



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

---

**JUSCÉLIO DONIZETE CARDOSO**

**CARACTERIZAÇÃO INTER E INTRA-ESPECÍFICA DE 45  
ESTIRPES ELITE DE RIZÓBIOS MICROSSIMBIONTES DO  
FEIJOEIRO BASEADA EM ANÁLISE POLIFÁSICA**

---

Londrina  
2009

**JUSCÉLIO DONIZETE CARDOSO**

**CARACTERIZAÇÃO INTER E INTRA-ESPECÍFICA DE 45  
ESTIRPES ELITE DE RIZÓBIOS MICROSSIMBIONTES DO  
FEIJOEIRO BASEADA EM ANÁLISE POLIFÁSICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria.

Londrina  
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C268c Cardoso, Juscélio Donizete.

Caracterização inter e intra-específica de 45 estirpes elite de rizóbios  
microsymbiontes do feijoeiro baseada em análise polifásica / Juscélio  
Donizete Cardoso. – Londrina, 2009.  
90 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Nitrogênio – Fixação – Teses. 2. Microorganismos fixadores de  
nitrogênio – Teses. 3. Feijão – Teses. I. Hungria, Mariangela. II. Univer-  
sidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 631.461.5

**JUSCÉLIO DONIZETE CARDOSO**

**CARACTERIZAÇÃO INTER E INTRA-ESPECÍFICA DE 45  
ESTIRPES ELITE DE RIZÓBIOS MICROSSIMBIONTES DO  
FEIJOEIRO BASEADA EM ANÁLISE POLIFÁSICA**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Mariangela Hungria  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -  
EMBRAPA-CNPSO

---

Profa. Dra. Diva Souza Andrade  
Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR

---

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - CCE-UEL

Londrina, 17 de fevereiro de 2009.

**aos meus pais pela coragem, ousadia para  
tornar o sonho em realidade e apoio irrestrito  
em todos os momentos de minha vida.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Mariangela Hungria, pela orientação, pelas sugestões, pela auxílio na elaboração deste trabalho e pela paciência.

À Dra. Diva Souza Andrade, pela amizade, paciência, ensinamento e formação acadêmica. Muito obrigado!!!!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade.

Ao Instituto Agronômico do Paraná, IAPAR, pela estrutura oferecida.

Aos professores e colegas de Curso, pois juntos trilhamos uma etapa importante de nossas vidas.

Aos técnicos, Maria A. de Matos, Oswaldo Machineschi e Orazilia França Dorigo, pela experiência e sempre dispostos a ajudar.

A todos os estagiários e amigos do laboratório de microbiologia, pelo apoio, tempo que me aturaram, pelas brincadeiras que me alegraram. Adoro vocês, sentirei muitas saudades.

Aos meus pais, Célio Ferreira Cardoso e Nilza Maria Dias Cardoso, pelo exemplo de vida e de caráter, pelas orações e noites sem dormir por se preocupar comigo. Devo a vocês, tudo que consegui até hoje e por tudo que ainda conseguirei nesta vida.

Com carinho, à Juliane Alves, pela paciência, compreensão nas horas ausente e por sua dedicação em todos os momentos.

A DEUS por mais essa conquista. A Ele dedico não só o meu trabalho, mas, minha vida inteira.

E finalmente, agradeço a todos que me ajudaram direto ou indiretamente para o desenvolvimento deste projeto. Um MUITO OBRIGADO a todos vocês!

**“Fácil é ditar regras e,  
Difícil é segui-las...”**

*Carlos Drummond de Andrade*

Cardoso, Juscélio Donizete. **Caracterização inter e intra-específica de 45 estirpes elite de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro baseada em análise polifásica.** 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

Diversas espécies de bactérias do solo do gênero *Rhizobium* em simbiose com o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L), apresentam a capacidade de formar nódulos efetivos e com isso fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico (FBN) contribuindo para a redução no uso de fertilizantes nitrogenados nessa cultura. No Brasil, programas de pesquisa para seleção de estirpes de rizóbios têm buscado a eficácia e estabilidade das características da FBN. Porém, antes de uma avaliação da eficácia dessas bactérias em experimentos de campo, uma caracterização inter e intra específica é quase um exigência. Neste sentido, o estudo foi conduzido com o objetivo de realizar a caracterização de estirpes elite utilizando uma abordagem polifásica com base nas análises morfo-fisiológicas e genéticas. Nesse estudo, foram utilizadas, 45 estirpes elite de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro, provenientes da Coleção de Microrganismos de Interesse do Agronegócio do Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Agrônomo do Paraná e três estirpes de *Rhizobium tropici* tipo B SEMIAs 4077, 4080 e 4088 (CIAT 899, PRF 81, H 12) autorizadas pelo MAPA para a produção de inoculantes para a cultura do feijoeiro, no Brasil. Os dados de morfologia de colônia, produção de ácido e melanina em meios de culturas específicos foram transformados em matriz binária e o agrupamento da dissimilaridade apresentado com base nas diferenças estimadas pela distância euclidiana. Através desse agrupamento, as estirpes foram distribuídas em dois grandes grupos, sendo que, o grupo I foi formado por 73% das quais três estirpes IPR-Pv tiveram 100% de similaridade com as estirpes de *Rhizobium tropici* (CIAT 899, PRF 81 e H 12). Na análise molecular, também, foram utilizadas as estirpes de *R. tropici* tipo A (CFN 299); *R. leguminosarium* bv *phaseoli* (ATCC10004); *R. etli* (CFN 42); *R. giardini* (H 152); *R. galicum* (R602sp). As análises de agrupamento dos produtos da amplificação com primers do RFLP-PCR-16S para análise inter específica e do REP, BOX A1R-PCR para uma caracterização intra específica das estirpes foram realizadas usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard. Pela técnica do PCR-RFLP do 16S rDNA foi observado um grupo contendo 34 estirpes IPR-Pv juntamente com as oito do gênero *Rhizobium*, enquanto a IPR-Pv 809 ficou isolada com baixa similaridade (3%). Através da análise do dendrograma com perfis de DNA obtidos por PCR-BOX, todas as estirpes analisadas apresentaram perfil distinto, com exceção de cinco pares de IPR-Pv que apresentaram 100% de similaridade. O agrupamento do PCR-REP com 70% de similaridade foi observado à formação de 20 perfis distintos e dentro desses ocorreram cinco subgrupos com 100% de similaridade. Através da análise polifásica verifica-se que essas 45 IPR-Pv, embora pré selecionadas para eficácia simbiótica, apresentam alta diversidade feno-genotípica. Pelas análises moleculares verifica-se que o BOX-PCR é discriminatório de estirpe caracterizando cada uma, enquanto a do RFLP-PCR 16S RNAr dentro do gênero agrupa espécies.

**Palavras-chave:** BOX A1R-PCR. Fixação biológica de nitrogênio. Morfo-fisiológica. REP. PCR-RFLP-16S. *Phaseolus vulgaris*.

Cardoso, Juscélio Donizete. **Characterization inter e intra specie of 45 elite strains of rhizobia microssimbionte of common bean.** 2009. 78p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## ABSTRACT

Several soil bacteria that belong to genera *Rhizobium* when in symbiosis with common bean (*Phaseolus vulgaris* L) plants, present the ability to form effective nodule and to reduce nitrogen fertilizers by contribution by biological nitrogen fixation (BNF). In Brazil, research programs seeking for selection of rhizobial strains with efficiency and stability in higher BNF rates has been implemented. However, there is a need for a polyphasic characterization these strains based on morpho-physiological and molecular analysis before field evaluations on BNF. Thus, this study was carried out with the aim to characterize elite strains by using a polyphasic approach based on phenotypic and genotypic traits. Forty-five rhizobial elite strains from Coleção de Microrganismos de Interesse do Agronegócio do Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Agrônômico do Paraná, *Rhizobium tropici* IIB strains SEMIAs 4077, 4080 e 4088 (CIAT 899, PRF 81, H 12) authorized by MAPA for common bean crop in Brazil. Morpho-physiological data as colony characteristics, acid and melanin production on agar media were transformed to binary matrices and a cluster analysis based on Euclidean distance were done. By using the cluster analysis the strains formed two groups, the group I was comprised for 73% where three elite strains (IPR Pv) showed 100% of similarity with the inoculant authorized strains of *Rhizobium tropici* (CIAT 899, PRF 81 e H 12). For molecular analysis were used the same 45 elite, the SEMIAs and the type strains of *R. tropici* IIA (CFN 299); *R. leguminosarium* bv *phaseoli* (ATCC10004); *R. etli* (CF N42); *R. giardini* (H152); *R. galicum* (R602sp). The cluster analysis based on RFLP-PCR-16S, REP, BOX A1R-PCR polymorphisms were done by using the algorithm unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) and coefficient of Jaccard (j). By using PCR-RFLP of 16S rDNA technique the cluster showed one group contained the 34 strains analysed together with the type strains that belong to genera *Rhizobium* while the second had only the strain IPR-Pv 809. All strains characterized by PCR-BOX analysis presented distinct profile, except the five pairs of IPR-Pv, which showed 100% of similarity, probably the strains. The PCR-REP cluster analyses with 70% de similarity was observed 20 distinct profiles and within these groups occur five subgroups with 100% of similarity. It was observe that there is high pheno-genotypic diversity within these 45 IPR-Pv strains although they were originating from a subpopulation selected for symbiotic efficiency. The BOX-PCR analysis is a sensible tool to characterize and to discriminate strain, while RFLP-PCR 16S rDNA is an analysis that allows forming groups based on genera and specie.

**Keywords:** Box. Biological nitrogen fixation. Morpho-physiological. REP. PCR-RFLP. *Phaseolus vulgaris*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Representação gráfica do agrupamento das estirpes elite de rizóbio-*Phaseolus* com base na distancia Euclidiana em função de 12 características morfo-fisiológicas (tamanho, forma e produção de goma de colônias bacterianas, produção de melanina, alteração do pH do meio avaliada em meio de cultura específico) .....31
- Figura 2** – Dendrograma genético das estirpes elite de rizóbio, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela técnica de RFLP-PCR da região 16S RNAr, com as enzimas de restrição *HaeIII*, *MspI* e *HinfI*. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J) .....34
- Figura 3** – Foto de um gel mostrando alguns exemplos de perfis de BOX-PCR obtidos da amplificação do DNA de algumas das estirpes elite de rizóbio-*Phaseolus* estudadas.....36
- Figura 4** – Dendrograma genético construído a partir da análises dos produtos amplificado com o oligonucleotídeos denominado BOX-PCR de 43 estirpes elite isoladas de feijoeiro. A construção foi com base no uso do algoritmo UPGMA e do coeficiente de Jaccard (J) .....37
- Figura 5** – Dendrograma genético construído a partir da análises dos produtos amplificado com o oligonucleotídeos denominado REP-PCR de 25 estirpes elite isoladas de feijoeiro. A construção foi com base no uso do algoritmo UPGMA e do coeficiente de Jaccard (J) .....38
- Figura 6** – Foto mostrando um exemplo do perfil de plasmídeos de algumas das estirpes elite IPR-*Pv* de rizóbio-*Phaseolus* (a e b) .....40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**%** – porcentagem

**µL** – microlitro

**ANOVA** – análise de variância

**C** – citosina

**CIAT** – Centro Internacional de Agricultura Tropical

**cm** - centímetro

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

**dNTPs** –

**EDTA** – ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELM** – extrato-de-levedura e manitol

**ELMA** – extrato-de-levedura manitol e ágar

**FAO** – Food and Agriculture Organization of the United Nations

**FBN** – Fixação Biológica de Nitrogênio

**Fe** – ferro

**g** – grama

**G** – guanina

**h** – horas

**ha<sup>-1</sup>** – por hectare

**IPR-Pv** – Instituto de Pesquisa Paraná- *Phaseolus vulgaris*

**J** – Jaccardulgaris

**kb** – kilo base

**kg** – kilograma

**L<sup>-1</sup>** – por litro

**LB** – Luria-Bertani

**M** – molar

**MAPA** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**Mg** – magnésio

**mg** – miligrama

**min** – minutos

**mL** – mililitro

**mL<sup>-1</sup>** – por mililitro

**mm** – milímetro

**mM** – milimolar

**Mo** – molibdênio

**mol** – Massa molar

**N** – nitrogênio

**N** – normalidade

**ng** – nanograma

**nm** – nanômetro

**NTSYS** – (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System)

**°C** – grau Celsius

**pb** – pares de bases

**PCR** – (Polymerase Chain Reaction) Reação da polimerase em cadeia

**PRF** – Paraná feijoeiro

**REP** – Repetitive Extragenic Palindromic

**RFLP** – (Restriction Fragment Length Polymorphism)

**rpm** – rotações por minuto

**RNA<sub>r</sub>** – ácido ribonucléico ribossomal

**S** – segundos

**SAS** – Statistic Analysis Software

**SDS** – (Sodium Dodecyl Sulphate) lauril sulfato de sódio

**SEMIA** – Seção de Microbiologia Agrícola

**T** – timina

**TYA** – Triptona yeast agar

**U** – unidade

**UPGMA** – unweighted pair group method with arithmetic mean

**V** – voltagem

**YMA** – Yeast mannitol agar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO .....	16
2.2 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO PELO FEIJOEIRO .....	18
2.3 TAXONOMIA DO RIZÓBIO .....	19
<b>3 OBJETIVO</b> .....	21
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 ORIGEM E PRESERVAÇÃO DAS ESTIRPES DE RIZÓBIO .....	22
4.2 ESTIRPES REFERÊNCIA .....	23
4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DAS ESTIRPES DE RIZÓBIO .....	24
4.4 AGRUPAMENTO DAS ESTIRPES COM BASE EM DADOS MORFO-FISIOLÓGICOS .....	25
4.5 ANÁLISES MOLECULARES .....	25
4.5.1 Extração de DNA Genômico Total .....	25
4.5.2 Amplificação do Gene 16S rDNA pela Reação de PCR e Análise Através Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) .....	26
4.5.3 Amplificação do PCR com Oligonucleotídeo Específico BOX e REP .....	27
4.5.4 Agrupamento das Estirpes .....	28
4.6 PERFIL DE PLASMÍDEO .....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
5.1 ANÁLISE MORFO-FISIOLÓGICA .....	30
5.2 ANÁLISES MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIO .....	32
5.2.1 Caracterização Inter Específica com Base do RLFP-PCR do 16S RNAr .....	32
5.2.2 Caracterização Intra Específica pela Análise do PCR Amplificado com Oligonucleotídeo BOX e REP .....	35

5.3 Diversidade Simbiótica Intra Especifica pela Análise do Perfil de Plasmídeos .....	39
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
<b>ANEXOS</b> .....	48
ANEXO A – Short Communication: Relationship Between Total Nodulation and Nodulation at the Root Crown of Peanut, Soybean and Common Bean Plants .....	49
ANEXO B – Guia para Autores da Revista “Soil Biology & Biochemistry” .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui umas das principais fontes de proteína da dieta do brasileiro, sendo tradicionalmente cultivado e consumido por todas as classes de renda do País. O feijoeiro comum é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus* (COSTA; VIEIRA, 2000). O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores dessa leguminosa. A produtividade é considerada baixa, com, media nacional de 917 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2007). Um fator limitante à produtividade do feijoeiro é a baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo fósforo (P) e nitrogênio (N), nos solos agrícolas.

O processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um componente importante no agrossistema para alcançar a sustentabilidade produtiva, tanto que os inoculantes rizobianos têm sido aplicados freqüentemente, como biofertilizantes. Estima-se que a fixação não biológica contribua com cerca de 10% da entrada anual de N na terra. A produção industrial contribui com 25% do aporte de N, e o processo de fixação biológica contribui com 65% da fixação anual de N, sendo o maior provedor desse nutriente para a manutenção da vida na terra. Através da FBN, as leguminosas contribuem com cerca de 35 milhões de toneladas de N fixado por ano (HUNGRIA; CAMPO et al., 2001).

No Brasil, três estirpes de rizóbio 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), que foram avaliadas quanto à eficiência simbiótica em experimentos de campo em diferentes agrossistemas (RELARE, 2006). Essas estirpes foram caracterizadas geneticamente e estão classificadas como *Rhizobium tropici* (MARTINEZ-ROMERO; SEGOVIA et al., 1991; HUNGRIA; ANDRADE et al., 2000).

Dentro da diversidade de estirpes de rizóbio para a cultura do feijoeiro, isoladas de solos brasileiros, ainda é possível identificar estirpes com grande capacidade de FBN, competitividade e maior estabilidade genética. Entretanto, essa estirpes de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro, além de avaliação da eficiência na

fixação biológica do  $N_2$ , necessitam de uma análise polifásica com base nas características de colônia, fisiológicas e genéticas, que permita a sua caracterização inter e intra específica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijoeiro é largamente consumido e participa da alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas na América Latina, no leste e sul da África. É originário do continente americano, nas regiões entre México e a Guatemala e na zona dos Andes (ZIMMERMANN; TEIXEIRA, 1996). Essa leguminosa apresenta de 20 a 33% de proteína nos grãos e é considerado um alimento perfeito, pois apresenta aproximadamente o dobro do teor protéico 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; VIEIRA, 2000). A qualidade de proteínas também pode ser alterada de acordo com as cultivares e a fertilidade do solo, por exemplo, em função da inoculação das sementes (CARDOSO; MATOS et al., 2006).

O feijoeiro comum é a espécie mais cultivada entre as do gênero *Phaseolus*. Considerando todos os gêneros e espécies de feijão englobadas nas estatísticas da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, 2006), a produção mundial de feijão situou-se em torno de 18,7 milhões de toneladas, ocupando uma área de 26,9 milhões de hectares (ha). No Brasil, a área plantada na safra de 2006/2007 ocupou cerca de 4,2 milhões de ha e com produção de 3,4 milhões de toneladas, ou seja, cerca de 16% da produção mundial. O Paraná destaca-se como o principal produtor nacional de feijão, possui uma área de 563 mil hectares com esta cultura e sua produção em torno de 800 mil toneladas (CONAB, 2007). A produtividade nacional da cultura, porém, é considerada baixa, em média 917 kg ha<sup>-1</sup>. Além disso, em certas regiões os rendimentos são muito inferiores à média nacional (CONAB, 2007). Em condições experimentais, a produtividade pode alcançar 5.000 kg ha<sup>-1</sup> (EMBRAPA, 2005) e, de acordo com trabalhos conduzidos por Hungria; Andrade et al. (2000) foram

obtidas produções de até 4.000 kg ha<sup>-1</sup> com a inoculação de estirpes de rizóbios eficientes para o feijoeiro.

Grande parte dos solos cultivados com feijão no Brasil apresenta baixos valores de pH, elevados teores de alumínio trocável, baixa saturação em bases e teores baixos de fósforo (ANDRADE; FILHO et al., 2000; ANDRADE; MURPHY et al., 2002). Além disso, o baixo nível de tecnologia 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 (P), representam um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos no Brasil (ARAUJO, 1994).

Os teores de N nos solos brasileiros, de um modo geral, não são elevados e, com a intensificação da agricultura, as exigências nutricionais de N são cada vez maiores. Conseqüentemente, se faz necessária a reposição do N nestes solos. Para a síntese química de fertilizantes nitrogenados existe um custo elevado, resultante, principalmente, da necessidade de gastos com petróleo, que não é uma energia renovável. Calcula-se que, para a síntese de uma tonelada de amônia, sejam necessários seis barris de petróleo. Práticas agrícolas alternativas para diminuir esses custos precisam ser procuradas, principalmente para o Brasil, que importa fertilizantes nitrogenados para satisfazer à demanda interna. Nesse contexto, o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) assume grande importância, porque além de ser uma tecnologia de baixo custo, representa uma alternativa para aumentar os rendimentos nacionais e, também, contribui para a manutenção da fertilidade do solo e para a preservação ambiental de rios, lagos e lençóis freáticos pela diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA; STACEY, 1997).

## 2.2 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO PELO FEIJOEIRO

Bactérias 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 nitrogênio da atmosfera, o que pode contribuir para a redução no uso de fertilizantes nitrogenados.

Entre os sistemas biológicos envolvendo planta e microrganismos, a simbiose leguminosas-rizóbio 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 nutrientes às plantas, são de grande relevância (FRANCO; CASSINI et al., 2002).

As principais formas de disponibilização de N para o crescimento das plantas são: (i) N do solo, proveniente da decomposição da matéria orgânica e das rochas, bastante limitado, podendo ser esgotado rapidamente após alguns cultivos; (ii) N fornecido pelos fertilizantes através da conversão do nitrogênio gasoso atmosférico ( $N_2$ ) em amônia, constitui a forma de assimilação mais fácil e com menor custo energético pelas plantas, porém, possui um elevado custo econômico e ambiental; (iii) N fornecido pela fixação não-biológica, resultante de processos naturais onde o  $N_2$  atmosférico é convertido em nitrato, principalmente através de descargas elétricas, combustão e vulcanismo; e (iv) N resultante do processo de FBN, representando a principal via de incorporação do N à biosfera (HUNGRIA; CAMPO et al., 2001).

A FBN é caracterizada pela utilização do  $N_2$  como fonte de N para o metabolismo de um grupo seletivo de seres vivos, que compreende algumas espécies de microrganismos procarióticos. Esses microrganismos possuem o complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformar o  $N_2$  em amônia que, subsequentemente será assimilada em aminoácidos e proteínas (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

A FBN é mediada por uma parcela dos procarióticos que, apesar de relativamente pequena, apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Diazotróficos podem ser encontrados entre os aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos e na maioria dos grupos filogenéticos representativos de “Bacteria” e de “Archae”. Esses microorganismos 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 catalisa a conversão de N<sub>2</sub> atmosférico à amônia, à custa de grande quantidade de energia (VARGAS; HUNGRIA, 1997). Estima-se que os fertilizantes nitrogenados sejam responsáveis por uma grande parte das emissões globais de gases de efeito estufa, bem como pela poluição de lagos e rios (GRAHAM; VANCE, 2003).

Mundialmente, estima-se que 44 a 66 milhões de toneladas de N<sub>2</sub> são fixados por ano. Na agricultura sustentável, a FBN é um importante componente, com o uso da tecnologia da inoculação com microrganismos fixadores do N<sub>2</sub> (GRAHAM; VANCE, 2003). Estima-se que a fixação não biológica contribua com cerca de 10% da entrada anual de N na terra, enquanto que a produção industrial contribui com 25%, e o FBN contribui com 65% da fixação anual de N, sendo o maior provedor desse nutriente para a manutenção da vida na terra (HUNGRIA; CAMPO et al., 2001).

### 2.3 TAXONOMIA DO RIZÓBIO

O primeiro relato do gênero *Rhizobium* foi descrito por Kirchner, 1886 (FRED; BALDWIN et al., 1932). Naquela época, o agrupamento do rizóbios foi baseado em sua especificidade com o hospedeiro, ou seja, as bactérias que nodulam o feijoeiro foram classificadas como pertencentes à espécie *Rhizobium phaseoli* (FRED; BALDWIN et al., 1932). Após 50 anos, levando em consideração características fisiológicas, bioquímicas e genéticas, essas bactérias foram reclassificadas na espécie *Rhizobium leguminosaru* *bv phaseoli* (JORDAN, 1984). E ainda, Jordan, separou os rizóbios que tinha crescimento lento e rápido em meio de cultura específico, resultando

em dois gêneros: *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, respectivamente. Com o estudo de outros isolados e o avanço nas técnicas de biologia molecular, foram constatadas que as bactérias que nodulavam o feijoeiro apresentavam, claramente, características fisiológicas e genéticas distintas levando à definição de novas espécies e biovares (MARTÍNEZ; PARDO et al., 1985; QUINTO; FLORES et al., 1985; BROM; MARTÍNEZ et al., 1988).

Atualmente, estão descritas seis espécies de *Rhizobium* capaz de nodular e fixar nitrogênio em feijoeiros *R. leguminosarium* bv *phaseoli* (JORDAN, 1984), *R. tropici* tipo IIA e tipo IIB (MARTINEZ-ROMERO, 1991), *R. etli* (SEGOVIA; YOUNG et al., 1993), *R. gallicum* bv. *gallicum* e *R. giardinii* bv. *giardini* (AMARGER; MACHERET et al., 1997) e *R. lusitanum* sp. nov. (VALVERDE; IGUAL et al., 2006).

No Brasil, três estirpes de rizóbio 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), que foram avaliadas quanto à eficiência simbiótica em experimentos de campo em diferentes agrossistemas (RELARE, 2006). Essas estirpes foram caracterizadas geneticamente e estão classificadas como *Rhizobium tropici* (MARTINEZ-ROMERO; SEGOVIA et al., 1991; HUNGRIA; ANDRADE et al., 2000).

Existem, ainda, diversas estirpes sem posição taxonômica definida, podendo representar novas espécies, é e de interesse agrônomo selecionar bactérias de uma determinada espécie. No entanto, é fundamental estar atualizado com as novas correntes taxonômicas e atento para o fato de que, certamente, a cada ano, novos gêneros e espécies estão sendo descobertas e reclassificadas (BULL; GOODFELLOW, 1992).

### **3 OBJETIVO**

Utilizar uma abordagem polifásica das características morfo-fisiológicas e genéticas para caracterizar estirpes de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar 45 estirpes elite de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro com base nas características morfo-fisiológicas.

-Caracterizar geneticamente essas 45 estirpes de rizóbios, pelas análises de BOX-PCR, REP-PCR, RFLP-PCR do 16S RNAr e pelo perfil de plasmídeos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ORIGEM E PRESERVAÇÃO DAS ESTIRPES DE RIZÓBIO

Neste estudo foram utilizadas 45 estirpes elite da Coleção de Microrganismos de Interesse do Agronegócio do Laboratório de Microbiologia do Solo do IAPAR (Tabela 1). Essas estirpes foram previamente selecionadas de uma população de, aproximadamente, 1.500 isolados, com base na eficácia simbiótica (N total, massa seca da parte aérea e nodulação) quando inoculadas em feijoeiro em solução nutritiva (dados não mostrados).

Na coleção de culturas IPR-IAPAR, as estirpes foram preservadas por dois processos: criopreservação, com tubos criogênicos contendo culturas de bactérias e glicerol a 65% e mantidos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; e liofilização, com ampolas contendo culturas de bactérias que são congeladas secas a vácuo sendo, então, seladas e mantidas à temperatura ambiente. Para os diversos ensaios conduzidos neste estudo as bactérias foram recuperadas em placas de Petri contendo meio de cultura manitol extrato-de-levedura e ágar (VINCENT, 1970), repicadas para tubos com o mesmo meio e mantidas em temperatura de 4 a 6  $^{\circ}\text{C}$ .

As estirpes elite IPR-Pv (Coleção IAPAR) e as estirpes tipo e padrões (SEMIA, fornecidas pela FEPAGRO) foram recuperados em condições assépticas, a partir de culturas liofilizadas, pela quebra da ampola seguida da adição de 100  $\mu\text{L}$  de meio líquido de extrato-de-levedura e manitol (ELM) sobre as culturas, deixando por 20 min para permitir a reidratação. A seguir, transferiu-se a ressuspensão das colônias para meio de cultura sólido (ELMA) em placa de Petri. As estirpes criopreservadas e armazenadas em tubos criogênicos à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  foram retiradas e acondicionadas em bandeja com gelo, e em condições assépticas em fluxo laminar, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana de cada cultura foi transferida para placa de Petri contendo meio de cultura sólido (ELMA).

**Tabela 1** – Origem e codificação das estirpes utilizadas neste estudo

<b>Origem</b>	<b>Identificação (código Coleção IPRF)</b>	<b>Total de isolados</b>
Wenceslau Brás PR	263; 348; 445; 446; 453; 497; 506; 515; 517; 524; 3087	11
Londrina, PR	* 591; 598; 611; 615; 696; 889; 2230; 2604; 2608	9
Prado Ferreira, PR	195; 1045; 367	3
Palmital, PR	680	1
Centenário do Sul, PR	685	1
Cerro Azul, PR	1097	1
Pitanga, PR	1249; 1326; 1362	3
Rio Branco do Sul, PR	1252	1
Pato Branco, PR	1281	1
Cruz Machado, PR	3085	1
São Paulo, SP	* 583; 2231; 2234; 2248; 2303	5
Serrinha, MG	* 509; 580; 589; 593; 652; 689; 692; 809	8

\* estirpes isoladas de sementes

#### 4.2 ESTIRPES REFERÊNCIA

Para a caracterização morfo-fisiológica, foram utilizadas como comparação três estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIAs 4077, 4080 e 4088 (CIAT 899,

PRF 81, H 12 respectivamente) autorizadas pelo MAPA para a produção de inoculantes para a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil.

Na análise molecular, além das SEMIAs, foram utilizadas a estirpe representativa de *R. tropici* tipo A (CFN 299), de *R. leguminosarium* bv *phaseoli* (ATCC10004) e as estirpes tipo de *R. etli* (CFN 42); *R. giardini* (H152); *R. galicum* (R602sp).

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DAS ESTIRPES DE RIZÓBIO

As estirpes de rizóbio foram inoculadas em meio de cultura ELMA (VINCENT, 1970) com adição de 10 mL L<sup>-1</sup> 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 (verde), considerada neutro. Como controle comparativo nos testes morfo-fisiológicos foram utilizados tubos contendo o meio de azul de bromotimol sem inoculação e tubos inoculados com estirpes de *R. tropici* com as SEMIAs 4077, 4080 e 4088.

As estirpes foram repicadas em meio de cultura TYA, contendo 5,0 g de triptona; 3,0 de extrato de levedura; 1,3 g de cloreto de cálcio, 14 g de ágar e suplementado com 1,2 mg de L-tirosina e 40 µg de sulfato de cobre em 1000 mL de água destilada, como o pH ajustado para 6,8 (CUBO; ROMERO et al., 1997). Após crescimento por sete dias à 28 °C no escuro, as estirpes foram avaliadas conforme o seguinte procedimento: adicionou-se solução de SDS 10% (peso/volume) sobre as colônias, para quebrar 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 apresentarem pigmentação não produzem melanina, e as colônias que apresentaram coloração marrom ou preta produzem melanina.

As colônias das estirpes de rizóbios foram caracterizadas quanto ao tamanho, forma, elevação, bordos, estrutura, brilho, cor, aspecto e produção de goma

através de crescimento em placas contendo meio de cultura sólido, seguindo as metodologias descritas em ARAUJO (1994) e VINCENT (1970).

#### **4.4 AGRUPAMENTO DAS ESTIRPES COM BASE EM DADOS MORFO-FISIOLÓGICOS**

Para cada característica morfo-fisiológica das 45 estirpes de rizóbio (IPR-*Pv* (Coleção IAPAR) e das estirpes referência e tipo (CIAT 899, H 12 e PRF 81) foi atribuído valor 1 (presente) ou 0 (ausente). Com base nesses dados foi construída uma matriz binária dos dados originais com as características morfo-fisiológicas e suas variações. A análise de agrupamento de similaridade e as diferenças foram estimadas pela distância euclidiana com a opção UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean). As estirpes foram agrupadas e representadas graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 2.01, SLICE; KIM; WALKER, 1994).

#### **4.5 ANÁLISES MOLECULARES**

##### **4.5.1 Extração de DNA Genômico Total**

Após a incubação em meio de extrato-de-levedura e manitol sob agitação por 2 a 5 dias a 28 °C, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min, 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 proteinase K (20 mg mL<sup>-1</sup> de água, mantida a -18°C), 10 µL de lisozima (5 mg/mL de água, mantida a -18°C), 1 µL de RNase (10 mg mL<sup>-1</sup>) 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 por pipetação, 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 rpm 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 uma noite à -20 °C ou 15 min à -72 °C e depois centrifugadas a 12.000 rpm 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 Na<sub>2</sub>, 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% [ em tampão TBE 1X (10,8 mL de tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4,0 mL de EDTA, 0,5 M, pH 8,0)], durante 30 min a 90 V. A seguir, foi realizada a coloração com brometo de etídio (1 mg mL<sup>-1</sup> de estoque, 0,00005% de concentração final) 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.

#### **4.5.2 Amplificação do Gene 16S rDNA pela Reação de PCR e Análise Através Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**

Uma alíquota de DNA extraído de cada estirpe de rizóbios foi submetida à amplificação com os "primers" fD1 (5'-ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC3'), que codificam o 16S rDNA (WEISBURG; BARNS et al., 1991), uma região altamente conservada entre as eubactérias (LAGUERRE; MAVINGUI et al., 1996). Para a reação de PCR-16S foram

utilizados 36,3  $\mu\text{L}$  de água milli-Q estéril, 3  $\mu\text{L}$  de dNTPs (1,5 mM de solução para cada um dos quatro nucleotídeos), 5  $\mu\text{L}$  tampão 10X, 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 1,5  $\mu\text{L}$  de cada primer fD1 e rD1 ( $10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase ( $1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de DNA. As amplificações foram realizadas em termocicladores modelo MJ Research Inc. PTC-100<sup>TM</sup> 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 "primers" 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 e mantidas a 4 °C.

O procedimento da análise de RFLP foi realizado como descrito por (LAGUERRE; ALLARD et al. 1994). O produto da amplificação obtido com os "primers" 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') (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies). Para cada reação, foi preparada uma mistura contendo 6  $\mu\text{L}$  do produto do PCR; 1  $\mu\text{L}$  de tampão específico (10X) para cada enzima; 0,5  $\mu\text{L}$  de enzima ( $10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ) e 2,5  $\mu\text{L}$  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 100 V por 4 h. Foi aplicado 0,4  $\mu\text{L}$  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.

#### 4.5.3 Amplificação do PCR com Oligonucleotídeo Específico BOX e REP

A partir dos extratos de DNA total dos isolados, procedeu-se à amplificação de regiões repetitivas do DNA, utilizando os "primers" REP ("Repetitive Extragenic Palindromic") REP1R, (3'-CGGICTACIGCIGCIIII-5') e REP2-I, (5'-CGICTTA TCIGGCCTAC-3') (BRUIJN, 1992) e BOX -A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG -3') (VERSALOVIC; SCHNEIDER et al., 1994). Foram, então, utilizado 5  $\mu\text{L}$  de água (mili Q esterilizada); 6  $\mu\text{L}$  de DNTPs [ $1,5 \text{ mM}$  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 MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 1,5 µL de cada “primer” (50 pmol µL<sup>-1</sup>); 0,2 µL de Taq DNA polimerase ( 5 U µL<sup>-1</sup>) e 1 µL de DNA (50 ng), tendo um volume final de 18,9 µL. O programa utilizado para o PCR-REP consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 6 min; 35 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. O programa para o PCR-BOX consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 7 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 53 °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 foram utilizados 4 µL do padrão de peso molecular de 1 kb (plus DNA Ladder™-Gibco- Life Technologies). A eletroforese foi feita sob corrente elétrica de 100 V por 6 h. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados em transluminador com lâmpada ultravioleta.

#### **4.5.4 Agrupamento das Estirpes**

A análise do agrupamento foi realizada com os produtos do RFLP-PCR e com REP, BOX A1R-PCR com o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 4.6), usando o algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method, with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard (J) (SNEATH; SOKAL, 1973), com tolerância de 2% para o RFLP-PCR e 5% para o REP, BOX-PCR.

#### **4.6 PERFIL DE PLASMÍDEO**

A metodologia adotada para extração de plasmídeo foi baseada em Eckhardt (1978) com modificações. As estirpes de rizóbios foram cultivadas em meio

ELM agarizado por 72 h à 28 °C. As bactérias que cresceram no meio ELMA foram inoculadas nos tubos contendo 5 mL de meio TY (5 g de triptona; 3 g de extrato de levedura e 1,3 g de CaCl<sub>2</sub> em 1000 mL de H<sub>2</sub>O destilada) e mantidas em agitação por 48 h a 28 °C. A seguir, retiraram-se 20 µL da suspensão bacteriana, que foram inoculados nos tubos de ensaio contendo 10 mL de meio TY, esses foram mantidos estáticos por 20 h. As suspensões bacterianas foram centrifugadas durante 5 min a 5000 g, e o precipitado foi ressuspensão usando pipeta com 1 mL de TBE 1X gelado, centrifugado novamente e ressuspensão em uma mistura com o volume final de 27 µL, constituída de: 19 µL de Tris-ficoll (ficoll a 12,5% p/v em tris-HCl 0,025M pH 8,0); 4 µL de lisozima (5 mg.mL<sup>-1</sup>) de água, mantida no congelador); 2 µL de RNase (10 mg.mL<sup>-1</sup>) e 2 µL de TBE 1X gelado. As amostras sempre foram mantidas no gelo.

As amostras foram aplicadas em um gel de 20 cm x 10 cm a 0,5% de agarose. No preparo do gel, posterior ao pente utilizado, foi colocado um aparato de acrílico de 18 cm de comprimento x 5 cm de altura e 0,6 mm de espessura. Após a solidificação do gel, o aparato de acrílico foi retirado, o pente permaneceu no gel. Prepararam-se 4 mL de uma solução de agarose a 0,7%, com a agarose dissolvida foram acrescentados 2,3 mL de TBE 1X; 0,7 mL de SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) a 15% (o SDS foi dissolvido em TBE 1X) e 0,2 mL de corante para rizóbio. A solução foi adicionada ao espaço onde havia a barra de acrílico e, depois de solidificado, retirou-se o pente e as amostras foram adicionadas ao gel.

A corrida do gel foi a 25 V por 30 min e, a seguir, a voltagem foi aumentada para 125 V por 4 h. A cuba permaneceu dentro de um recipiente com circulação de água para evitar aumento de temperatura. O gel foi corado com brometo de etídio e as bandas visualizadas em transluminador com lâmpada de ultravioleta.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE MORFO-FISIOLOGICA

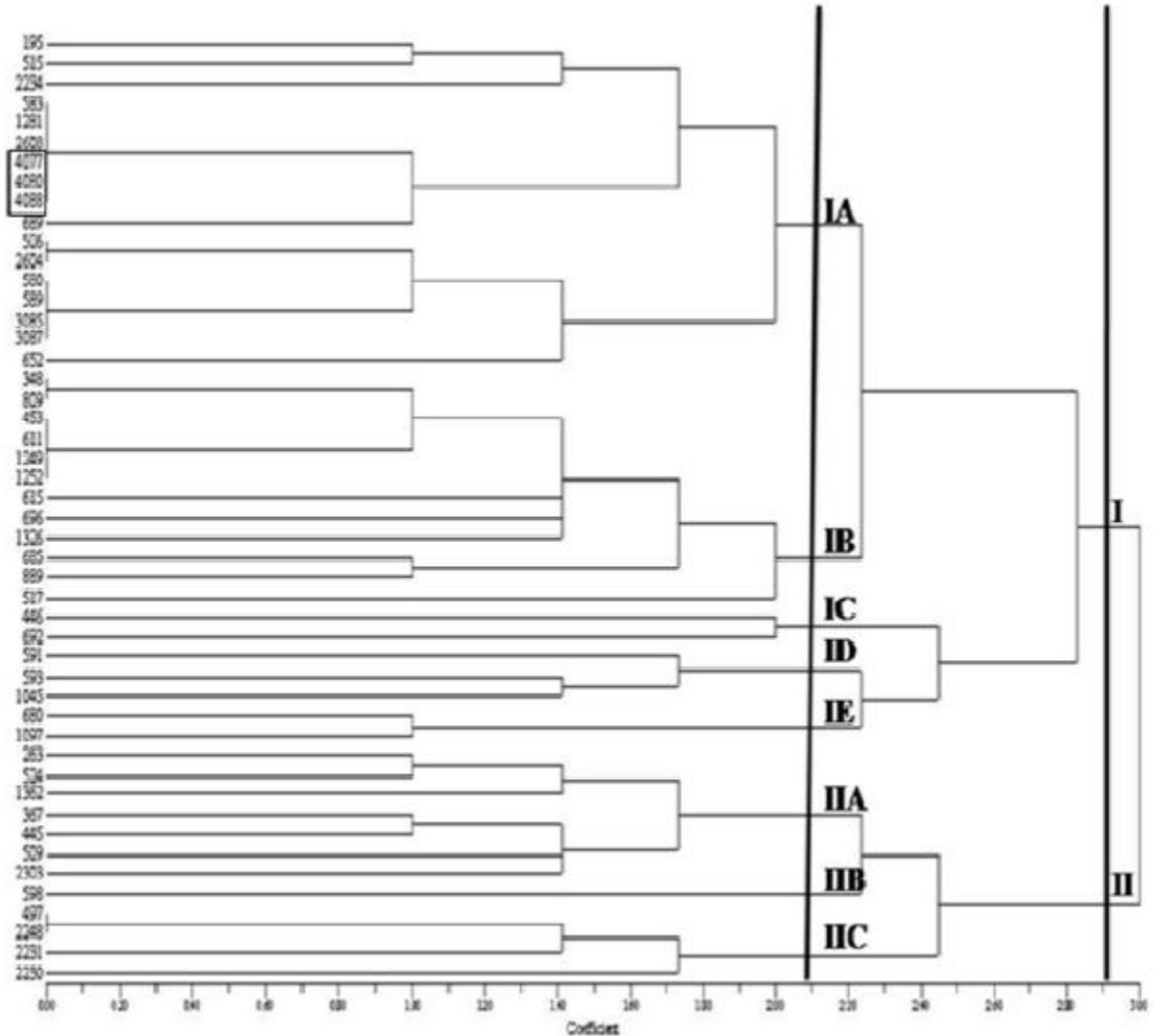
A caracterização fisiológica das estirpes, pelo teste da modificação do pH do meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono e corante azul de bromotimol, mostrou que, das 45 estirpes analisadas, 38 acidificaram o meio e sete alcalinizaram. O grupo maior, composto por 38 estirpes com capacidade de acidificar o meio de cultura, foi formado por isolados de sementes originadas de Minas Gerais (IPR-Pv 509, 580, 589, 593, 689, 692 e 809), de São Paulo (IPR-Pv 583, 2231, 2234, 2248 e 2303) e as outras 26 estirpes foram isoladas de solo de diversas regiões do Paraná.

A observação de que a maioria das estirpes possui a característica de acidificar o meio de cultura foi um resultado esperado, porque bactérias do gênero *Rhizobium* são conhecidas por possuírem essa capacidade (JORDAN, 1984). Trabalhando com uma população de 187 isolados de plantas de feijoeiro inoculadas com solos com diferentes graus de acidez, Andrade; Murphy et al. (2002) encontraram que 81% destas bactérias foram produtoras de ácido. Em um estudo de caracterização polifásica, Pinto; Hungria et al. (2007) também relataram que todas as 15 estirpes de *Rhizobium* de feijoeiro estudadas, provenientes de regiões distintas do Brasil, acidificaram o meio de cultura.

Em relação à capacidade de sintetizar melanina, com crescimento em placas contendo o meio TYA suplementado com L-tirosina e sulfato de cobre, das 45 estirpes analisadas somente 14 produziram melanina, representando 31% do total. A detecção da produção de melanina pelas estirpes de rizóbio foi descrita previamente por Cubo; Romero et al. (1997). Andrade, Murphy et al (2002), também, trabalhando com estirpes de rizóbios simbiossintetizantes do feijoeiro utilizaram dessa característica na análise de agrupamento.

Para cada característica fenotípica, das estirpes IPRF- estudadas e das recomendadas para produção de inoculantes, foram atribuídos valores de 1 ou 0 e suas

diferenças foram comparada pela distância Euclidiana. Os resultados são representados graficamente por um dendrograma (Figura 1).



**Figura 1** – Representação gráfica do agrupamento das estirpes elite de rizóbio-*Phaseolus* com base na distancia Euclidiana em função de 12 características morfo-fisiológicas (tamanho, forma e produção de goma de colônias bacterianas, produção de melanina, alteração do pH do meio avaliada em meio de cultura específico).

As estirpes elite de rizóbios de feijoeiro foram distribuídas em dois grandes grupos, sendo que, o grupo I foi formado por 73% das estirpes. Dentro do grupo I, utilizando um corte no coeficiente de 2,10, foi observada a formação de cinco

subgrupos (IA, IB, IC, ID, e IE). No grupo II, também, houve alta diversidade, mas agrupando um menor número de estirpes com apenas três subgrupos (IIA, IIB e IIC) como demonstrada (Fig. 2).

No subgrupo IA foram posicionada 14 estirpes e as três estirpes de referência, representando 31% do total analisado. Dentro desse subgrupo IA três distintos agrupamentos foram formados com 100% de similaridade. O primeiro desses agrupamentos incluiu a estirpe IPR-Pv 583, isolada de sementes comercializadas no estado de São Paulo e as IPR-Pv 1281 e 2608, isoladas de solo do município de Pato Branco e Londrina-Paraná, respectivamente, e as estirpes CIAT 899, PRF 81 e H 12 de *R. tropici*. O segundo agrupamento de 100% de similaridade foi com as estirpes IPR-Pv 580, 589, 3085 e 3087 e o terceiro com as estirpes IPR-Pv 506 e 2604. Das 12 estirpes do subgrupo IB, somente a estirpe IPR-Pv 809 foi isolada em Minas Gerais, sendo as demais oriundas do Paraná e dessas quatro com 100% de similaridade.

No grupo II, composto por 12 estirpes (27%), foram observados três subgrupos (IIA, IIB e IIC), sendo o subgrupo IIA, o maior, foi formado por sete estirpes seguido do subgrupo IIC com quatro estirpes, sendo a IPR-Pv 497 e 2248 com 100% de similaridade. A estirpe IPR-Pv 598 (IIB), isolada de sementes do mercado de Londrina, PR, não agrupou com nenhuma outra estirpe. A análise taxonômica numérica com base em testes morfo-fisiológicas tem sido uma ferramenta importante para caracterizar e agrupar estirpes de rizóbio (GRANGE; HUNGRIA, 2004; PINTO; HUNGRIA et al., 2007) e, na maioria das vezes apresenta relação com características das espécies descritas para o microsimbionte do feijoeiro (ANDRADE; MURPHY et al., 2002; KASCHUK; HUNGRIA et al., 2006 a, b).

## **5.2 ANÁLISES MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIO**

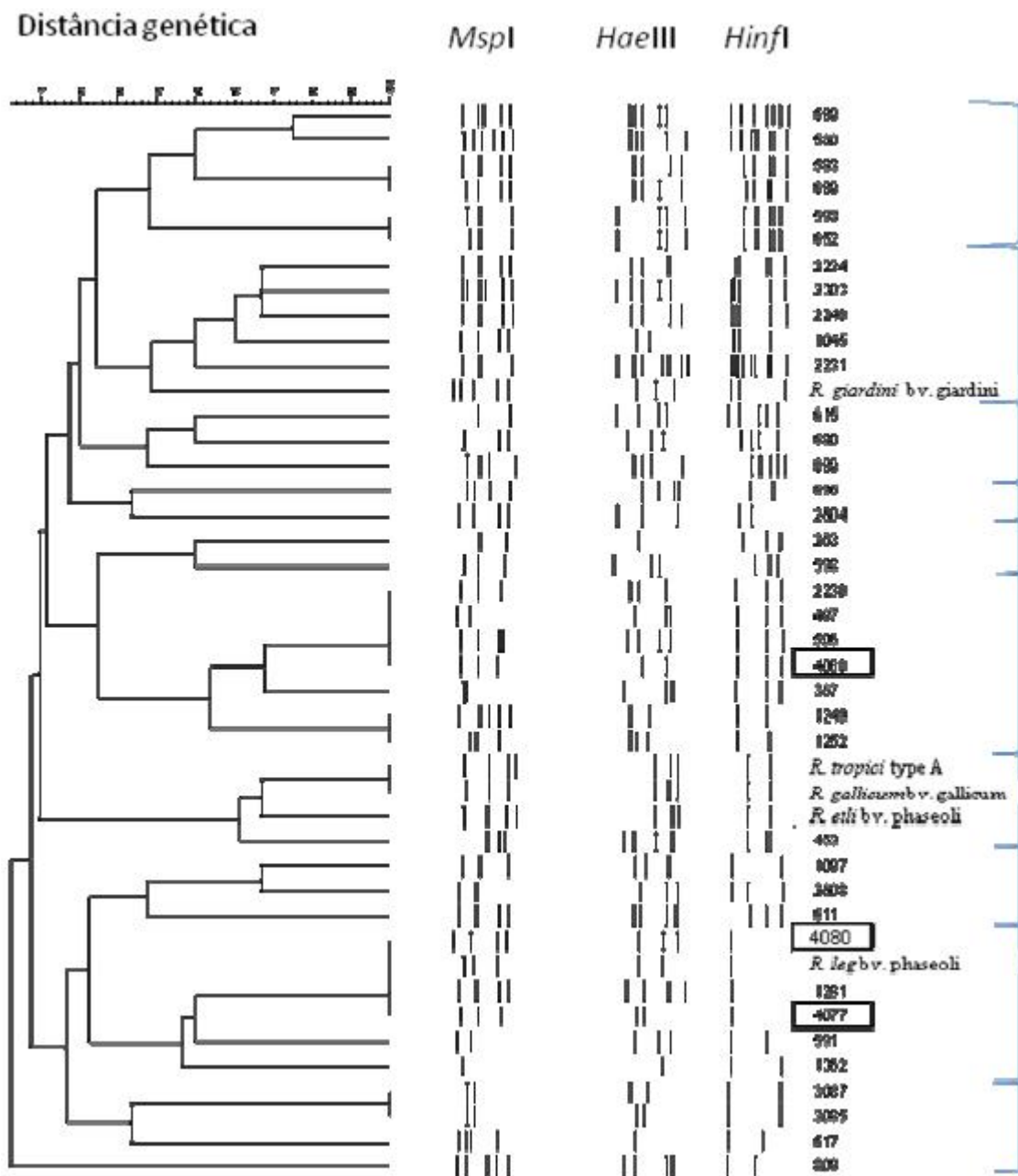
### **5.2.1 Caracterização Inter Específica com Base do RLFP-PCR do 16S RNAr**

Das 45 IPRF estudadas, não foi possível obter amplificação do DNA com os primer, fD1 e rD1, com dez delas. Desse modo, a caracterização foi realizada

com 35 estirpes elite e oito estirpes referência. Os produtos de PCR foram digeridos com três enzimas de restrição, *HaeIII*, *MspI* e *HinfI*, que fragmentaram o DNA em diferentes comprimentos, evidenciado o polimorfismo no comprimento dos fragmentos obtidos.

O resultado, do PCR-RFLP do 16S RNAr mostrou baixa similaridade final, de apenas, 3% entre as estirpes. Portanto, sete grupos, em um total de 12 IPR-Pv e seis estirpes de referência tiveram 100% de similaridade (Fig. 2). Os grupos formados em 100% de similaridade com as estirpes referência foram: a SEMIA 4088 e as IPR-Pv 2230, 497 e 506; as SEMIAs 4077 e 4080 e *R. leguminosarium* bv. Phaseoli agruparam somente com a IPR-Pv 1281, sendo que, esta IPR-Pv também teve 100% similaridade com essas SEMIAs na caracterização morfo-fisiológica. As estirpes referência *R. tropici* tipo A e *R. gallicum* bv. Gallicum foram agrupadas em 100% de similaridade.

Outros quatro grupos tiveram 100% de similaridade, com duas IPR-Pv cada: 583 e 889, 593 e 652, 1249 e 1252, 3087 e 3085. Esses dois últimos agrupamentos também foram observados na caracterização morfo-fisiológicos. Um grupo foi formado com estirpe referência *R. giardini* bv. giardini, que agrupou-se com as IPR-Pv 2234, 2303, 2248, 1045 e 2231 em um nível de 38% de similaridade. A estirpe referência *R. etli* bv. phaseoli agrupou-se com outras duas estirpes referência *R. tropici* tipo A e *R. gallicum* bv. Gallicum e com a estirpes IPR-Pv 453 com 60% de similaridade. Portanto, nesse trabalho, utilizando “primer” que amplifica o gene 16 S RNAr e cortada com as enzimas de restrições *MspI*, *HaeIII* e *HinfI*, a estirpe IPR-Pv 809 foi a que mais teve dissimilaridade, 97% em relação as outras IPR-Pv.



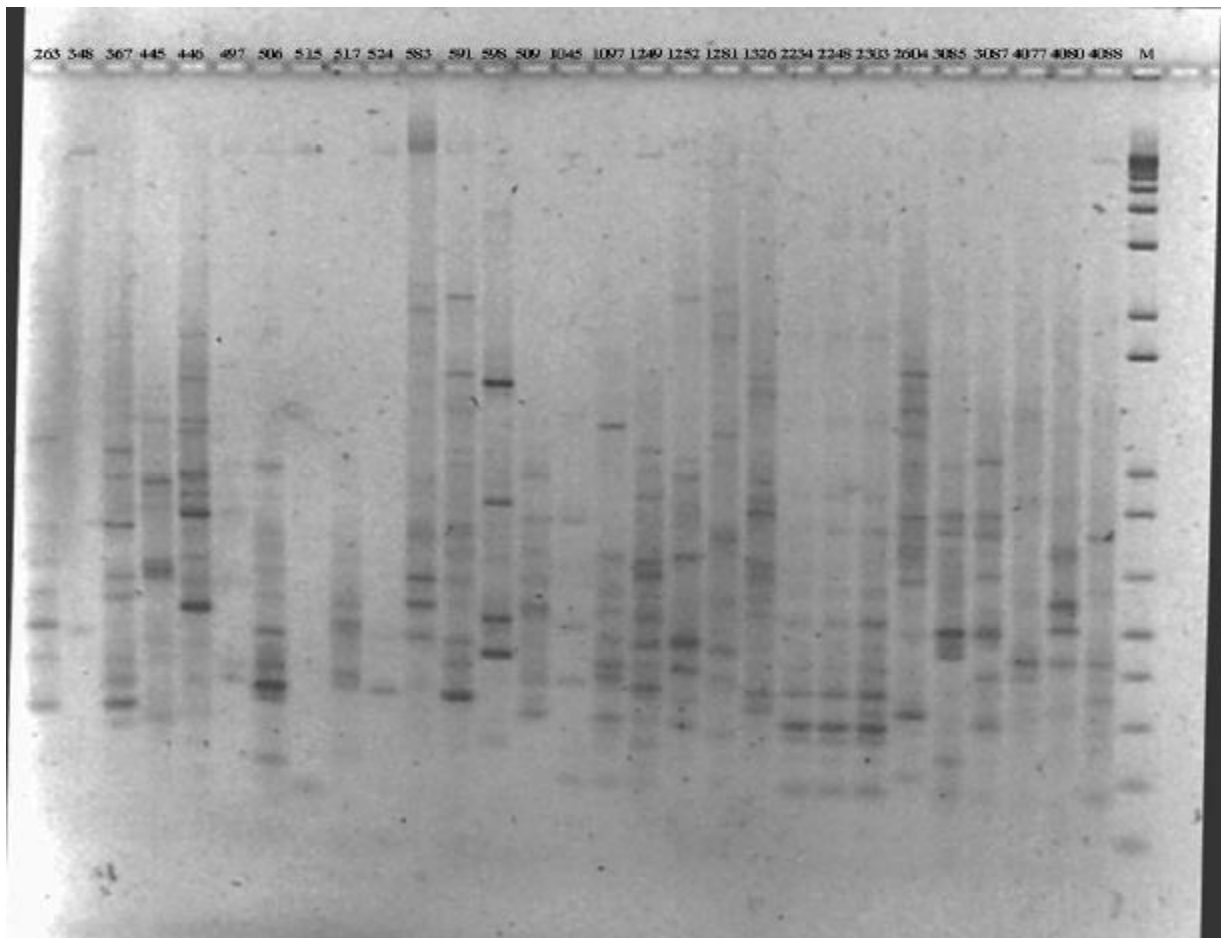
**Figura 2** – Dendrograma genético das estirpes elite de rizóbio, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela técnica de RFLP-PCR da região 16S RNAr, com as enzimas de restrição *HaeIII*, *MspI* e *HinfI*. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

Nos estudos de filogenia de bactérias, grandes avanços foram obtidos pela análise de genes conservados, mas que, no entanto, apresentam variabilidade para a aplicação em estudos de filogenia e taxonomia. Em especial, a região que

codifica o gene 16S RNAr, considerada altamente conservada entre as bactérias e com uma quantidade elevada de informações, capaz de revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (LAGUERRE; MAVINGUI et al., 1996; WOESE, 1987; FERNANDES; FERNANDES et al., 2003; WEISBURG; BARNS et al., 1991; YOUNG; DOWNER, EARDLY, 1991; WILLEMS; COLLINS, 1993). A análise por RFLP dessa região tem mostrado, também, alta correlação com as relações filogenéticas, e pode apresentar a vantagem de maior simplicidade e menor custo em relação ao seqüenciamento de bases (LAGUERRE; ALLARD et al., 1994; LAGUERRE; MAVINGUI et al., 1996; LAGUERRE; BERKUM et al., 1997).

### **5.2.2 Caracterização Intra Específica pela Análise do PCR Amplificado com Oligonucleotideo BOX e REP**

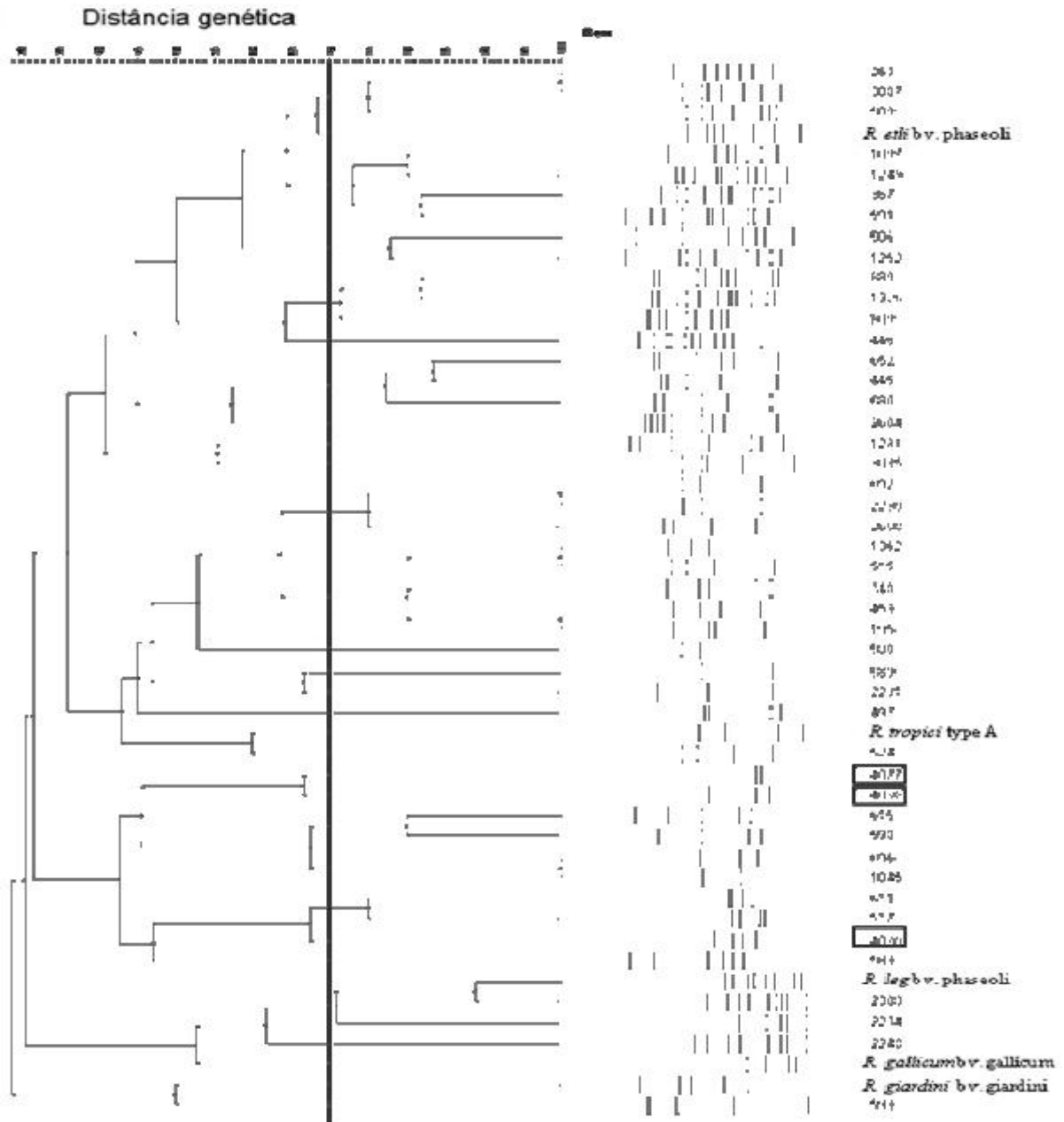
O perfil genético obtido com o oligonucleotideo BOX apresentou alto polimorfismo e um exemplo é apresentado na figura 3. Com base no perfil eletroforético e, através da análise utilizando o algoritmo UPGMA com o coeficiente de Jaccard com 5% de tolerância, foi construído um dendrograma das 43 estirpes elite e oito padrões, sendo que duas estirpes não amplificaram com o primer BOX. Todas as estirpes analisadas apresentaram perfil distinto, com exceção dos seguintes pares: IPR-Pv 263 e 3087; 692 e 2230; 1362 e 515; 453 e 195; 1045 e 611 (Fig. 4). Com 30% de similaridade, apenas as estirpes IPR-Pv 583 (originada de sementes de feijão comercializada em MG) e a *R. giardinii* (H152) formaram um grupo isolado. As estirpes de *R. tropici* IIB (CIAT 899 e H 12 tiveram 66% de similaridade e apenas 45% com a PRF 81.



**Figura 3** – Foto de um gel mostrando alguns exemplos de perfis de BOX-PCR obtidos da amplificação do DNA de algumas das estirpes elite de rizóbio-*Phaseolus* estudadas.

Considerando um nível de similaridade de 70% foi constatada a presença de 30 perfis diferentes de DNA amplificado pelo oligonucleoditeo BOX-PCR (Fig. 4). Esta técnica de análise molecular tem sido recomendada para identificação de estirpes por ser bastante discriminatória. Os resultados obtidos nesse estudo detectaram diversidade genética elevada entres as estirpes elites de rizóbio. A técnica de BOX-PCR mostrou-se valiosa para detectar diversidade intra e inter específica dentre rizóbios em diversos trabalhos (BERNAL; GRAHAM, 2001; MOSTASSO et al 2002; FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003; GRANGE; HUNGRIA, 2004; ALBERTON; KASCHUK; HUNGRIA, 2006; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007). Essa alta diversidade entre estirpes, com capacidade de formar nódulos em raízes de feijoeiro, isolados de solos brasileiros, tem sido amplamente relatada (ANDRADE;

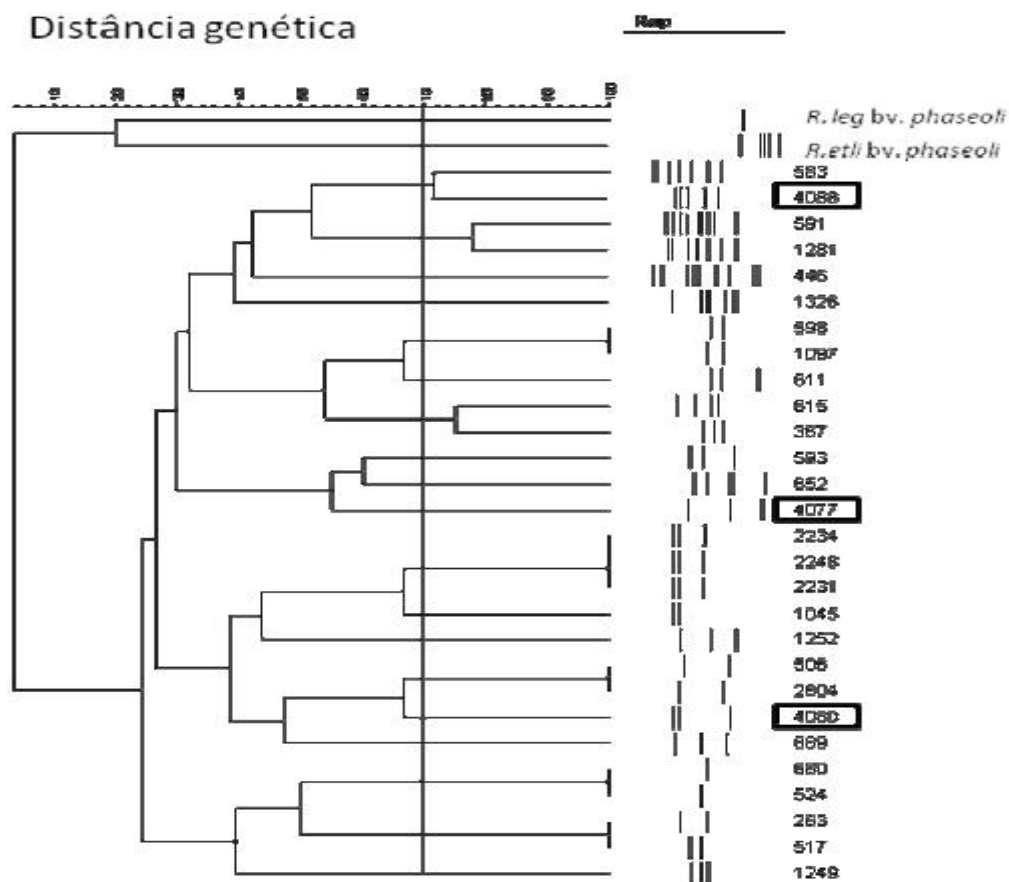
MURPHY; GILLER, 2002; STRALIOTTO; CUNHA et al. 1995; GRANGE; HUNGRIA, 2004).



**Figura 4** – Dendrograma genético construído a partir da análises dos produtos amplificado com o oligonucleotídeos denominado BOX-PCR de 43 estirpes elite isoladas de feijoeiro. A construção foi com base no uso do algoritmo UPGMA e do coeficiente de Jaccard (J).

Diversos estudos de determinação das relações genéticas entre estirpes de rizóbios têm empregado a amplificação do DNA pela técnica de PCR com

oligonucleotídeos específicos, como as seqüências REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e BOX, que codificam regiões altamente conservadas e repetidas, normalmente no espaço intergênico (ALBERTON; KASCHUK; HUNGRIA, 2006; FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003; BARCELLOS; MENNA et al. 2007; KASCHUK; HUNGRIA et al., 2006a, b; HUNGRIA; ANDRADE et al., 2000; GRANGE; HUNGRIA, 2004; BRUIJN, 1992; VERSALOVIC; SCHNEIDER et al., 1994). O uso desses oligonucleotídeos é vantajoso sobre aqueles não específicos porque, em uma única reação, obtém-se um número elevado de bandas, permitindo a detecção de polimorfismo suficientemente elevado para a análise genética das bactérias (CHUEIRE; NISHI et al., 2000; FERNANDES; FERNANDES; HUNGRIA, 2003).

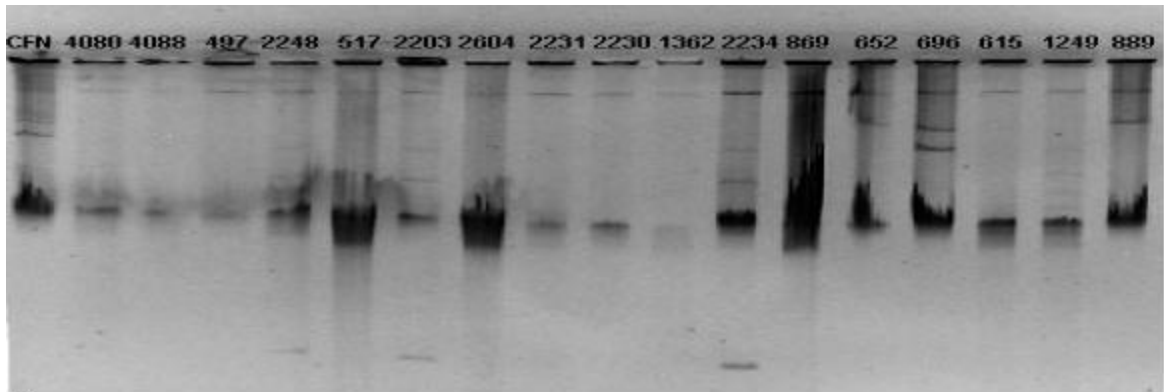


**Figura 5** – Dendrograma genético construído a partir da análise dos produtos amplificados com o oligonucleotídeo denominado REP-PCR de 25 estirpes elite isoladas de feijoeiro. A construção foi com base no uso do algoritmo UPGMA e do coeficiente de Jaccard (J).

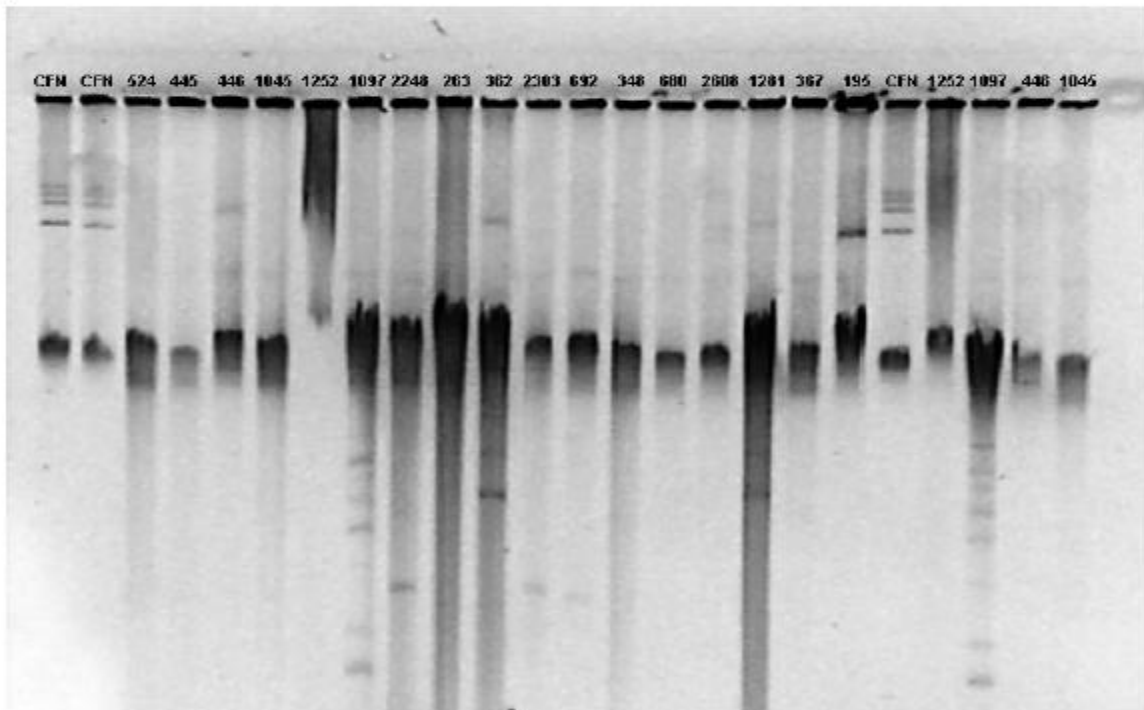
Com base nos perfis eletroforéticos obtidos com a amplificação por PCR com o oligonucleotídeos REP, 25 estirpes das 45 IPR-Pv foram amplificadas e as estirpes *R. leguminosarum* bv *phaseoli* (ATCC10004), *R. etli* (CF N42), CIAT 899, H 12 e PRF 81. Considerando o nível 5% de tolerância, obteve-se pelo dendrograma genético a formação de dois grupos com 4% de similaridade, conforme figura 5. O grupo I foi formado apenas pelas estirpes tipos de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* (ATCC10004) e *R. etli* (CFN 42), que entre si, tiveram 20% de similaridade. As 25 estirpes elite (IPR-Pv) utilizadas nesse estudo e as *R. tropici* IIB (CIAT 899, PRF 81, H 12) compuseram o grupo II em 25% de similaridade. Ainda no grupo II, considerando o nível de similaridade de 70% foi observada a formação de 20 perfis distintos e dentro desses ocorreram cinco subgrupos com 100% de similaridade (Fig. 5). Judd et al (1993) e Chen et al (2000) sugeriram que a técnica do REP é uma importante ferramenta para avaliar diversidade intra específica de estirpes relacionadas, por exemplo, ao mesmo serogrupo. Também, Barcellos et al (2007), estudando a transferência horizontal de genes em estirpes naturalizadas e inoculadas de rizóbios nodulante da soja, combinaram a técnica do BOX e do REP para caracterizar estirpes parentais e derivativas.

### **5.3 DIVERSIDADE SIMBIÓTICA INTRA ESPECÍFICA PELA ANÁLISE DO PERFIL DE PLASMÍDEOS**

Pela análise dos perfis de plasmídeos obtidos de 10 estirpes (–IPR-Pv) e comparando com o perfil da estirpe CNF 42 de *R. etli*, foi observado que existe uma diversidade elevada entre essas (Figura 6a e b). Os perfis de plasmídeos variaram de acordo com as estirpes.



(a)



(b)

**Figura 6** – Foto mostrando um exemplo do perfil de plasmídeos de algumas das estirpes elite IPR-*Pv* de rizóbio-*Phaseolus* (a e b).

## 6 CONCLUSÕES

1- Através da análise polifásica genética, verifica-se que essas 45 IPR-*Pv*, embora pré selecionadas para eficácia simbiótica, apresentam alta diversidade feno-genotípica sem relação com o histórico de origem.

2- A análises por BOX-PCR é discriminatório em nível de estirpe de rizóbio, enquanto que a análise por RFLP-PCR do gene 16S RNAr é discriminatório em nível de gênero espécies.

## REFERÊNCIAS

- 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. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology** , v. 47: p. 996-1006, 1997
- ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C.; BALOTA, E. L.; HUNGRIA, M. Rizóbio e Inoculação. In: **Feijão e tecnologia de produção**. Instituto Agronômico do Paraná, Londrina: IAPAR, 2000. v. 135: p.37-48.
- ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus*-nodulation rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental microbiology**, v. 68 :p. 4025-4034, 2002.
- ARAÚJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M., eds. **Microrganismos de Importância Agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.91-120.
- BARCELLOS, F. G.; MENNA, P.; BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M. 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(8): p. 2635-2643, 2007.
- BERNAL, G.; GRAHAM, P.H. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. **Can. J. Microbiol.**, 47:526-534, 2001.
- BROM, S.; MARTÍNEZ, E.; D'ÁVILA, G.; PALACIOS, R. Narrow- and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 54, p. 1280-1283, 1988.
- BRUIJN, F. J. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58(n.7), p.2180-2187, 1992.

BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**. Palo Alto, v. 46, p. 219-252, 1992.  
CARDOSO, J. D.; MATOS, M.; ANDRADE, D. S. Alteração no teor protéico do grão de feijão em função dos cultivares e da inoculação com rizóbio. In: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 20., 2006, Curitiba. Anais... Curitiba: p. 340, 2006.

CHEN, L. S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Genetic Characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 5099-5103, 2000

CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com "primers" aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, v. 4, p. 80-95, 2000.

CONAB, Avaliação da safra de grãos 2006/2007. Disponível em:  
<<http://www.conab.gov.br/download/safra/boletim.pdf>>.

COSTA, J. G. C.; VIEIRA, N. R. A. Qualidade, classificação comercial e manejo pós-colheita. **Cultura do Feijoeiro no Brasil: Características e Produção**. IAPAR; Londrina, 2000. p. 51-64.

CUBO, T., ROMERO, F., VINARDELL, J., RUIZ-SAINZ, J. E. "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.

ECKHARDT, T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic 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**: Disponível em:  
<<http://www.cnpaf.embrapa.br>> acesso em dezembro de 2005.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **FAOSTAT-Agricultural production statistical databases**. Disponível em:<<http://www.fao.org>>: Acesso em julho de 2006.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, (n.8), p. 911-920, 2003.

FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; VIEIRA, C.; TSAI, S. M. 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, v. 343, 1932.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: Importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v. 131, p. 872-877, 2003.

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.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobio from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1515-1528, 2000.

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

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.; 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.

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

JUDD, A. K.; SCHENEIDER, M.; SADOWSKY, M. J.; De BRUIJN, F. J. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* Serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1702-1708, 1993.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. 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, 2006 a

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. SANTOS, J. C. P.; BERTON-JUNIOR, J. F. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v. 87, p. 205-217, 2006 b

LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified 16S rDNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 56-63. 1994.

LAGUERRE, G.; van BERKUM, P; AMARGER, N; PREVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology** v.63: p. 4748-4758. 1997.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M. R.; CHARNAY, M. P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S. I.; GOIES, L. R.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62(6), p. 2029-2036, 1996.

MARTINEZ, E.; PARDO, M. A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M. A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**. London, v.131, p.1779-1786, 1985.

MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; FRANCO, A. A; GRAHAM, P. H.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 417-42, 1991.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Res.**, 73:121-132, 2002.

PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 1851-1864, 2007.

QUINTO, C.; FLORES, M.; LEEMANS, J.; CEVALLOS, M. A.; PARDO, M. A.; AZPIROZ, R.; GIRARD, M. L.; CALVA, E.; PALACIOS, R. Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**. Washington, v. 82, p. 1170-1174, 1985.

RELARE, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). "Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola RELARE." **Anais da XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola RELARE** 2006.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; ROMERO-MARINEZ, E. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 374-377, 1993.

SLICE, D.E.; KIM, J.; WALKER, J. **NTSYS-Numerical taxonomy and multivariate analysis system: versão 1.80**. [S.l.]:[s.n.], 1994.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy**. Freeman. San Francisco. 1973. 573 p.

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. de O.; MERCANTE, F. M.; RUMJANEK, N. G.; FRANCO, A. A. Genotypic diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts**. S.I., Embrapa-CNPBS, p.185-186. 1995.

VALVERDE, A.; IGUAL, J. M.; PEIX, A.; CERVANTES, E.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2631–2637, 2006

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Eds. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC p. 524, 1997.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJIN, F. J.; LUPSKI, J. R. 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. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 164p. 1970.

WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 17, p. 697-703, 1991.

WILLEMS, A.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 305-313, 1993.

WOESE, C. R. Bacteria evolution. **Microbiology Reviews**, v. 51, p. 221-27, 1987.

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. de O.; TEIXEIRA, M. G. Origem e evolução. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. eds. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. p. 57-70.

**ANEXOS**

## **ANEXO A**

### **Short Communication: Relationship Between Total Nodulation and Nodulation at the Root Crown of Peanut, Soybean and Common Bean Plants**

**ANEXO A – Short Communication: Relationship Between Total Nodulation and Nodulation at the Root Crown of Peanut, Soybean and Common Bean Plants**

----- Mensagem encaminhada -----

Remetente: "Soil Biology & Biochemistry" <soilbb@elsevier.com>

Data: 26/02/2009 13:55

Assunto: SBB3787

Para: diva@iapar.br

Dear Dr. Andrade

I acknowledge with thanks the safe receipt of the manuscript Relationship between total nodulation and nodulation at the root crown of peanut, soybean and common bean plants submitted to Soil Biology & Biochemistry.

This submission has been assigned the following reference number: SBB3787. You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/sbb/>.

A decision on publication will be communicated to you as soon as possible.

Please note that submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Thank you for submitting your manuscript to our journal.

If not done already, we would appreciate it if you could update your classifications in the system and choose the areas that best describe your special fields. Having more detailed classifications will help us to ensure that every manuscript receives expert, constructive commentary.

To update your classifications: Click 'Change Details' in the top menu. In the next screen click 'Select Personal Classifications' button and tick your classifications. Then press 'Submit'.

With kind regards,

Hans Smit  
Journal Manager  
Soil Biology and Biochemistry

1 Cover page

2 Type of contribution: Short communication

3 Date of preparation: 22 February 2009

4 Number of text pages: 6

5 Figures: 2

6 Title: **Relationship between total nodulation and nodulation at the root crown of**  
7 **peanut, soybean and common bean plants**

8 Juscélio D. Cardoso<sup>1</sup>; Douglas F. Gomes<sup>1</sup>; Kelly C. G. P. Goes<sup>1</sup>; Nelson da S Fonseca Junior<sup>2</sup>;  
9 Orazilia F. Dorigo<sup>2</sup>; Mariangela Hungria<sup>3</sup> and Diva S. Andrade<sup>2\*</sup>

10

11 Short title: **Total nodulation and at the root crown of peanut, soybean and common bean**

12

13 <sup>1</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Londrina, PR, Brazil

14 <sup>2</sup>Instituto Agronômico do Paraná, Cx Postal 481, CEP 86047-902, Londrina, PR, Brazil

15 <sup>3</sup>Embrapa Soja, Biotecnologia do Solo, Cx Postal 231, CEP 86001-970, Londrina-PR,

16

17 \*Corresponding author: Diva S Andrade

18 Department of Soil Science

19 Rodovia Celso Garcia Cid, km 375

20 Cx. Postal 481 - CEP 86047-902, Londrina, Paraná, Brazil

21 Telephone: +55 43 3376 2000 - Fax: +55 4333762101

22 E-mail address: [diva@iapar.br](mailto:diva@iapar.br) or [andradeds@yahoo.com.br](mailto:andradeds@yahoo.com.br)

23                   **Relationship between total nodulation and nodulation at the root crown of**  
24                   **peanut, soybean and common bean plants**

25   Juscélio D. Cardoso<sup>1</sup>; Douglas F. Gomes<sup>1</sup>; Kelly C. G. P. Goes<sup>1</sup>; Nelson da S Fonseca Junior<sup>2</sup>;  
26   Orazilia F. Dorigo<sup>2</sup>; Mariangela Hungria<sup>3</sup> and Diva S. Andrade<sup>2\*</sup>

27   <sup>1</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Londrina, PR, Brazil

28   <sup>2</sup>Instituto Agronômico do Paraná, Cx Postal 481, CEP 86047-902, Londrina, PR, Brazil

29   <sup>3</sup>Embrapa Soja, Biotecnologia do Solo, Cx Postal 231, CEP 86001-970, Londrina-PR, Brazil

30

31   **Abstract**

32   The objective of this study was to simplify the procedure for evaluation of legume nodulation,  
33   by examining if there is a relationship between the nodulation of the whole root system and at  
34   the crown region. Roots of peanut, soybean and common bean plants growing in soils were  
35   split in two parts (crown and bottom) and assessed for nodulation (nodule number and dry  
36   weight). In general, most nodules were concentrated at the crown, and crown nodulation was  
37   generally positively correlated with total nodulation of all three legumes. The results are  
38   highly applicable in studies such as strain selection for inoculants and assessment of  
39   inoculation technologies, among others, and is an important contribution to help reduce the  
40   time and labor required for the evaluation of nodulation parameters.

41   **Keywords:** *Arachis hypogaea*, *Bradyrhizobium*, *Glycine max*, legume, *Phaseolus vulgaris*,  
42   *Rhizobium*, symbiosis.

43

44           Soybean (*Glycine max* L. Merr.), peanut (*Arachis hypogaea* L.) and common bean  
45   (*Phaseolus vulgaris* L.) are broadly grown in Brazil as protein sources and, in the case of the  
46   first and the second crops, also for oil production. These legumes establish symbiotic  
47   associations with soil bacteria which form typical structures called nodules, where the process  
48   of N<sub>2</sub> fixation takes place. Rhizobial strain selection programs and experiments aiming at  
49   evaluating the agronomic efficiency of different inoculants, strains, and inoculant  
50   technologies are based on the evaluation of several parameters related to the symbiosis, of

51 which root nodulation (nodule number and dry weight) represents a major component.  
52 However, despite its importance, the assessment of nodulation is very labor-intensive and  
53 time-consuming — especially when large numbers of samples are considered. Strategies have  
54 been searched, aiming at improving the procedure, one example being the determination of  
55 nodulation on the roots of plants grown in pouches using an image analysis system (Vikman  
56 and Vessey, 1993; Lira Jr. and Smith, 2000). However, there is no information concerning the  
57 comparison of partial and whole root nodulation of soil-grown legumes. The aim of this study  
58 was thus to examine if there is a relationship between nodulation evaluated in whole plant  
59 root system and at the crown region, what would allow a considerable reduction of the time  
60 and labor involved in the evaluation.

61 Peanut and common bean plants were collected from greenhouse experiments, which  
62 were set up to evaluate the performance of rhizobial strains. Surface sterilized seeds were  
63 inoculated with  $1.3$  to  $1.7 \times 10^9$  viable cells  $\text{mL}^{-1}$  of *Bradyrhizobium* spp. strains SEMIA 6144  
64 (FEPAGRO collection, Porto Alegre, RS) and IPR-*Ah*-737 (Instituto Agronômico do Paraná -  
65 IAPAR collection) for the peanut (cultivar IAC Tatu ST) and *Rhizobium* spp. IPR-*Pv*- strains  
66 (IAPAR collection) for the common bean (cultivar IPR-Colibri).

67 Further samplings were undertaken with soybean plants (cultivar BRS184) from an  
68 experiment of inoculant carriers in an acidic oxisol at the Experimental Station of IAPAR in  
69 Ponta Grossa ( $23^{\circ}13'S$  and  $50^{\circ}03'W$ , altitude 880 m, climate *Cfb*, Köppen classification) and  
70 common bean plants (28 cultivars) from two independent field experiments performed in an  
71 oxisol at the Experimental Station of IAPAR in Londrina ( $23^{\circ}23' S$  and  $50^{\circ}11' W$ , altitude 610  
72 m, climate *Cfa*). In these field experiments approximately  $10^9$  viable cells  $\text{g}^{-1}$  of peat inoculant  
73 with the *R. tropici* strains SEMIA 4077 (=CIAT 899), SEMIA 4080 (=PRF 81) and SEMIA  
74 4088 (=H 12) were used for the common bean, while soybean seeds were inoculated with *B.*  
75 *japonicum* strain SEMIA 5079 (=CPAC 15). Soybean was sown in early November of 2008.  
76 The first and the second common bean field experiments were sown in April of 2008 and in  
77 the end of August of 2008, respectively. At early flowering (35 to 42, days after emergence -

78 DAE) common bean plants were collected from 68 and 94 pots or plots from greenhouse and  
79 field experiments, respectively. For the peanut, 21 plants from seven treatments (three  
80 replicates per treatment) were harvested at 65 DAE and for soybean 30 plots with six to seven  
81 plants from five treatments with six replicates were collected at 46 DAE.

82 The roots were gently pulled or removed from the soil, carefully washed over a 0.5 mm  
83 diameter sieve and then split in two parts: 1) the first, from the cotyledonal node to 7 cm  
84 below (named crown region, and including main and lateral roots, from now on referred to as  
85 crown root), 2) the second segment included the remaining root system beyond 7 cm, referred  
86 to as the bottom part of the root system. Root segments were dried at 65 °C in an air forced  
87 oven till constant weight and nodules were then removed, counted and weighed. Nodulation  
88 parameters from the greenhouse experiments represent the means of three plants per pot and,  
89 in the case of field experiments (common bean and soybean), means of six to seven plants.  
90 Statistical analyses of data were performed with SAS for Windows v 9.1 software package  
91 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1998).

92 For the peanut and soybean crops, most nodules were observed at the crown,  
93 representing from 82 to 92% of nodule number and dry weight, respectively. The results are  
94 in accordance to those obtained with two peanut cultivars, where most nodules were formed  
95 on the first order lateral roots (Tajima et al., 2006). In the analyses with peanut, the Spearman  
96 correlation coefficients for nodule number were significant and positively related ( $r=0.964$ ;  
97  $p<0.001$  and  $r=0.750$ ,  $p<0.038$ ) for the crown and bottom regions, respectively (Fig.1a),  
98 while for nodule dry weight a significant correlation was observed ( $r=0.964$ ,  $p<0.001$ ) only  
99 with the crown root (Fig. 1b). There were no significant differences between whole and crown  
100 root nodulation of both crops, according to the t-test (t value = 0.948,  $p=0.362$ ) (Fig. 1a and

101 1b) and (Mann-Whitney test,  $p<0.001$ ) (Fig. 1c and 1d). However, significant differences  
102 (Mann-Whitney test,  $p<0.001$ ) between whole nodulation and nodulation at the bottom part  
103 were observed. Linear regressions were obtained considering the nodule number and dry  
104 weight from the whole root system and from the crown, except for nodule dry weight in the  
105 bottom part of peanut root (Fig. 1a and 1b).

106 In both greenhouse and field experiments, we have observed significant and positive  
107 relationships between nodulation (nodule number and dry weight) of the whole root system  
108 and at the crown region (Fig. 2). The mean values of nodule number and dry weight for the  
109 two segments (crown and bottom root region) were statistically different (Spearman  
110 correlation and Mann-Whitney test,  $p=<0.001$ ) (Fig. 2a and b). Despite the higher number of  
111 nodules at the bottom root part, the dry weight of nodules did not show the same linear trend  
112 and the best fit was represented by a polynomial linear regression for both root segments (Fig.  
113 2b). By using 28 different recommended cultivars of common bean, no significant differences  
114 (Mann-Whitney test,  $p=0.131$  and  $p=0.036$ ) were observed between nodulation of the whole  
115 root and at the crown region (Fig. 2c and d).

116 According to our study, for peanut, soybean and common bean most of the nodulation  
117 resulting from inoculation occurs at the primary crown root system and not at the secondary  
118 roots. Early studies by Kamicker and Brill (1987) have also reported that inoculant added to  
119 the seed furrow produced nodules mainly in the top region of the soybean root, indicating that  
120 the movement of the inoculated rhizobia in soil is limited. Other studies have confirmed that  
121 the vertical movement of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains is  
122 very limited (Hardarson et al., 1989; Catalow et al., 1990). Also, with soybean, it appears that  
123 when there are large populations of bradyrhizobia in the soil and seeds are inoculated with  
124 selected strains, a successful inoculation results in an increased nodulation at the crown root  
125 region (Hungria and Bohrer, 2000).

126 The present study can highly contribute to evaluate the performance of strains,  
127 inoculants and inoculation techniques, such as cover spray inoculation (Zilli et al., 2008) in

128 field experiments, strain selection programs, evaluation of inoculant carriers, among others. In  
129 conclusion, for soybean, peanut and common bean, the nodulation may be evaluated only at  
130 the crown region instead of the whole root system, saving time and labor in the determination  
131 of those parameters in experiments.

132

### 133 **Acknowledgements**

134 To Dr. Ricardo S. Araujo for helpful discussion and Eliane Bangel (FEPAGRO) for kindly  
135 sending strains SEMIA 6144 and SEMIA 5079. The authors also thank the support of CNPq  
136 (#552393/2005-3, 577933/2008-6). J.D. Cardoso acknowledges the Projects Macroprograma  
137 2 and Plantio Direto Orgânico (#3202880000-8, IAPAR/IATAIPU/FAPEAGRO) for a  
138 fellowship. M. Hungria acknowledges a research fellowship from CNPq (300698/2007-0).

139

### 140 **References**

- 141 Catlow, H.Y., Glenn, A.R., Dilworth, M.J., 1990. Does rhizobial motility affect its ability to  
142 colonize along the legume root? *Soil Biology & Biochemistry* 22, 573–575.
- 143 Hardarson, G., Golbs, M., Danso, S. K. A., 1989. Nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*  
144 L. Merrill) as affected by nodulation patterns. *Soil Biology & Biochemistry* 21, 783–  
145 787.
- 146 Hungria, M., Bohrer, T. R. J., 2000. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity  
147 among soybean cultivars. *Biology and Fertility of Soils* 31, 45-52.
- 148 Kamicker, B. J., Brill, W. J., 1987. Methods to alter the recovery and nodule location of  
149 *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strains on field-grown soybeans. *Applied and*  
150 *Environmental Microbiology* 53, 1737-1742.
- 151 Lira Jr., M. de A., Smith, D. L., 2000. Use of standard TWAIN scanner and software for  
152 nodule number determination on different legume species. *Soil Biology & Biochemistry*  
153 32, 1453-1467.

154 SAS INSTITUTE, 1998. SAS/STAT User's Guide. Release 6.12 ed. Cary, N. C, USA.

155 SAS Institute Inc.

156 Tajima, R., Morita, S., Abe, J., 2006. Distribution pattern of root nodules in relation to root  
157 architecture in two leading cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in Japan. Plant  
158 Production Science 9, 249-255.

159 Vikman, K. E., Vessey, J. K., 1993. Ontogenetic changes in root nodule subpopulations of  
160 common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) III. Nodule formation, growth and degradation.  
161 Journal of Experimental Botany 44, 579-586.

162 Zilli, J. E., Marson, L. C., Marson, B. F., Gianluppi, V., Campo, R. J., Hungria, M., 2008.  
163 Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura. Pesquisa  
164 Agropecuária Brasileira 43, 541-544.

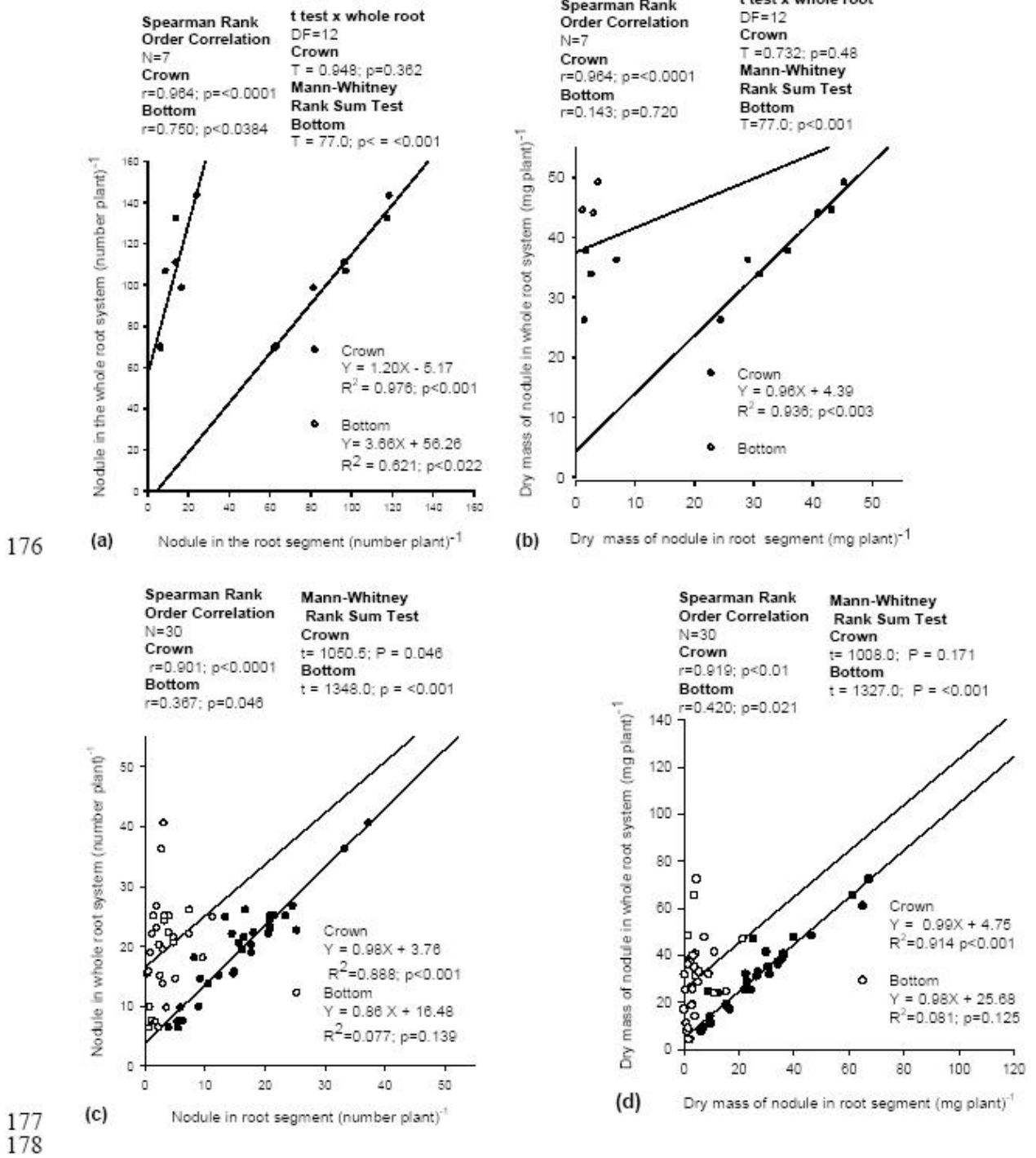
165 Figure captions

166 Fig. 1. Relationship between nodulation in the whole and in two segments (at crown and  
167 bottom) of the root system of peanut plant growing in pots containing soil (a and b) and of  
168 field-grown soybean plants from the experiment of inoculant carriers (c and d). N=number of  
169 samples; r=correlation coefficient; df=degrees of freedom.

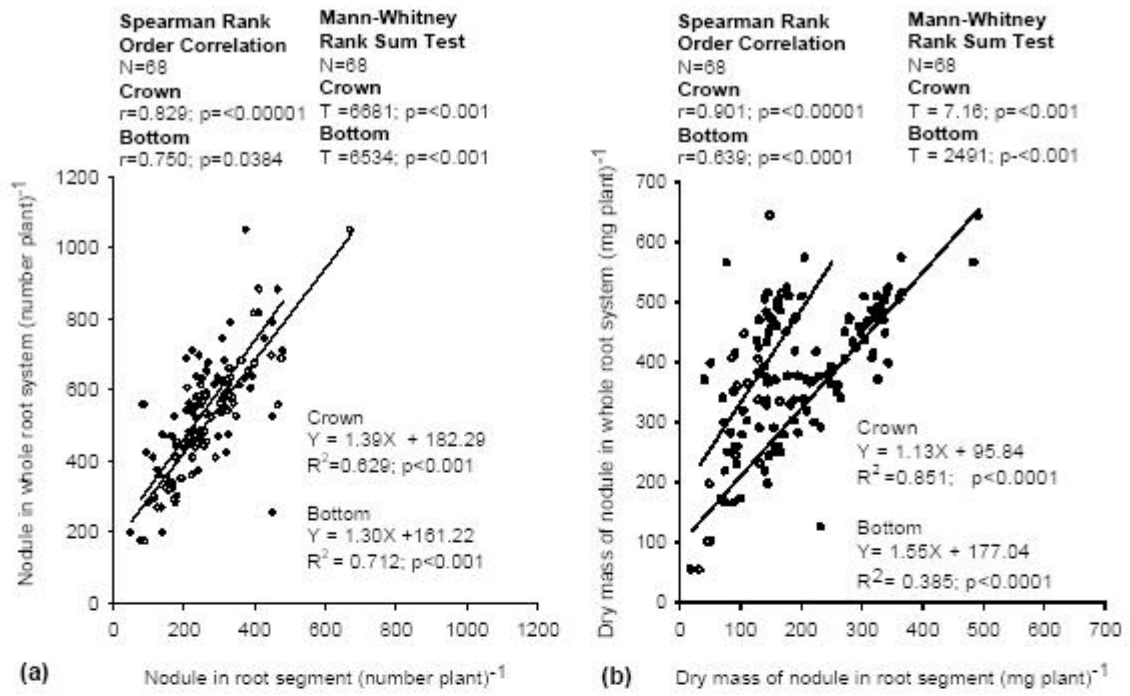
170

171 Fig. 2. Relationship between nodulation in the whole and in two segments (at crown and  
172 bottom) of the root system of common bean growing in pots containing soil [(a) and (b)] and  
173 in field-grown [(c) and (d)] plants from the two independent experiments. N=number of  
174 samples; r=correlation coefficient.

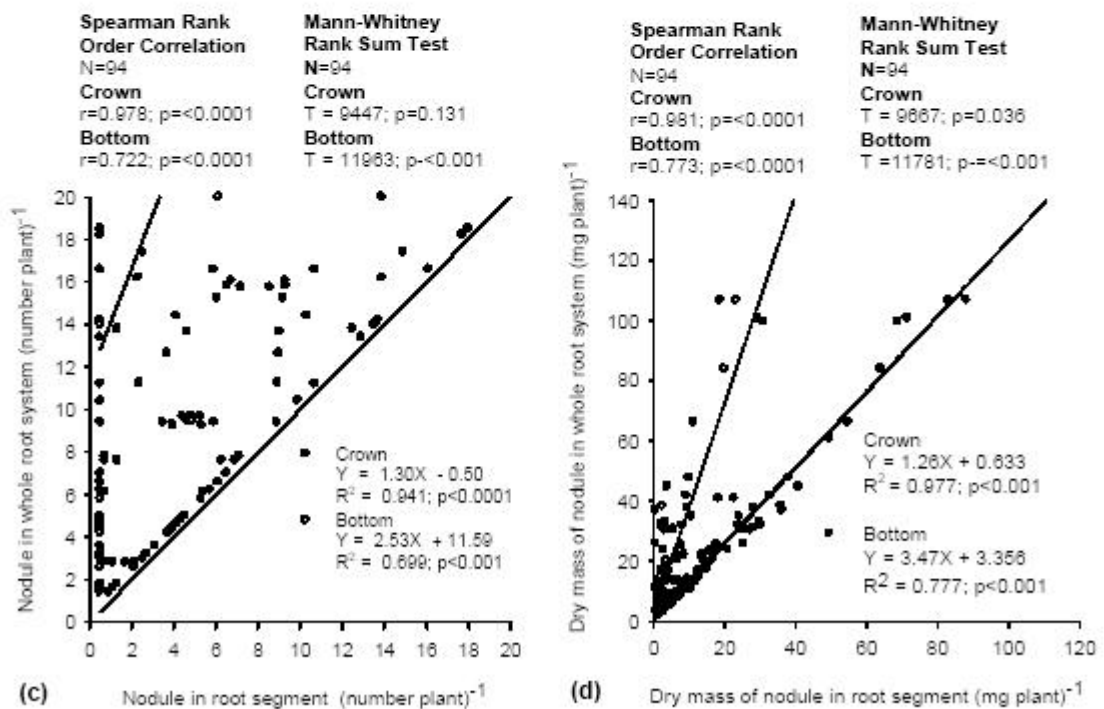
175



177 Fig. 1.  
 178  
 179



180



181

182 Fig. 2.

## **ANEXO B**

**Guia para Autores da Revista “Soil Biology & Biochemistry”**

## **ANEXO B – Guia para Autores da Revista “Soil Biology & Biochemistry”**

### **Guide for Authors**

This journal is a forum for research on soil organisms, their biochemical activities and their influence on the soil environment and plant growth. It publishes original work on quantitative, analytical and experimental aspects of such research. Soil biology and soil biochemistry cover many scientific disciplines but a single journal brings together the results and views of research workers working in a wide variety of research areas. The scope of this journal is wide and embraces accounts of original research on the biology, ecology and biochemical activities of all forms of life that exist in the soil environment. Some of the subjects which have proved to be prominent are the biological transformations of plant nutrients in soil, nitrogen fixation and denitrification, soil-borne phases of plant parasites, the ecological control of soil-borne pathogens, the influence of pesticides on soil organisms, the biochemistry of pesticide and pollution decomposition in soil, microbial aspects of soil pollution, the composition of soil populations, modelling of biological processes in soil systems, the biochemical activities of soil organisms, soil enzymes and the interactions of soil organisms with plants and the effects of tillage on soil organisms and soil biochemistry.

### **Types of contribution**

1. *Regular papers*. Original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, may be submitted as regular papers.
2. *Short communications*. These should not exceed 1200 words (three printed pages) or their equivalent, excluding references and legends. Submissions should include a short abstract not exceeding 10% of the length of the communication and which summarizes briefly the main findings of the work to be reported. The bulk of the text should be in a continuous form that does not require numbered sections such as Introduction, Materials and methods, Results and Discussion. However, a Cover page, Abstract and a list of Keywords are required at the beginning of the communication and Acknowledgements

and References at the end. These components are to be prepared in the same format as used for full-length research papers. Occasionally authors may use sub-titles of their own choice to highlight sections of the text.

3. *Review articles\**. Review articles are welcome but should be topical and not just an overview of the literature. Before submission please contact one of the Chief Editors.

4. *News and Views*. Authors may submit comments and views on any subject covered by the Aims and Scope. The article should be about 1200 words, and submitted to a Chief Editor.

5. *Letters to the Editor*. Letters are published from time to time on matters of topical interest. These should be submitted directly to one of the Editors-in-Chief.

**REVIEW ARTICLES FOR SOIL BIOLOGY and BIOCHEMISTRY** 1. Readers of Soil Biology and Biochemistry may submit reviews on any topic that falls within the scope of this journal. Authors of Review Articles should aim to provide facts as well as qualified ideas and opinions derived from reliable and relevant publications. Then, from such material develop reasoned arguments and questions for future evaluation and research. Reviewers should provide a list of relevant and appropriate references. They should avoid introducing new facts in the form of unpublished data or personal communications. Thus, the reader will be able to assess the interpretations and evaluate the methodology employed in the publications that are cited in the review.

The Introduction should outline the scope of the review and set the limits to the field it covers. The overall objective of the review may be posed as a question or a series of questions.

The bulk of the review should aim to present or introduce new ideas to the reader, review the literature relevant to these ideas and be specific. The authors of a Review Article might be able to provide alternative and reasoned interpretations or opinions to those advanced in the articles cited in the review.

The review might conclude with a set of hypotheses for future work that could be tested either using available technology or for which current technology could be improved.

**Instructions for Authors of Review Articles** Review Articles should consist of the following sections; Cover page, Abstract, Keywords, Introduction, Review per se, Conclusions, Acknowledgements, References and any essential Tables or Figures.

The Introduction, Review and Conclusions should be numbered 1, 2 and 3, respectively. The Review section may be divided into numbered sub-sections, e.g., 2.1., 2.2., etc and sub-sections, e.g., 2.1.1., 2.1.2., etc.

The Reference section must be accurate and complete. It may include references to the more useful databases consulted.

The authors should provide the names and email addresses of no more than three scientists who are experts in the relevant field and who might be willing to provide open reviews of the submitted Review Article. The Editor will also submit the manuscript to experts for blind reviews.

### **Submission of Manuscripts**

Papers for consideration should be submitted to Elsevier Editorial System which can be accessed at <http://authors.elsevier.com/journal/soilbio>

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

## **Electronic manuscripts**

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://www.elsevier.com/locate/sbb>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper-trail.

## **Electronic format requirements for accepted articles**

We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX is preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used.

## **Wordprocessor documents**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed 'graphically designed' equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: [http://www.elsevier.com/locate/sbb](#))

<http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/howtosubmitpaper>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Preparation of electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spellchecker' function of your wordprocessor.

### **Preparation of manuscripts**


1. The Chief Editors request that papers submitted for publication should be written concisely and clearly. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. Either the Concise Oxford Dictionary or Webster's New International Dictionary may be used as a standard for English spelling.

**English language help service:** Upon request, Elsevier will direct Authors to an agent who can check and improve the English of their paper (*before submission*). Please contact [www.elsevier.com/locate/elsevierpublishing](http://www.elsevier.com/locate/elsevierpublishing) for further information.

**A poorly prepared manuscript often produces a negative reaction in reviewers, irrespective of the quality of the science. The Chief Editors will return to the authors submissions that do not conform to journal style and format or are poorly written.**

### **English language help service:**

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com) for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to

our Terms & Conditions   
[http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws\\_home/termsconditions](http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions)

2. Manuscripts should be prepared **with all lines of text throughout the manuscript numbered consecutively from page to page, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive use of italics to emphasize part of the text.

3. Authors should provide a separate cover page including:

Type of contribution

Date of preparation, number of text pages, number of tables, figures etc.

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Names of authors

Complete postal address(es) or affiliations

Full telephone, Fax No. and E-mail address of the corresponding author

Present addresses of authors if applicable

Complete correspondence address to which the proofs should be sent as a footnote indicated with an asterisk

Special instructions to the printer such as: (a) magnification of photographs, (b) layout of figures, (c) unusual positioning of Figures and Tables in relation to text; (d) if the submitted paper is one of a series of papers to be published in the journal the order in which the papers are to appear should be indicated.

4. Manuscripts should be organised in the following sequence:

Cover page (see above)

Abstract

Keywords

Introduction

Materials and methods

Results

Discussion (including Conclusions)

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

5. In typing the manuscript, titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type. First and second order headings should be numbered.

6. SI units should be used, but authors may include conversions for unfamiliar units (1 bar=0.1 MPa). Do not include periods. Note the following conventions: e.g. not eg., rev min<sup>-1</sup> not rpm, mg kg<sup>-1</sup> or l<sup>-1</sup> not ppm, 1 bar equals 0.1 MPa, round off units to eliminate unnecessary decimal places, e.g. 124 µm not 0.124 mm (note space between number and unit), l not L for litre, kg not Kg, s not sec, min not mins, h not hr, d for day, y not yr, 25 t ha<sup>-1</sup> not 25 tonnes/ha, 3 mg cm<sup>-3</sup> not three mg per cubic cm, 23°C and 23% (no spaces), (Keating et al., 1996) not (Keating et al, 1996), al. is an abbreviation of alii (others - Latin). Molar concentrations should appear in small caps.

7. Abbreviations may be used for unwieldy names which occur frequently and such abbreviations must be defined the first time they occur in the text. Conventional abbreviations, e.g. EDTA, ATP, 2,4-D should be used in preference to freshly coined ones.

8. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide. Upon submission, papers will be checked to determine if they conform to the style and format for *Soil Biology & Biochemistry*. Papers that do not comply may be returned to the corresponding author with a check list detailing faults and omissions.

Avoid new or uncommon acronyms. Use single letters (Greek, Roman, italic) for variables with subscripts as appropriate.

### **Title**

This should be clear, descriptive and brief. Avoid non-specific phrases such as "A study of..." or "The effects of...". Do not give the title a numbered subtitle or series number.

### **Abstract**

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

### **Keywords**

Keywords are index terms or descriptions for information retrieval systems, normally 6 to 10 items. Words selected should reflect the essential topics of the article and may be taken from both the title and the text. Do not select "soil"

### **Introduction**

This should give the reasons for doing the work. **As this is a specialist journal a detailed review of the literature is not necessary.** The Introduction should preferably conclude with a final paragraph stating concisely and clearly the Aims and Objectives of the investigation.

### **Materials and methods**

A full technical description of a method should be given in detail only when the method is new.

### **Results**

This need only report results of representative experiments illustrated by Tables and Figures. Use well-known statistical tests in preference to obscure ones. Consult a statistician or a statistics text for detailed advice.

**Discussion**

This section must not recapitulate results but should relate the authors' experiments to other work and give their conclusions, which may be given in a subsection headed **Conclusions.**

**Acknowledgements**

Do not include grant numbers or institutional journal publication numbers.

**Tables**

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Drawn tables, from which blocks need to be made, should not be folded.
4. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
5. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
6. Tables and their footnotes should be typed using a readable uniform font of the same size as that used in the text. Each text should have a brief and self-explanatory title.
7. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

8. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
9. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.
10. Zero results must be represented by 0 and no determination by ND; the dash sign (-) is ambiguous. Report data in such a way that readers can assess the degree of experimental variation and estimate the variability or precision of the findings. Use the standard deviation SD and the mean to summarise data and to show the variability among individuals. Use the standard error of the mean SEM to show the precision of the sample mean. Always state the number of measurements on which means are based. In tables and figures use asterisks to indicate probability values ( $P$ ). In footnotes or text show the degree of significance of  $P$ , e.g.  $P < 0.05^*$ .

### **Electronic Illustrations**

Submitting your artwork in an electronic format helps us to produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail.

1. Always supply high-quality printouts of your artwork, in case conversion of the electronic artwork is problematic.
2. Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
3. Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
4. Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
5. Number the illustrations according to their sequence in the text.
6. Use a logical naming convention for your artwork files, and supply a separate listing of the files and the software used.
7. Provide all illustrations as separate files.
8. Provide captions to illustrations separately.
9. Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://authors.elsevier.com/artwork>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### **Formats**

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

### **Please do not:**

&bull; Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;

&bull; Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;

&bull; Supply files that are too low in resolution;

&bull; Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### **Colour illustrations**

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g.,

ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version.

For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to grey scale (for the printed version should you opt to not pay for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

## References

*Note:* Authors are strongly encouraged to check the accuracy of each reference against its original source.

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed if necessary by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that...". "This is in agreement with results obtained later (Kramer,1989, pp. 12-16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references, please note the proper position of the punctuation:

a. *For periodicals*

Zelles, L., Bai, Q.Y., Beck, T., Beese, F., 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* 24, 317-323.

b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*

Rice, K., 1992. Theory and conceptual issues. In: Gall, G.A.E., Staton, M. (Eds.), *Integrating Conservation Biology and Agricultural Production*. Agriculture, Ecosystems and Environment 42, 9-26.

c. *For books*


Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Field Trials*. Elsevier, Amsterdam, 278 pp.

d. *For multi-author books*

DeLacy, I.H., Cooper, M., Lawrence, P.K., 1990. Pattern analysis over years of regional variety trials: relationship among sites. In: Kang, M.S. (Ed.), *Genotype by Environment Interaction and Plant Breeding*. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, pp. 189-213.

e. *For website (WWW) entires*

Citations must be confined to peer-reviewed material or official publications, such as annual reports.

CAN/BNQ, 1996. Amenderments organiques-composts. Norme nationale du Canada. CAN/BNQ 0413-200. Conseil canadien des normes. Ottawa, Ont. (on line)   
<http://www.scc.ca/> (11 July, 2004).

6. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Roman alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

7. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press". Authors should provide evidence (such as a copy of the letter of acceptance).

8. Higher degree dissertations (Ph.D., M.Sc etc.) unpublished data and personal communications should be referred to as 'unpublished observations'in the text and not cited in the References.

### **Formulae**

1. Formulae should be typewritten, if possible. Leave ample space around the formulae.

2. Subscripts and superscripts should be clear.

3. Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.

4. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

5. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
6. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
7. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of  $e$  are often more conveniently denoted by  $\exp$ .
8. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$ .
9. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g.,  $\text{Ca}^{2+}$ , not as  $\text{Ca}^{++}$ .
10. Isotope numbers should precede the symbols, e.g.,  $^{18}\text{O}$ .

**Articles in Special Issues:** Please ensure that the words 'this issue' are added (in the list and text) to any references to other articles in this Special Issue.

### **Footnotes**

Footnotes should only be used to provide addresses of authors or to provide explanations essential to the understanding of Tables.

### **Nomenclature**

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.
2. All organisms should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. The authority of a species should only be given in the Materials and Methods section.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

### *Supplementary data*

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file.

### **Copyright**

1. An author, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an illustration or table from a book or journal article, should make sure that he is not infringing a copyright.

2. Although in general an author may quote from other published works, he should obtain permission from the holder of the copyright if he wishes to make substantial extracts or to reproduce tables, plates, or other illustrations. If the copyright-holder is not the author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the author should also be sought.

3. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.
4. A suitable acknowledgement of any borrowed material must always be made.

## **Proofs**

When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'.

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

## **Offprints**

1. Twenty-five offprints for regular papers will be supplied free of charge.

2. Additional offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.

3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra offprints.

***Soil Biology & Biochemistry does not have page charges.***

### **Author Services**

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature at <http://authors.elsevier.com>. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author. In case of problems or questions, authors may contact the Author Service Department, E-mail: [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com). Information about Soil Biology & Biochemistry is available on the World Wide Web at the following addresses:

<http://www.elsevier.com/locate/soilbio>

updated: May 2007