	Translucent	Translucent	
Acid/alkaline (L)	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	Acid	
Melanin (M)	MeI ⁺	MeI ⁺	MeI ⁺	MeI ⁺	MeI ⁺	MeI ⁺	MeI ⁺	MeI ⁺	
Genotype RFLP clusters	II; III; IV; V; VI; VII	I; II; III; IV; V; VI	II; VII	III; IV; VI	I; II	II; III; IV; IX	II	IV; VII	

Evaluations were performed with three replicates

^aComprise the strains of *R. tropici* (SEMIA 4077, 4080, and 4088) recommended for commercial inoculants in Brazil, except that these present texture viscous

Figure 2b shows that strains IPR-*Pv* 591 and 611, although showing high values in Y1 (first principal component), were not high on the axis Y3 (third component). On the scatter plot of the treatments, according to the third and second components (Y3= nitrogen fixation and Y2=plant growth), the strain IPR-*Ah* 367 stood out from the others, while strains IPR-*Pv* 652, 593, and 580 were in an intermediate position. The IPR-*Pv* 2604 strain occupied an isolated position, with a negative index for relative symbiotic efficiency (−18) and, accordingly, lower values for total N in shoots and shoot dry weight (Fig. 2c).

The cluster analysis split the strains in two main groups. Thirty-one IPR- strains, in addition to the commercial strain SEMIA 4080, originally isolated from a soil of Paraná state, fit into the first group. The second group was composed by 14 IPR- strains, in

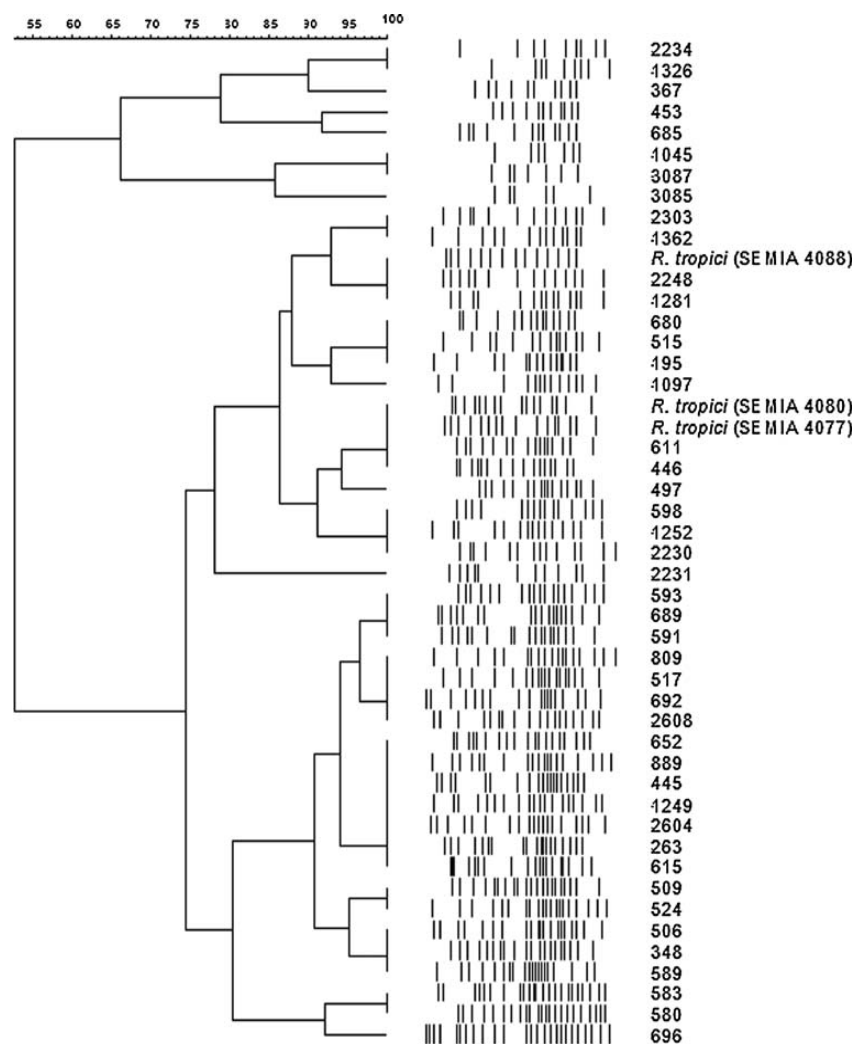
addition to the two remaining SEMIAs (4077 and 4088) and by the non-inoculated treatments, with and without mineral N (Fig. 2d).

Morpho-physiological characterization

When strains were grown in YMA, the predominant colony morphological characteristics were: larger than 2 mm, circular, non-viscous, with gum production, convex in elevation, flat, dull in transparency, and opaque. Similar features were observed in colonies of the reference *R. tropici* SEMIAs 4077, 4080, and 4088. Thirty-eight of the strains had an acid reaction in culture medium containing mannitol as C source, whereas the remainder had an alkaline reaction. Of the 45 strains analyzed, 14 produced melanin.

The cluster analysis based on the matrix and Euclidean distance using 20 phenotypic traits has clearly

Fig. 4 Cluster analysis (UPGMA with the coefficient of Jaccard index and 10% of tolerance in the program Bionumerics) of the PCR products obtained by BOX-PCR analysis of 45 IPR- strains and SEMIA4077 (CIAT899), 4080 (IPR *P. vulgaris* 81) e-4088 (H20)



shown the differentiation of the strains into phenetic clusters (Fig. 3 and Table 4).

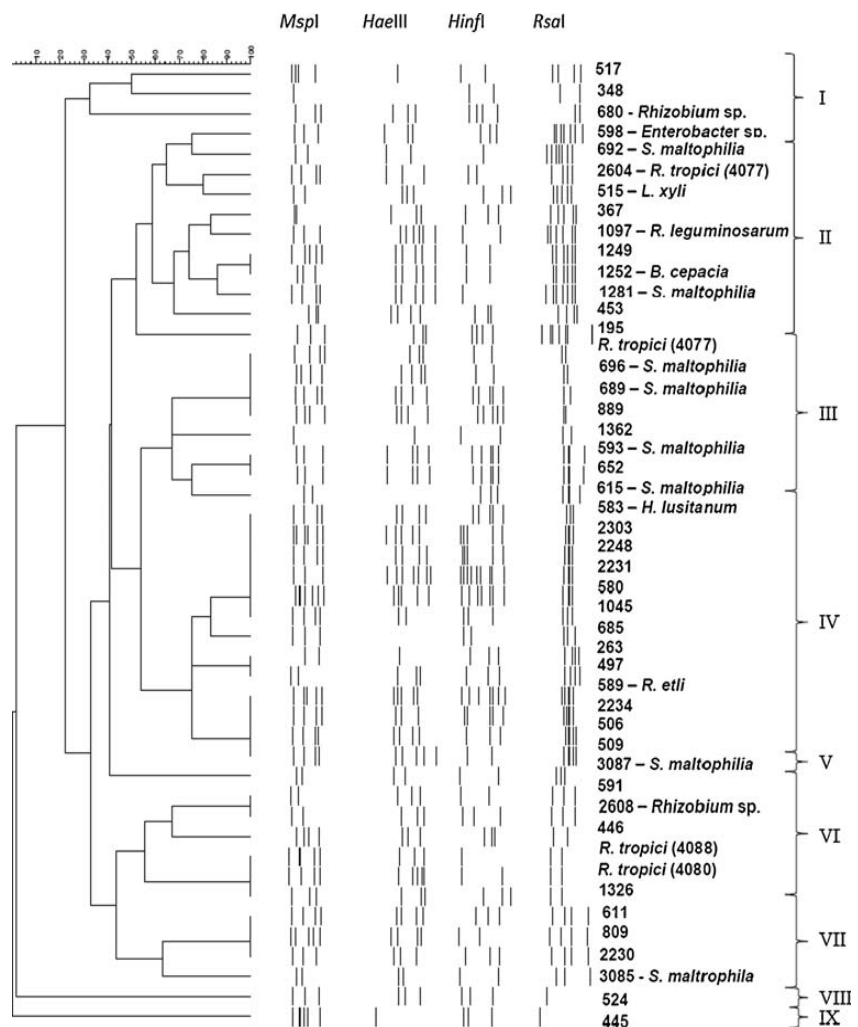
BOXA1R-PCR genomic fingerprinting

When the forty-five strains in this study and the reference strains of *R. tropici* were amplified with the primer BOX1AR, two major clusters were obtained, with a very low final level of similarity (53%). Cluster I comprised eight strains and cluster II 37 strains, in addition to the three reference SEMIAs. Overall, 21 distinct BOX-PCR profiles were observed, but considering the similarity of 70% in the clustering analysis using the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient as in previous studies by our group, e.g., Kaschuk et al. (2006); Grange and Hungria (2004); and Stocco et al. (2008), the strains fit into four different clusters (Fig. 4).

Profiles of RFLP-PCR of the 16S rDNA region

In the analyses of RFLP-PCR of the 16S rDNA with four restriction enzymes, nine groups were observed, three of them comprising strains with unique profiles, for example, clusters V, VIII, and IX with IPR-*Pv* 3087, 445, and 524, respectively (Fig. 5). Strains in cluster I, comprising IPR-*Pv* 517, 348, and 680 isolated from nodules from field-grown plants, plants inoculated with soil suspension, and nodules from pot-grown plants, respectively. In cluster II, similar profiles were observed for 11 strains, which included IPR-*Mp* 195; *Ah* 367, and *Pv* 453, the first and the second isolated from nodules of *Mp* and *Ah* grown in the inter-rows of coffee (*Coffea arabica* L.) crop, and the third one from an area traditionally cropped to common bean. Cluster III included the reference strain of *R. tropici* (SEMIA

Fig. 5 Dendrogram showing the genetic diversity of 45 IPR-rhizobial strains based on profiles of RFLP-PCR of the 16S rRNA region analysis with the restriction enzymes *RsaI*, *HinfI*, *HpaII*, *HaeIII*. For cluster analysis UPGMA with the coefficient of Jaccard were used. The strains, SEMIA 4,077 (CIAT 899), 4080 (PRF 81), and 4088 (H20), recommended for commercial production of inoculants in Brazil, were included



4077, =CIAT 899) and seven IPR-*Pv* strains. Cluster IV was the largest group with 13 strains, only five (IPR-*Pv* 263, 497, 506, 1045, and 685) of which were isolated from nodules of common bean in Paraná State and the remaining from seeds harvested in the states of São Paulo and Minas Gerais. In this cluster, the strain IPR-*Pv* 583 isolated from seeds suspensions of similarity with IPR-*Pv* 2303, 2248, 2231, and 580 that were also isolated from seeds harvested in Minas Gerais and São Paulo and with strain -1045, isolated from a nodule of common bean plant inoculated with soil suspension from inter-row of coffee tree (Fig. 5).

Phylogenetic analysis based on 16S rRNA genes

Seventeen strains were sequenced for the 16S rRNA (Fig. 6 and Table 5). Considering the Blastn, five strains had highest similarity to the genus *Rhizobium*, eight to *Stenotrophomonas*, one to *Burkholderia* and *Leifsonia*, and one to *Herbaspirillum* and *Enterobacter* (Table 5). Of these 17 strains, IPR-*Pv* 589, 680, and 1097 had 100% similarity with *Rhizobium etli* (CIAT151), *Rhizobium* sp. (SEMIA 6435), and *Rhizobium leguminosarum* (RVS11), respectively. Strains IPR-*Pv* 692 and 696 showed similarity lower than 90% with the genus *Stenotrophomonas*. In terms of phenotypic characteristics (Fig. 3 and Table 4), strain IPR-*Pv* 1281 was clustered with the three SEMIAs and with five IPR-*Pv* strains in the genus *Rhizobium*.

Thirteen sequences with more than 1,385 bp were aligned and used to build the phylogenetic tree along with the reference strains, and major groups were observed and clustered at the genus level (Fig. 6).

Discussion

Principal component analysis has been broadly used in several areas of research, and, in our study, its application to the data related to N₂-fixation parameters has been clearly effective in reducing the number of variables needed to evaluate the efficiency of the biological process. For example, it was important to realize that, for the common-bean symbiosis, the parameter of nodule number is not relevant for the selection of strains with higher N₂-fixing capacity.

The majority of the sites in our study had no history of common-bean inoculation, and many also had no history of common-bean cropping. For example, strains IPR-*Pv* 3085 and 1249 were isolated from soils cultivated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and maize (*Zea mays* L.), respectively. Isolation of common-bean rhizobia from these soils could be attributed to the high

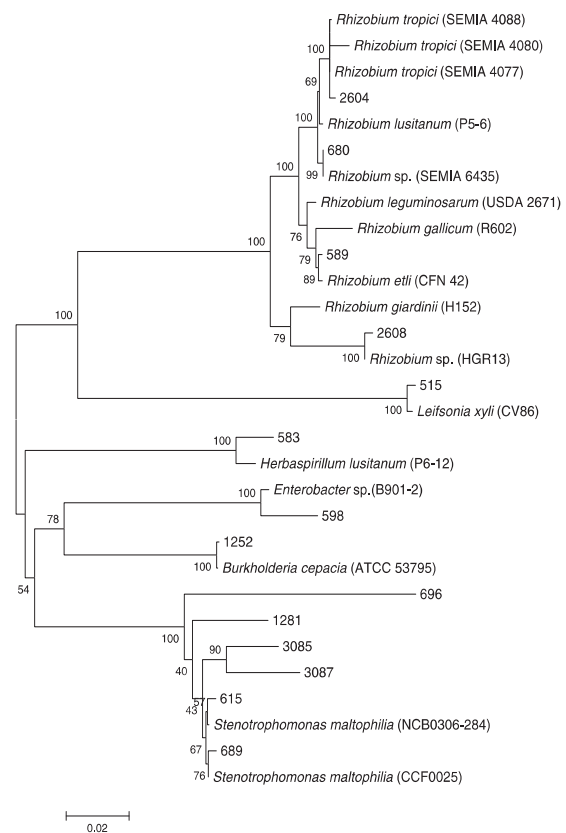


Fig. 6 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of 14 strains (IPR-*Pv*). GeneBank accession numbers are available in Table 5. Phylogenetic trees were generated using MEGA version 5.0 with default parameters, K2P distance model, and the neighbor-joining algorithm

promiscuity of the legume in nodulating with several rhizobial species, apparently resulting from the capacity of the host plant to perceive a variety of rhizobial molecular signals (Michiels et al. 1998). Unfortunately, in general, the promiscuous nodulation of common bean is not related to N₂-fixation efficiency, representing the main limitation to the agronomic exploitation of the symbiosis (e.g., Graham 1981; Hungria and Vargas 2000). However, within indigenous rhizobial populations, elite strains can be identified, and this approach has been successfully used in Brazil (Hungria et al. 2000, 2003). Also in our study, the relative efficiency index estimated taking into account the total N in the shoots revealed several elite strains with great biotechnological potential, such as IPR-*Ah* 367, surprisingly isolated from field-grown *Ah* L., which accumulated high amounts of N, comparable to the control receiving mineral N when inoculated in common bean.

The majority of the strains in our study fit into the long-recognized classification of fast-growers with acid

Table 5 Identification of strains based on the similarity of 16S rRNA sequences using sequences available in the GenBank (NCBI)

Strain (IPR- <i>Pv</i>)	SEMIA	Number of base pair	Most similar sequence found in GenBank (NCBI)			Accession number in GenBank of the strain
			Species	Similarity, %	Accession number	
515	4090	1385	<i>L. xyli</i> (CV86)	99	AJ717351.1	JN208893
583	4091	1391	<i>H. lusitanum</i> (P6-12)	99	NR028859.1	JN208894
589	4092	1425	<i>R. etli</i> (CIAT151)	100	AF313904.1	JN208895
593	4093	661	<i>S. maltophilia</i> (YHYJ-1)	94	FJ765513.1	JN208896
598	4094	1546	<i>Enterobacter</i> sp. (B901-2)	96	AB114268.1	JN208897
615	4095	1537	<i>S. maltophilia</i> (K279a)	99	AM743169.1	JN208898
680	4096	1417	<i>Rhizobium</i> sp. (SEMIA 6435)	100	FJ025130.1	JN208899
689	4097	1539	<i>S. maltophilia</i> (K279a)	99	AM743169.1	JN208900
692	4098	999	<i>S. maltophilia</i> (CCF0025)	89	GU391033.1	JN208901
696	4099	1526	<i>S. maltophilia</i> (ZZ7)	90	DQ113454.1	JN208902
1097	4100	950	<i>R. leguminosarum</i> (RVS11)	100	FJ595998.1	JN208903
1252	4101	1403	<i>Burkholderia cepacia</i> (ATCC 53795)	99	AY741354.1	JN208904
1281	4102	1524	<i>S. maltophilia</i> (IAM 12423)	96	AB294553.1	JN208905
2604	4103	1475	<i>R. tropici</i> (SEMIA 4088)	99	FJ025131.1	JN208906
2608	4104	1442	<i>Rhizobium</i> sp. (R-32539)	99	AM691584.1	JN208907
3085	4105	1533	<i>S. maltophilia</i> (pp5c)	96	GQ360071.1	JN208908
3087	4106	1475	<i>S. maltophilia</i> (PSM-1)	94	FJ888386.1	JN208909

reaction in medium containing mannitol as carbon source (Jordan 1984; Andrade et al. 2002). Melanin production by rhizobia-nodulating common bean has been described before (Cubo et al. 1997; Andrade et al. 2002); the polymer has been suggested by Geng et al. (2010) as a possible “DNA-sensing” checkpoint that protects the cell from propagation until the DNA damage is repaired prior to duplication, a feature that would be very important under tropical stress conditions. Interestingly, eight out of 14 melanin producers observed in our study (IPR-*Pv* 509, 580, 589, 598, 652, 2231, 2234, 2248) were isolated from common bean seeds under osmotic-stress conditions.

Both BOX-PCR and the RFLP-PCR of the 16S rRNA have been effectively used to determine rhizobial diversity (Laguette et al. 1994; Kaschuk et al. 2006; Grange and Hungria 2004; Binde et al. 2009) and in our study revealed high diversity among the strains. Though valuable, BOX-PCR and RFLP-PCR of the 16S rRNA cannot determine the precise phylogenetic or taxonomic positions of the strains, therefore, sequencing analysis of the 16S rRNA of selected strains was performed.

The sequencing analysis of 17 IPR-*Pv* strains indicated genera in addition to the traditional *Rhizobium* species. *Herbaspirillum lusitanum* (Valverde et al. 2003) has been reported as a symbiont of common bean, and, in our study, strains belonging to this genus were identified. *Burkholderia* and *Enterobacter* have been described as bacteria with

potential for both biological N₂ fixation and plant-growth promotion (James 2000; Dôbereiner 1992; Baldani et al. 1986); however, this is the first report of isolation of these genera from common-bean nodules. Strain IPR-*Pv* 515 was identified as *Leifsonia xyli*, a species reported to cause ratoon stunting of sugarcane (*Saccharum* spp.) (Gagliardi and Camargo 2009).

The identification of eight strains belonging to *Stenotrophomonas* in symbiosis with common bean was surprising. This genus has been found to be an endophyte of sugar cane and wheat (*Triticum aestivum* L.) and was related to a better growth of sunflowers under greenhouse conditions (Fages and Arsac 1991). It was also described as a growth promoter of maize, producing indole acetic acid in the presence of tryptophan and antifungal metabolites to several soil-borne pathogens (Mehnaz et al. 2010). *Stenotrophomonas maltophilia* is found in a broad range of environments and is usually referred as an agent of nosocomial infections, representing an opportunistic pathogen of humans. Isolates of *S. maltophilia* display intrinsic resistance to many commonly prescribed antimicrobials, particularly β -lactams and aminoglycosides and can develop broad-spectrum resistance to several drugs that have been used to treat infections (Denton and Kerr 1998). The species is also found as a plant-growth-promoting bacterium in the rhizosphere of several plant species (Hauben et al. 1999). The ability of *Stenotrophomonas* to fix atmospheric N₂ has been suggested by the acetylene reduction

assay and by the detection of *nifH* gene sequences (Reinhardt et al. 2008; Teixeira et al. 2007). However, the strains isolated in our study showed low similarity (less than 90%) to other *Stenotrophomonas* from the GenBank database and, in the phylogenetic tree, were clustered in a different group, therefore they might represent a new species. Noteworthy were the high values of percent ureide-N achieved with these strains when in symbiosis with common bean, closer to or greater than those with the SEMIAs used as commercial inoculants in Brazil.

In conclusion, remarkably high efficiency in N₂ fixation and broad diversity were found among elite isolates from common bean in our study. The strains compose an interesting collection with prospects for biotechnological potential and probable identification of new species.

Acknowledgments The first author thanks Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the PhD scholarship. The authors are grateful to Walter M. Kranz for help with the soil sampling. Authors also thank Maria Elisabeth Vasconcellos (IAPAR) for help with the multivariate analyses and L.F.A. Fregonesi to organize the map, to Mauro S Parra (IAPAR) for helping with the greenhouse experiment, and Dr. Allan R. J. Eaglesham for suggestions on the manuscript. The research was partially supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)/MCT/MAPA (577933/2008) and CNPq-Repensa (562008/2010-1). M. Hungria also acknowledges a research fellowship from CNPq (300547/2010-2).

References

- Aguilar OM, López MV, Riccillo PM, González RA, Pagano M, Grasso DH, Pühler A, Favelukes G (1998) Prevalence of the *Rhizobium* *elli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Appl Environ Microbiol* 64:2524–3520
- Andrade DS, Hamakawa PJ (1994) Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola EMBRAPA-SPI*:63–94
- Andrade DS, Murphy PJ, Giller KE (2002) The diversity of *Phaseolus*-nodulation rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Appl Environ Microbiol* 68(8):4025–4034
- Baldani JJ, Baldani VLD, Seldin L, Döbereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov.: a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 36:86–93
- Binde DR, Menna P, Bangel EV, Barcellos FG, Hungria M (2009) rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:897–908
- Bremner J, Keeney D (1966) Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Anal Chem Acta* 32:482–485
- Brockwell J, Hely FW, Neal-Smith CA (1966) Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. *Austr J Exp Agric Anim Husband* 6:365–370
- Caballero-Mellado J, Martínez-Romero E (1999) Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis* 26:111–121
- Cubo T, Romero F, Vinardell JM, Ruiz-Sainz JE (1997) Expression of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *mElA* gene in other rhizobia does not require the presence of the *nifA* gene. *Aust J Plant Physiol* 24:195–203
- Denton M, Kerr KG (1998) Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 11:57–80
- Döbereiner J (1992) History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis* 13:1–13
- Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 8:186–194
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8:175–185
- Fages J, Arsac JF (1991) Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Soil* 137:87–90
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Gagliardi PR, Camargo LEA (2009) Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. *Cienc Rural* 39:1211–1214
- Geng J, Yuan P, Shao C, Yu S-B, Zhou BZ, Chen X-D (2010) Bacterial melanin interacts with double-stranded DNA with high affinity and may inhibit cell metabolism in vivo. *Arch Microbiol* 192:321–329
- Giongo A, Passaglia LMP, Freire JRJ, de Sá ELS (2007) Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Biol Fert Soils* 43:593–598
- Gordon D, Abajian C, Green P (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 8:195–202
- Graham PH (1981) Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*: a review. *Field Crops Res* 4:93–112
- Grange L, Hungria M (2004) Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biol Biochem* 36:1389–1398
- Grange L, Hungria M, Graham PH, Martínez-Romero E (2007) New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. *Soil Biol Biochem* 39(4):867–876
- Hauben L, Vauterin L, Moore ERB, Hoste B, Swings J (1999) Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int J Syst Bacteriol* 49:1749–1760
- Hedges SB (1992) The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap *p*-value in phylogenetic studies. *Mol Biol Evol* 9:366–369
- Herridge DF, Peoples MB (1990) Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by N methods. *Plant Physiol* 93:495–503
- Herridge DF, Bergersen FJ, Peoples MB (1990) Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural N abundance methods. *Plant Physiol* 93:708–716
- Hungria M, Vargas MAT (2000) Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Res* 65:151–164
- Hungria M, Andrade DS, Chueire LMDO, Probanza A, Gutierrez-Mañero FJ, Megias M (2000) Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem* 32(11–12):1515–1528
- Hungria M, Campo RJ, Mendes IC (2003) Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol Fert Soils* 39(2):88–93