

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE  
DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA  
NA AMAZÔNIA**

**ELIANE GUIMARÃES PEREIRA**

**2000**

50314

35423

**ELIANE GUIMARÃES PEREIRA**

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE DIFERENTES  
SISTEMAS DE USO DA TERRA NA AMAZÔNIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Profa. Fátima M.S. Moreira

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA



50314

BIBLIOTECA CENTRAL

UFLA  
N.º CLAS. 1333.76

PER

div  
N.º REGISTRO 50314

DATA 10/ 03 /00

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2000

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Eliane Guimarães

Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na  
Amazônia / Eliane Guimarães Pereira. -- Lavras : UFLA, 2000.

93 p. : il.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Biodiversidade. 2. Uso da terra. 3. Rizóbio. 4. Amazônia. 5. Caupi. 6. Feijão.  
7. Siratro. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-333.76  
-635.652


**ELIANE GUIMARÃES PEREIRA**

**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE DIFERENTES  
SISTEMAS DE USO DA TERRA NA AMAZÔNIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 15 de agosto de 2000

José Oswaldo Siqueira	UFLA/DCS
Dulcinéia de Carvalho	UFLA/DCF
Norma Gouvêa Rumjanek	EMBRAPA/CNPAB
Rosângela Stralotto	EMBRAPA/CNPAB



Prof. Fátima M.S. Moreira  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais Célio e Alba e aos  
meus irmãos Juninho e Viviane,  
**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, por tudo que fizeram para que chegasse esse momento;

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do curso;

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudo;

Ao Projeto “Alternatives to Slash-and-Burn/International Centre for Research in Agroforestry” (ASB/ICRAF) coordenado pelo Dr. Pedro Sanches e ao Programa “Tropical Soil Biology and Fertility” (TSBF) coordenado pelo Dr. Mike Swift, pelo financiamento parcial do projeto;

À professora Fátima M.S. Moreira, pela orientação e dedicação;

À José O. Siqueira, Norma G. Rumjanek e Rosângela Stralotto, pelas contribuições ao trabalho;

À professora Dulcinéia de Carvalho, pela amizade e grande colaboração;

Ao professor Nilton Curi, pelo apoio e amizade;

Aos bolsistas Adão M. Lacerda e Adriana S. Lima, pela grande ajuda na execução do trabalho;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, especialmente os do Laboratório de Microbiologia do Solo, pela agradável convivência;

Ao Henrique E. Dias Júnior, pelos bons momentos e carinho;

À Ana Rosa e Paula, pela amizade e compreensão incondicionais;

Ao Rogério, pela paciência, carinho e grande ajuda na concretização desse trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO GERAL .....	i
GENNERAL ABSTRACT .....	ii
CAPÍTULO 1 .....	01
1 Introdução geral .....	01
2 Referencial teórico.....	02
2.1 Simbiose rizóbio-leguminosas e a importância da fixação biológica de nitrogênio (FBN) .....	02
2.2 Taxonomia de rizóbio .....	04
2.3 Diversidade de rizóbio .....	08
2.4 Relações simbióticas .....	14
2.5 Fatores que afetam a população de rizóbio .....	16
3 Referências bibliográficas.....	18
CAPÍTULO 2: Densidade, eficiência e diversidade fenotípica de populações de rizóbio em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia .....	29
Resumo .....	29
Abstract.....	31
1 Introdução .....	32
2 Material e métodos .....	33
2.1 Coleta de solo e nódulos de campo .....	33
2.2 Densidade de rizóbio .....	37
2.3 Processo de isolamento e caracterização fenotípica de rizóbio .....	39
3 Resultados e discussão.....	41
4 Conclusões .....	57
5 Referências bibliográficas .....	58

<b>CAPÍTULO 3: Diversidade fenotípica e simbiótica entre isolados de rizóbio de <i>Vigna unguiculata</i> de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia</b> .....	62
Resumo .....	62
Abstract.....	63
1 Introdução .....	64
2 Material e métodos .....	65
3 Resultados e discussão.....	68
4 Conclusões .....	76
5 Referências bibliográficas .....	77
<b>CAPÍTULO 4: Diversidade simbiótica, fenotípica e genética entre isolados de rizóbio de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. da Região Amazônica</b>	79
Resumo .....	79
Abstract.....	80
1 Introdução .....	81
2 Material e métodos .....	82
3 Resultados e discussão.....	84
4 Conclusões .....	90
5 Referências bibliográficas .....	91



## RESUMO GERAL

PEREIRA, E.G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.** Lavras: UFLA, 2000. Cap. 1. 28p. (Tese-Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)\*

Supõe-se que a diversidade dos organismos do solo tenha uma relação estreita com a biodiversidade acima do solo e que a perda de diversidade microbiana pode levar a uma perda de função reduzindo a sustentabilidade dos ecossistemas. A fixação biológica de nitrogênio é uma das mais importantes funções do solo especialmente quando mediada pelas simbioses de rizóbio com leguminosas. Objetivando avaliar a densidade e diversidade fenotípica, genética e simbiótica de populações de rizóbio em amostras de solo coletados em três sítios de cada um dos seguintes sistemas de uso da terra (SUTs): floresta, capoeira, sistema agroflorestal, monocultura e pastagem, na Região Amazônica, instalaram-se experimentos em laboratório e casa de vegetação. Siratro (*Macropitillium atropurpureum*) e caupi (*Vigna unguiculata*) foram utilizados como plantas iscas para estirpes de rizóbio, sendo que o primeiro também foi utilizado para determinação do número mais provável de rizóbio e eficiência da população nos diferentes SUTs. Rizóbio foi isolado das plantas iscas, de plantas de feijoeiro não inoculadas e de outras leguminosas nodulíferas encontradas nodulando com as populações nativas em alguns dos sítios amostrados. Todos os isolados foram caracterizados fenotipicamente pelas características culturais em meio YMA e os de feijão, caupi e alguns de siratra pelo padrão de proteínas total por eletroforese em gel de poliacrilamida. A análise genética foi feita nos isolados de feijão pela comparação dos padrões de restrição com diferentes enzimas para o fragmento 16 S rDNA. Em casa de vegetação, 26 isolados de caupi e 14 de feijão foram avaliados quanto à eficiência na FBN para seus hospedeiros homólogos. Houve efeito dos SUTs na densidade e eficiência de populações de rizóbio capturadas por siratro. Os isolados de feijoeiro apresentaram características culturais semelhantes, mas os perfis protéicos e de restrição permitiram o agrupamento discriminatório dos isolados, e a maioria apresentou alta eficiência simbiótica com a cultura, sendo alguns mais eficientes que estirpes atualmente recomendadas. O caupi permitiu o isolamento de rizóbios de grande diversidade fenotípica e simbiótica, com a maioria deles apresentando eficiência simbiótica superior ao de estirpes atualmente recomendadas à cultura. Foi encontrada nos diferentes SUTs da Região Amazônia grande diversidade de rizóbio. a diversidade cultural dos isolados calculada pelo índice de Shannon Weaver decresceu na seguinte ordem: floresta, sistema agroflorestal, pastagem, capoeira e monocultura.

---

\* Orientadora: Fátima M.S. Moreira - UFLA

## GENERAL ABSTRACT

PEREIRA, E.G. **Diversity of rhizobia isolated from different land use systems in Amazon Region.** Lavras: UFLA, 2000. Chap. 1. 28p. (Thesis - Doctorate in Soil and Plant Nutrition)\*

Below ground microbiota is thought to have a close relationship with above ground biodiversity. Besides, loss of microbial diversity can lead to a loss of function reducing ecosystem sustainability. BNF is among the most important soil functions, especially those performed by rhizobia symbiosis with legume species. Aiming to evaluate densities as well as phenotypic, genetic and symbiotic diversity of rhizobia populations at soil samples collected from three sites of each one of the following land use systems (LUS) in Amazon region: disturbed forest, fallow, pasture, crops and agroforestry systems, greenhouse and laboratory assays were carried out. Siratro (*Macropodium atropurpureum* Urb.) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) were used as trap hosts for rhizobia strains, being the former also used to determine rhizobia most probable numbers and population efficiencies at the LUS. Rhizobia were also isolated from trap hosts and from non inoculated bean plants and other leguminous species which were found nodulating with native populations at some sites. All isolates were characterized culturally on YMA medium. All bean and cowpea isolates and some siratro isolates were characterized by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of total proteins. Genetic analysis of bean isolates was made by comparison of restriction patterns with different enzymes to amplified 16S rRNA fragments (RFLP). At greenhouse conditions 26 cowpea isolates and 14 bean isolates were evaluated for the biological nitrogen fixation (BNF) efficiency to their homologous hosts. There was effect of LUS on densities and efficiency of rhizobia populations trapped by siratro. Bean isolates showed the same cultural characteristics on YMA but were highly discriminated by SDS-PAGE of total proteins and RFLP patterns. Most of them were highly efficient in BNF and even higher than recommended strain CIAT 899. Great phenotypic and symbiotic diversity was also found among cowpea isolates most of them showing superior efficiency to recommended strain BR 2001. The different LUS presented high diversity of rhizobia populations. Cultural diversity calculated by Shannon-Weaver index decreased in the order: forest > agroforestry system > pasture > fallow > crops.

---

\* Adviser: Fátima M.S. Moreira - UFLA

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A diversidade microbiana do solo tem sido considerada um fator importante na sustentabilidade de ecossistemas. A redução desta comunidade microbiana, com eventual extinção de espécies de microrganismos, pode causar perda de funções do solo, reduzindo a habilidade dos sistemas agrícolas de superar períodos de estresses, com sérias consequências à produtividade (Giller et al., 1997).

Dentre as comunidades microbianas, destacam-se as bactérias fixadoras de  $N_2$  com capacidade de formar simbiose com plantas leguminosas, comumente denominadas rizóbios. Pela alta diversidade deste grupo de microrganismos na natureza, estudos de diversidade de rizóbio têm sido limitados, principalmente por problemas na amostragem, identificação e métodos para sua monitoração no ambiente. No entanto, vários autores têm demonstrado o alto grau de diversidade entre isolados de rizóbio em diferentes ecossistemas, com relatos de maior ocorrência de isolados de rizóbio de crescimento lento, com alcalinização do meio e classificados como *Bradyrhizobium* sp. nos trópicos (Moreira et al., 1993). Entretanto, há poucos estudos demonstrando os efeitos dos sistemas de uso da terra (SUTs) em solos tropicais sobre a diversidade de rizóbio.

Do ponto de vista do manejo da FBN para a produção agrícola, os microrganismos diazotróficos selecionados em condições controladas e introduzidos através da prática de inoculação nem sempre apresentam o potencial máximo de eficiência no campo devido, entre outros fatores, à baixa competitividade por sítios de infecção com as bactérias nativas ou falta de adaptação às condições ambientais locais (Anyango et al, 1995). Torna-se

evidente, portanto, a necessidade de avaliar, quantificar e monitorar a diversidade de rizóbios na população nativa do solo. Além disso, a perda desta diversidade pode resultar na perda de estirpes com grande potencial inoculante, assim como a diminuição do potencial de fixação de nitrogênio dos solos, prejudicando o desenvolvimento de práticas de recuperação e conservação de solos.

O presente trabalho baseia-se na hipótese que a interferência antrópica na natureza resulta em perda de diversidade, ou seja, a derrubada das florestas tropicais diminui a diversidade de plantas e animais, e que a esta diminuição da biodiversidade acima do solo resulta na diminuição da biodiversidade abaixo do solo. No caso da biodiversidade de organismos do solo, há poucas evidências disto. Trabalhos mostrando perda de diversidade dos organismos do solo em uma ampla faixa de intensificação da agricultura não existem. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a diversidade de um grupo funcional chave de organismo do solo, os rizóbios, em diferentes sistemas de uso da terra na Região Amazônica.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Simbiose rizóbio-leguminosas e a importância da fixação biológica de nitrogênio (FBN)**

Rizóbios são bactérias Gram-negativas capazes de penetrar as raízes ou caules de plantas pertencentes à família das Leguminosas. Como resultado desta infecção, formam-se nódulos na raiz ou caule das plantas, onde as bactérias vivem em simbiose. Nos nódulos, o rizóbio reduz o nitrogênio atmosférico à amônia, que é transportada para a planta. Os nódulos são produtos de complexos

sinais trocados entre os simbioses (Fisher e Long, 1992). A especificidade entre os simbioses varia, umas bactérias infectam um número limitado de leguminosas, outras têm uma ampla gama de hospedeiros e vice-versa, ou seja, alguns hospedeiros são extremamente promíscuos (nodulam com ampla variedade de estirpes) e outros são mais específicos. A ocorrência de estirpes de rizóbio de crescimento rápido e lento em uma mesma espécie de planta foi observada por Moreira et al. (1993) em 14 gêneros de leguminosas tropicais e em outras leguminosas tropicais por outros autores (Lim e Ng, 1997; Padmanabham, Hirtz e Broughten, 1990). Esta especificidade se estende também, além do processo infectivo, à eficiência do processo. Assim, algumas espécies de leguminosas produzem melhor com uma espécie de rizóbio em particular.

✓ A contribuição da fixação biológica de nitrogênio à economia da produção de leguminosas é muito significativa, uma vez que as aplicações de fertilizantes nitrogenados podem ser, em grande parte, reduzidas e até dispensadas, como no caso da soja, através da inoculação de estirpes de rizóbio eficientes na fixação (Dobereiner e Duque, 1980). Além dos benefícios econômicos, a redução na aplicação de fertilizantes aumenta a qualidade ambiental da produção agrícola, contribuindo para a sustentabilidade na agricultura.

A eficiência dos microrganismos diazotróficos em fixar nitrogênio e a capacidade destes de sobreviver no solo e formar nódulos dependem, além dos fatores genéticos inerentes aos simbioses, da interação destes com o sistema. Nem sempre organismos fixadores selecionados em laboratório e casa de vegetação alcançam necessariamente seu máximo potencial no campo devido, entre outros fatores, à baixa competitividade ou falta de adaptação às condições ambientais locais. Torna-se evidente, portanto, a necessidade de avaliar, quantificar e monitorar a diversidade de rizóbios no solo, assim como a extensão

do impacto de práticas agrícolas sobre comunidades naturais destes organismos. A perda desta biodiversidade pode ocasionar a perda de linhagens inoculantes potenciais, assim como a diminuição do potencial de fixação de nitrogênio dos solos, prejudicando o desenvolvimento de práticas de recuperação e conservação de solos.

## **2.2 Taxonomia de rizóbio**

Atualmente, a taxonomia de bactérias é polifásica, isto é, baseia-se em dados fenotípicos, genéticos e filogenéticos dos organismos. Através de modernas técnicas moleculares, especialmente a comparação da sequência de genes do 16sRNA, os taxonomistas concluíram que os rizóbios são claramente polifiléticos, isto é, não há na árvore evolucionária um braço que carregue todos os rizóbios e nenhuma outra bactéria. A tabela 1 apresenta as espécies de rizóbio conhecidas atualmente.

TABELA 1. Rizóbios atualmente conhecidos, estirpe tipo e planta da qual foram isolados.

Espécie de rizóbio	Estirpe representativa	Planta hospedeira	Referência
<b>Rizóbios de crescimento rápido (CR)<sup>*</sup> que nodulam raízes</b>			
<i>Rhizobium</i>			
<i>Rhizobium leguminosarum</i>			Frank, 1889; Jordan, 1984
biovar phaseoli	ATCC 14482	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frank, 1889; Jordan, 1984
biovar viciae	ATCC 10004	<i>Pisum sativum</i>	Frank, 1889; Jordan, 1984
biovar trifolii	ATCC 14480	<i>Trifolium pratense</i>	Frank, 1889; Jordan, 1984
<i>Rhizobium etli</i>	CFN 42	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Segovia et al., 1993
<i>Rhizobium gallicum</i>			
biovar gallicum	R602sp	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
biovar phaseoli	PhD12	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
<i>Rhizobium mongolense</i>	USDA 1844	<i>Medicago ruthenica</i>	van Berkum et al., 1998
<i>Rhizobium tropici</i> tipo IIA	CFN 299	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Martínez-romero et al., 1991
<i>Rhizobium tropici</i> tipo IIB	CIAT 899	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Martínez-romero et al., 1991
<i>Rhizobium hainanense</i>	I66	<i>Desmodium sinuatum</i>	Chen et al., 1997
<i>Rhizobium galegae</i>			
biovar orientalis	HAMBI 540	<i>Galega orientalis</i>	Lindstrom, 1989
biovar officinalis	HAMBI 1141	<i>Galega officinalis</i>	Lindstrom, 1998
<i>Rhizobium giardinii</i>			
biovar giardinii	H152	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
biovar phaseoli	H251	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
<i>Rhizobium huautlense</i>	SO2	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang et al., 1998
<i>Shinorhizobium</i>			
<i>Shinorhizobium meliloti</i>	NZP 4027	<i>Medicago sativa</i>	De Lajudie et al., 1994
<i>Shinorhizobium fredii</i>			Dangeard, 1926; Jordan, 1984
quimovar fredii	USDA 205	<i>Glycine max</i>	Scholla e Elkan, 1984
quimovar siensis	USDA 201	<i>Glycine max</i>	Scholla e Elkan, 1984
<i>Shinorhizobium medicae</i>	A 321	<i>Medicago truncatula</i>	Scholla e Elkan, 1984
<i>Shinorhizobium saheli</i>	ORS 609	<i>Sesbania pachycarpa</i>	Rome et al., 1996
<i>Shinorhizobium teranga</i>			De Lajudie et al., 1994
biovar acaciae	ORS 1009	<i>Acacia laeta</i>	De Lajudie et al., 1994
biovar sesbaniae	ORS 51	<i>Sesbania rostrata</i>	Loquin et al., 1997
			Boivin et al., 1997
<b>Rizóbios de crescimento muito (CMR) rápido que nodulam raízes</b>			
<i>Allorhizobium</i>			
<i>Allorhizobium undicola</i>	ORS 992	<i>Neptunia natans</i>	De Lajudie et al., 1998
			De Lajudie et al., 1998
<b>Rizóbios de crescimento rápido (CR) ou intermediário (CI) que nodulam raízes</b>			
<i>Mezorhizobium</i>			
<i>Mezorhizobium ciceri</i>	UPM-Ca7	<i>Cicer arietinum</i>	Jarvis et al., 1997
<i>Mezorhizobium kuakuii</i>	CCBAU 2609	<i>Astragalus sinicus</i>	Nour et al., 1994
<i>Mezorhizobium loti</i>	NZP 2213	<i>Lotus corniculatus</i>	Chen et al., 1991
<i>M. mediterraneum</i>	UPM-Ca36	<i>Cicer arietinum</i>	Jarvis, Pankhurst e Patel, 1982
<i>M. tianshanensi</i>	A-1BS	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Nour et al., 1995
			Chen et al., 1995
<b>Rizóbios de crescimento lento (CL) a muito lento (CML) que nodulam raízes</b>			
<i>Bradyrhizobium</i>			
<i>Bradyrhizobium elkani</i>	USDA 76	<i>Glycine max</i>	Jordan, 1982
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ATCC 10324	<i>Glycine max</i>	Kuykendall et al., 1992
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	2281	<i>Glycine max</i>	Kirchner, 1895; Jordan, 1982
			Xu et al., 1995
<b>Rizóbios de crescimento rápido (CR) e intermediário (CI) que nodulam caule</b>			
<i>Azorhizobium</i>			
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	ORS 571	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus et al., 1988
			Dreyfus et al., 1988

\* Classificação de crescimento de acordo com o número de dias para aparecimento de colônias isoladas em meio YMA (Vincent, 1970): CMR (1), CR (2 a 3), CI (4 a 5), CL (6 a 10), CML (mais que 10).

Para evitar a descrição inadequada de bactérias, o Sub-Comitê Internacional para taxonomia de *Rhizobium* e *Agrobacterium* propôs, em 1991, padrões mínimos para validar a publicação de novas taxa de bactérias (Graham et al., 1991): De acordo com o Sub-Comitê, o rizóbio deve ser isolado de várias regiões geográficas, além de se incluírem estirpes tipo e representativas do gênero e espécie relacionada com o isolado nos estudos fenotípicos, genéticos e simbióticos (polifásicos). Os métodos fenotípicos incluem as técnicas baseadas na expressão do DNA, ou seja, técnicas morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que coletam informações sobre a composição química total ou parcial das células para classificar a bactéria. Compreendem análise de ácidos graxos, análise das proteínas celulares totais, eletroforese de enzimas multiloculares, espectrometria de massa por pirólise (PyMS), além das análises fenotípicas clássicas que dão informações sobre a célula e a colônia. Os testes genéticos compreendem as técnicas de hibridação DNA-DNA, polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição enzimática (RFLP), eletroforese em campo pulsante, “fingerprint” com primers não específicos (RAPD), amplificação baseada em elementos repetitivos, polimorfismo do tamanho de fragmentos amplificados (AFLP), RFLP de fragmentos dos genes do rRNA amplificados e de outros genes específicos, tais como *nod*, *nif*, etc, e composição de bases do DNA. Os estudos simbióticos compreendem testes de eficiência simbiótica em plantas hospedeiras de espécies de rizóbios já descritas.

Ferramentas para caracterização molecular são essenciais para a classificação de microrganismos, particularmente a análise da sequência de ácidos nucleicos e hibridação DNA:DNA. Entretanto, muitos laboratórios de microbiologia não têm acesso à infraestrutura para as análises moleculares e alguns métodos são caros e consomem tempo quando aplicados para um grande número de isolados. Portanto, para uma primeira identificação e classificação de rizóbios são requeridas análises mais rápidas e baratas. Graham (1976) apontou



três características que podem ser usadas com sucesso na classificação de rizóbio: taxa de crescimento, pH na reação do meio YMA e tipo de flagelo, que pelo menos para classificação do gênero ainda é útil nos dias atuais (Tabela 1).

A expressão do genoma microbiano resulta na síntese de cerca de 2000 proteínas moleculares que constituem a célula microbiana. Estas moléculas formam uma fonte de informação para a caracterização inicial dos microrganismos. Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para separação e caracterização destas proteínas, e uma destas, a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), é uma ferramenta confiável na sistemática microbiana e tem sido usada para separar estirpes e até espécies de rizóbio (de Bruijn et al., 1998). A eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas celulares pode produzir padrões de até trinta bandas, e apesar de não ser comparável em poder de resolução ao método de separação bidimensional, pode ser útil para distinguir organismos e como levantamento de número elevado de isolados de modo que técnicas genéticas possam ser aplicadas a representantes destes grupos. Tem sido encontrada boa correlação entre os resultados de hibridação DNA-DNA e PAGE em um grande número de gêneros de bactérias (Jackman, 1985). Deste modo, a análise de proteína total tem sido empregada em estudos de diversidade, taxonomia e ecologia de rizóbio. Moreira et al. (1993), através do perfil de proteínas totais de 171 isolados de rizóbio obtidos de diferentes leguminosas florestais da Amazônia e Mata Atlântica, observaram grande diversidade entre os padrões destas proteínas e que a maior diversidade estava entre os isolados de crescimento rápido do que os de crescimento lento. Também Dupuy (1994) analisou 84 isolados de *Bradyrhizobium* por SDS-PAGE para determinar a posição taxonômica destes organismos e a relação entre isolados obtidos na superfície e em profundidade no solo e encontrou alta diversidade por esta análise fenotípica. A maioria dos isolados foi distribuída em 8 grupos

eletroforéticos que continham estirpes representativas de *B. japonicum*, *B. elkanii* e *Bradyrhizobium* sp.

### 2.3 Diversidade de rizóbio

A diversidade de rizóbios é ainda limitada devido à falta de conhecimentos sobre os microssimbiontes da grande maioria das espécies leguminosas. A capacidade das espécies leguminosas de formar relações simbióticas efetivas com rizóbio é desconhecida em cerca de 77% das espécies (11200 espécies) desta família, conseqüentemente, as características das espécies de rizóbio também são pouco conhecidas (Moreira et al., 2000). Entretanto, nas últimas décadas, têm sido extremamente importantes os estudos que revelam uma grande diversidade de rizóbio até então desconhecida em coleções de cultura (Moreira et al., 1993; Dupuy et al., 1994).

Nos últimos anos, técnicas baseadas na análise de genes do 16S rRNA têm sido amplamente usadas na detecção, identificação, classificação e filogenia de bactérias, assim como de outros organismos vivos. A amplificação direta por PCR do 16S rDNA de amostras ambientais tem possibilitado o estudo da diversidade microbiana sem o cultivo dos organismos (Giovannoni et al., 1990). Woese (1987) iniciou o uso de genes ribossomais como “relógios moleculares” ou “cronômetros”, revolucionando a taxonomia bacteriana, de modo a baseá-la em características filogenéticas. Um relógio molecular ideal seria aquele que acumula trocas aleatórias de nucleotídeos a uma taxa constante, sendo o número de alterações usado para medir o tempo entre o ancestral comum mais recente e organismos ou genes. Os genes ribossomais se tornaram tão populares pelo fato de ocorrerem em todos organismos e possuírem a mesma função em todos eles, além disto, têm alto grau de conservação e grande número de cópias. O desenvolvimento da rápida técnica de amplificação do DNA (PCR- reação de

polimerização em cadeia) e técnicas de sequenciamento tem consolidado o papel dos genes ribossomais na filogenia e, atualmente, milhares de sequências do 16S rRNA estão disponíveis em banco de dados. Entre os genes ribossomais, o 16S rDNA se tornou mais usado pelo seu menor tamanho (aproximadamente 1500 pares de bases).

Várias técnicas baseadas na amplificação de partes do DNA, aleatória ou específica, foram desenvolvidas com a descoberta do PCR e permitem uma melhor discriminação de isolados de rizóbio em diferentes ambientes. Como estas técnicas demandam equipamentos sofisticados e recursos financeiros elevados, elas são geralmente aplicadas a representantes obtidos de agrupamentos iniciais por características fenotípicas.

De modo geral, os estudos relacionados à diversidade de rizóbio utilizam métodos fenotípicos, genéticos e simbióticos.

A tabela 2 apresenta os métodos de caracterização genética e fenotípica atualmente encontrados na literatura, e a tabela 3 mostra os estudos de diversidade de rizóbio e as técnicas utilizadas por diversos autores. A tabela 4 apresenta as técnicas utilizadas para descrição das espécies e gêneros de rizóbio conhecidas atualmente.

**TABELA 2. Métodos de caracterização genética e morfológica de rizóbio encontrados atualmente na literatura.**

<b>Caracterização genética</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- perfis de plasmídeos</li> <li>- polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP)</li> <li>- polimorfismo do comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP)</li> <li>- PCR de unidades repetitivas – (rep-PCR, box-PCR, eric-PCR)</li> <li>- perfil do DNA amplificado aleatoriamente (RAPD)</li> <li>- tipagem de fagos</li> <li>- eletroforese em campo pulsante (PFGE) de fragmentos de DNA gerados por endonucleases de restrição de corte raro</li> <li>- análise do DNA ribossomal amplificado e cortado com enzimas de restrição (ARDRA) e de outros genes</li> <li>- composição de bases do DNA (conteúdo de C + G)</li> <li>- sequenciamento parcial ou total de RNA ribossômico (16S rRNA ou 23 S rRNA) e do espaço intergênico</li> <li>- hibridação RNA - DNA</li> <li>- hibridação DNA - DNA</li> </ul>
<b>Caracterização simbiótica</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- infecção e efetividade em hospedeiros das espécies de rizóbio conhecidas</li> </ul>
<b>Caracterização fenotípica</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- morfológica: tipo de flagelação, forma e tamanho das células</li> <li>- cultural: taxa de crescimento e modificação do pH do meio de cultura, aspectos das colônias, produção de exopolissacarídeos</li> <li>- utilização de carboidratos e aminoácidos como fontes únicas</li> <li>- expressão da hidrogenase</li> <li>- presença de nitrato redutase dissimilatória</li> <li>- perfil de resistência a antibióticos</li> <li>- produção de melanina</li> <li>- produção de rizobiotoxina</li> <li>- vias metabólicas</li> <li>- tolerância a sais</li> <li>- requisição de vitaminas</li> <li>- faixa de pH para crescimento</li> <li>- reação em “LitmusMilk”</li> <li>- composição de exopolissacarídeos</li> <li>- eletroforese de proteína total em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</li> <li>- eletroforese de enzimas multiloculares (MLEE)</li> <li>- lipopolissacarídeos extracelulares</li> <li>- análise de ésteris de ácidos graxos (FAME)</li> <li>- serologia</li> <li>- Espectrometria de massa por pirólise (PyMS)</li> </ul>

**TABELA 3. Referências de alguns estudos de diversidade de rizóbio e as respectivas técnicas empregadas.**

<b>Referência</b>	<b>Métodos fenotípicos</b>
Parker e Lunk, 2000; Herrera-Cervera et al., 1999	Eletroforese de enzimas multiloculares (MLEE)
So; Ladha e Young, 1994; Jarvis et al., 1996	FAME
Moreira et al., 1993; de Ladjudie et al., 1994; Dupuy, 1994	Análise da proteína total da célula (SDS-PAGE)
Martins et al., 1997	Morfologia da colônia
Zerhari et al., 2000	Tolerância a sais e pH para crescimento
McInroy et al., 1999	Biolog
Coutinho et al., 1999a	Espectometria de massa por pirólise (PyMS)
<b>Métodos genotípicos</b>	
Corich et al., 1991; Sobral et al., 1991	Eletroforese em campo pulsante (PFGE)
Rinaudo et al., 1991; Laguerre et al., 1993	Hibridação DNA-DNA
Young e Wexler, 1988; Kaijalainen e Lindstrom, 1989; Urtz e Elkan, 1996; Mhamdi et al., 1999	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP)
Martínez-Romero et al., 1991; Young et al., 1991; Willems e Collins, 1993; Tesfaye e Holl, 1998	Sequenciamento dos genes do 16S rDNA
Laguerre et al., 1994; Paffetti et al., 1996; Nick et al., 1998; Vinuesa et al., 1998)	Polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA amplificados por PCR (PCR-RFLP ou ARDRA)
de Bruijn, 1992; Nick e Lindstrom, 1994; Versalovic et al., 1994	PCR das sequências de DNA repetitivas (rep-PCR usando primers REP, ERIC e BOX)
Nour et al., 1995; Laguerre et al., 1996; Gurtler e Stanisich, 1996	Polimorfismo do DNA do espaço intergênico ribossomal (IGS)
Harrison et al., 1992; Richardson et al., 1995; Selenska-Pobell et al., 1996	PCR com primers randômicos (RAPD)
Hartmann e Amarger, 1991; Kosier, Rubler e Simon, 1993; Rice et al., 1994	Tipagem da sequência dos elementos de inserção (IS)
Oliveira et al., 1999	DGGE
Mhamdi et al., 1999	Perfil de plasmídeos
Doignon-Bourcier et al., 2000	AFLP

TABELA 4. Técnicas genéticas e fenotípicas utilizadas para descrição de espécies e gêneros de rizóbios conhecidos atualmente

Gênero/espécie	Técnicas empregadas
<i>Rhizobium</i> Frank, 1889; Jordan, 1984	Utilização de fontes de N, faixa de temperatura para crescimento, tipo de flagelo, perfil de plasmídeo, reação em meio "Litmus Milk", requerimento de vitaminas, atividade da nitrogenase, tolerância a NaCl, composição de bases do DNA, infecção em plantas
<i>R. etli</i> Segovia, Young e Martínez-Romero, 1993	MLEE, hibridação DNA-DNA, sequenciamento do 16S rDNA, fontes de C e N, resistência a antibióticos, temperatura para crescimento, tolerância a NaCl, morfologia da colônia, faixa de pH para crescimento
<i>R. mongolense</i> van Berkum et al., 1998	MLEE, hibridação DNA-DNA, infecção em plantas, resistência a antibióticos, fontes de C e N, tipo de flagelo, sequenciamento do 16S rDNA
<i>R. gallicum</i> Amarger, Macheret e Laguerre, 1997	Sequenciamento do 16S rDNA, resistência a antibióticos, fontes de C e N, faixa de pH para crescimento, infecção em plantas
<i>R. hainanense</i> Chen et al., 1997	Hibridação DNA-DNA, sequenciamento do 16S rDNA, infecção em plantas
<i>R. huakuii</i> Chen et al., 1991	SDS-PAGE, composição de bases do DNA, hibridação DNA-DNA, fontes de C e N, requerimento de vitaminas, faixa de pH e temperatura para crescimento, crescimento em meio peptona, tipo de flagelo, resistência a antibióticos, tolerância a NaCl, reação em meio "Litmus Milk"
<i>R. huautlense</i> Wang et al., 1998	PCR-RFLP do 16S rDNA, sequenciamento do 16S rDNA, hibridação DNA-DNA, perfil de plasmídeo, MLEE, resistência a antibióticos, fontes de C e N, infecção em plantas, tolerância a NaCl
<i>R. etli</i> <i>bv.</i> <i>mimose</i> Wang et al., 1999b	Infecção em plantas, MLEE, perfil de plasmídeo e caracterização dos plasmídeos simbióticos, "fingerprint" e hibridização DNA-DNA, sequenciamento de genes NifH, RFLP do 16S rDNA
<i>R. fredii</i> Scholla e Elkan, 1984	Sequenciamento do 16S rDNA
<i>R. ciceri</i> Nour et al., 1994	Hibridação DNA-DNA, composição do DNA, RFLP do ITS do 16S rDNA, sequenciamento do 16S rDNA, fontes de carbono (Biolog)

Continua...

... Continuação

Gênero/espécie	Técnicas empregadas
<i>R. tianshanense</i> Chen et al., 1995	Composição de bases do DNA, hibridação DNA-DNA, sequenciamento do 16S rDNA, fontes de C e N, faixa de pH e temperatura para crescimento, tipo de flagelo, resistência a antibióticos, tolerância a NaCl, reação em meio "Litmus Milk", perfil de plasmídeos, infecção em plantas
<i>Sinorhizobium saheli</i> , De Lajudie et al., 1994 <i>Sinorhizobium teranga</i> , De Lajudie et al., 1994 <i>Sinorhizobium meliloti</i> Dangeard, 1926; Jordan, 1984	Morfologia e dimensão da célula, tipo de flagelo, SDS-PAGE, infecção em plantas, hibridação DNA-DNA e DNA-RNA, composição do DNA, fontes de C, sequenciamento do 16S rDNA
<i>S. medicae</i> Rome et al., 1996	Sequenciamento do 16S rDNA, infecção em plantas, faixa de pH e temperatura para crescimento, resistência a antibióticos, tolerância a NaCl, fontes de C
<i>Mesorhizobium amorphae</i> Wang et al., 1999a	RFLP do 16S rDNA, hibridização DNA-DNA, sequenciamento do 16S rDNA, MLEE, perfil de plasmídeos, infecção em plantas, resistência a antibióticos, tolerância a NaCl, fontes de C e N, reação em meio "Litmus Milk", morfologia e dimensão da célula
<i>Allorhizobium undicola</i> De Lajudie et al., 1998	Morfologia e dimensão da célula, infecção em plantas, SDS-PAGE, RFLP do ITS do 16S rDNA, composição do DNA, hibridação DNA-DNA, sequenciamento do 16S rDNA, fontes de C (Biolog)
<i>Azorhizobium caulinodans</i> Dreyfus, Garcia e Gillis, 1988	Tipo de flagelo, faixa de temperatura para crescimento, tolerância a NaCl, fontes de C e N, infecção em plantas, hibridação DNA-RNA, atividade da nitrogenase, composição do DNA, SDS-PAGE
<i>Bradyrhizobium</i> Jordan, 1982	Composição do DNA, SDS-PAGE, hibridação DNA-DNA, serologia, composição do exopolissacarídeo, fontes de N, resistência a antibióticos
<i>B. elkani</i> Kuykendall et al., 1992	Southern Blot
<i>B. liaoningense</i> Xu et al., 1995	Hibridação DNA-DNA, sequenciamento do 16S rDNA, infecção em plantas, resistência a antibióticos e corantes, tolerância a NaCl, fontes de C e N, reação em meio "Litmus Milk", requerimento de vitaminas e fatores de crescimento, faixa de temperatura e pH para crescimento, serologia, composição do DNA, conteúdo de N e C nos componentes celulares

## 2.4 Relações simbióticas

Trabalhos pioneiros sobre a diversidade na nodulação de leguminosas revelaram que rizóbios de crescimento rápido associavam-se preferencialmente a leguminosas de clima temperado e que rizóbios de crescimento lento, e mais promíscuos, associavam-se a leguminosas de clima tropical (Norris, 1969).

Odee et al. (1997) demonstraram que 480 rizóbios isolados de nódulos de leguminosas herbáceas e arbóreas crescidas em solos de doze diferentes regiões do Quênia apresentaram alta diversidade de características culturais e resistência a antibióticos. Os isolados de crescimento muito rápido, rápido e intermediário foram agrupados com *Rhizobium* spp., e isolados de crescimento intermediário, lento e muito lento foram agrupados com *Bradyrhizobium* spp. Parker e Lunk (2000), através do padrão eletroforético de enzimas multiloculares e sequenciamento de região 23sRNA, encontraram alta diversidade entre 33 isolados do Panamá, com alta similaridade com *B. japonicum*.

Samba et al. (1999), estudando a diversidade de rizóbios que nodulam crotalaria de diferentes regiões do Senegal, isolaram rizóbios de crescimento rápido e lento, e após testarem a eficiência destes isolados em vários hospedeiros, observaram que os de crescimento lento nodularam uma ampla gama de hospedeiros, enquanto os de crescimento rápido nodularam somente uma espécie. A análise do perfil de proteínas mostrou que as estirpes de crescimento lento foram similares a *B. japonicum* e as de crescimento rápido não foram similares a nenhuma estirpe referência, constituindo um novo grupo de rizóbio.

As características simbióticas e o estudo da ecologia de populações indígenas de *R. loti* no Uruguai (Baraibar et al, 1999) mostraram grande diversidade entre as estirpes e a alta tolerância destas estirpes ao pH ácido do meio de cultura. Estirpes de *R. loti* estavam presentes em todos solos estudados



,com sua população variando de ano para ano e dentro de cada solo. Todos os isolados nodularam efetivamente *Lotus corniculatus*. O trabalho demonstrou a importância da seleção destas estirpes para serem incluídas nos estudos de estirpes para inoculantes.

. Wang, Martínez-Romero e Martínez-Romero (1999), analisando 150 isolados de *Leucena leucocephala*, mostraram as diferenças de populações de rizóbio em solos cultivados e não cultivados e também do cultivar de planta utilizada como planta isca. A importância do número de plantas iscas na captura de *R. leguminosarum* biovar *viciae* foi demonstrada por Handley et al. (1997), os quais sugeriram a utilização de grande número de plantas iscas e poucos nódulos por planta..

Diversos estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de avaliar e quantificar os efeitos de sistemas agrícolas como plantio direto, plantio convencional e rotação de culturas, entre outros, além do impacto de atividades de mineração e metais pesados sobre a comunidade microbiana do solo. Métodos como biomassa microbiana e contagem total de microrganismos em placa são os mais utilizados. No entanto, recentemente, as inovações das técnicas moleculares vêm também sendo empregadas na análise da diversidade microbiana em ambientes naturais e perturbados. Torsvik et al. (1998) analisaram a comunidade microbiana total, incluindo os organismos cultivados e os não cultivados, usando a extração de DNA de amostras de solo e combinação de diferentes métodos moleculares. Os autores demonstraram que o manejo agrícola pode levar a profundas alterações na estrutura da comunidade e uma redução da diversidade bacteriana.

Estudos sobre o efeito de práticas agrícolas específicas sobre a população de rizóbios no ambiente são escassos na literatura. Oliveira et al. (1999) analisaram a diversidade genética de *R. tropici* e *R. leguminosarum* por DGGE em amostras de solo sob diferentes práticas de agricultura. A diversidade de *R.*

*leguminosarum* e *R. tropici* foi maior em solos cultivados com feijão quando comparado com pastagem, devido, provavelmente, à seleção positiva pelo hospedeiro. Os dados permitiram concluir que as diferentes práticas agrícolas analisadas (pastagem, plantio direto e plantio convencional com e sem aplicação de inseticida) influenciaram a ocorrência de linhagens particulares, porém sem efeitos significativos na diversidade geral destes organismos. Coutinho et al. (1999b) também observaram que diferentes práticas de manejo do solo produziram alterações visíveis no perfil das populações de rizóbio nas amostras ambientais. Os resultados observados sugerem que as amostras derivadas de solo sob pastagem, não cultivado com leguminosas, apresentaram diversidade de rizóbios significativamente maior do que aquelas sob o cultivo de soja. Uma grande diversidade de rizóbios de caupi coletados em diferentes condições ambientais do nordeste do Brasil, foi também encontrada por Martins et al. (1997) estudando a morfologia das colônias e a taxa de crescimento dos isolados.

Portanto, os estudos sobre diversidade de rizóbio têm isolado grande número de estirpes que estão sendo armazenados em coleções de culturas para estudos genéticos e classificação de novas espécies. Mas frente à enorme diversidade que tem sido encontrada entre os isolados, os trabalhos estão apenas no início, principalmente nas regiões tropicais.

## **2.5 Fatores que influenciam a população de rizóbio**

Estirpes de rizóbio diferem quanto à tolerância à acidez do solo. Vários autores têm encontrado maior tolerância à acidez do *R. leguminosarum* biovar trifolli em relação ao *R. leguminosarum* biovar viciae e *S. meliloti* (Rice, Penny e Nyborg, 1977; Lowendorf, 1980). Porém, entre todos os rizóbios de crescimento rápido, o *R. tropici* parece ser a espécie mais tolerante à acidez do

solo (Graham et al., 1994). Foi sugerido que a capacidade do *Bradyrhizobium* de produzir uma reação alcalina em meio de cultura pode conferir uma capacidade de sobreviver em solos ácidos ricos em alumínio (Karanja e Wood, 1988). Entretanto, a capacidade de produzir álcali está em função do meio de cultura. O efeito da calagem sobre a diversidade de rizóbio ainda não está claro, mas é claro que em condições de grande acidez do solo, o número de espécies e estirpes é reduzido.

A sobrevivência e efetividade de populações de rizóbio são dependentes dos níveis de nutrientes no solo, sendo o fósforo importante dentro deste contexto. Rizóbios diferem muito quanto ao requerimento externo, a capacidade de armazenamento e utilização de P (Beck e Munns, 1985). A capacidade do rizóbio em fixar  $N_2$  é menor em baixo teor de fósforo no solo, situação encontrada em solos tropicais ácidos (Singleton et al., 1985), devido aos efeitos negativos na nodulação e funcionamento dos nódulos.

Um outro fator importante influenciando populações de rizóbio no solo seria as plantas hospedeiras encontradas na área, já que o funcionamento de uma simbiose efetiva é dependente dos fatores genéticos da planta e bactéria. Vários genes de leguminosas que afetam a nodulação e fixação já foram identificados. Inoculações prévias e cultivo contínuo com uma leguminosa conferem à população indígena uma vantagem em número e adaptação ambiental com estirpes introduzidas (May e Bohloul, 1983).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp.nov. and *Rhizobium giardinii* sp.nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, n.4, p.996-1006, Oct. 1997.
- ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.4016-4021, 1995.
- BARAIBAR, A.; FRIONI, L.; GUEDES, M.E.; LJUNGGREN, H. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.6, p.1011-1017, Jun. 1999.
- BECK, D.P.; MUNNS, D.N. Effect of calcium on the phosphorus nutrition of *Rhizobium meliloti*. **Soil Science of Society American Proceedings**, v.49, p.334-337, 1985.
- BERKUM, P. van; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, A.; EARDLY, B.D. *Rhizobium mongolense* sp.nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.48, p.13-22, 1998.
- BOIVIN, C.; NDOYE, I.; LORTET, G.; NDIAYE, P.; DE LAJUDIE; DREYFUS, B. The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbanie* can form stem nodules on *Sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.3, p.1040-1047, Mar. 1997.
- CHEN, W.; WANG, E.; WANG, S.; LI, S.; LI, Y.; CHEN, X.; LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp.nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an Arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n.1, p.153-159, Jan. 1995.
- CHEN, W.X.; LI, G.S.; QI, Y.L.; WANG, E.T.; YUAN, H.L.; LI, J.L. *Rhizobium huakuii* sp.nov. isolated from root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, n.2, p.275-280, Apr. 1991.

- CHEN, W.X.; TAN, Z.Y.; GAO, J.L.; LI, Y.; WANG, E.T. *Rhizobium hainanense* sp.nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, n.3, p.870-873, July 1997.
- CORICH, V.; GIACOMINI, A.; OLLERO, F.J.; SQUARTINI, A.; NUTI, M.F. Pulsed-field electrophoresis in counter-clamped homogeneous electric fields (CHEF) for fingerprinting of *Rhizobium* spp. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.83, p.193-198, 1991.
- COUTINHO, H.L.C.; KAY, H.E.; MANFIO, G.P.; NEVES, M.C.P.; RIBEIRO, J.R.A.; RUMJANEK, N.G.; BERINGER, J.E. Molecular evidence for shifts in polysaccharide composition associated with adaptation of soybean *Bradyrhizobium* strains to the Brazilian Cerrado soils. **Environmental Microbiology**, v.1, n.5, p.401-408, 1999a.
- COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; LOVATO, A.; MAIA, A.H.N.; MANFIO, G.P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.391, n.1, p.1-9, 1999b.
- DANGEARD, P.A. **Recherches sur les tubercles radicaux dees légumineuses**. Paris, 1926. 270p. (Le Botaniste, Series 16)
- DE BRUIJN, DAVEY, M.E.; McSPADDEN-GARDENER, B.; MILLCAMPS, A.; RADEMAKER, J.L.W.; RAGATZ, M.L.; SCHULTZ, P.; STRUFFI, P.; STOLTZFUS, J. Molecular approaches in microbial ecology to assess genomic diversity and stress-induced gene expression in plant-associated diazotrophs. In: ELMERICH, C. et al. (eds). **Biological nitrogen fixation for the 21st Century**. Netherlands: Kluwer, 1998. p.571-576.
- DE 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**, Washington, v.58, n.7, p.2180-2187, July 1992.
- DE LAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen.nov., sp.nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p.1277-1290, 1998.

- DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb.nov., *Sinorhizobium saheli* sp.nov., and *Sinorhizobium teranga* sp.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n.4, p.715-733, Oct. 1994.
- DÖBEREINER, J.; DUQUE, F.F. Contribuição da pesquisa em fixação biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. **Revista de Economia Rural**, Brasília, v.18, n.3, p.447-460, Jul./Set. 1980.
- DOIGNON-BOURCIER, F.; COOPMAN, R.; HOSTE, B.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M. AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.23, p.137-147, Apr. 2000.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen.nov., sp.nov., a stem-nodulating nitrogen –fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 38, n.1, p.89-98, Jan. 1988.
- DUPUY, N.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDENBRUAENE, I. Phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobia* nodulating the Leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, n.3, p.461-473, July 1994.
- FISHER, R.F.; LONG, S. *Rhizobium*-plant signal exchange. **Nature**, London, v. 357, n.6380, p.655-660, June 1992.
- FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Ber. Deut. Bot. Ges.**, v.7, p.332-346, 1889.
- GILLER, K.E.; BEARE, M.H.; LAVELLE, P.; IZAC, A.M.N.; SWIFT, M.J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Geva, v.6, n.1, p. 3-16, July 1997.
- GIOVANNONI, S.J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L.; FIELD, K.G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature**, London, v.345, p. 60-63, 1990.
- GRAHAM, P.H. Identification and classification of root nodule bacteria. In: NUTMAN, P.S. (ed.) **Symbiotic nitrogen fixation in plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. p.99-112.

- GRAHAM, P.H.; SADOVISCKY, M.J.; KEYSER, H.H.; BARNET, Y.M.; BRADLEY, R.S.; COOPER, J.E.; DE LEY, D.J.; JARVIS, B.D.W.; ROSLYCKY, E.B.; STRIHDOM, B.W.; YOUNG, J.P.W. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.582-587, 1991.
- GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERREY, M.L. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies of the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.40, p.198-207, 1994.
- GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, Cambridge, v.142, n.1, p.3-16, Jan. 1996.
- HANDLEY, B.A.; HEDGES, A.J.; BERINGER, J.E. Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n.2, p.241-249, Feb. 1997.
- HARRISON, S.P.; MYTTON, L.R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, n.12, p.1009-1015, Dec. 1992.
- HARTMANN, A.; AMARGER, N. Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting, and insertion sequence typing. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.37, n.7, p.600-608, July 1991.
- HERRERA-CERVERA, J.A.; CABALLERO-MELLADO, J.; LAGUERRE, G.; TICHY, H.V.; REQUENA, N.; AMARGER, N.; MARTINEZ-ROMERO, E.; OLIVARES, J.; SANJUAN, J. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.30, n.1, p.87-97, 1999.
- JACKMAN, P.J.H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (eds). **Chemical methods in bacterial systematics**. London: Academic Press, 1985. p.119-129.

- JARVIS, B.D.W.; BERKUM, P.van; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *R. huakuii*, *R. ciceri*, *R. mediterraneum*, and *R. tianshanense* to *Mesorhizobium* gen.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, n.3, p.895-898, July 1997.
- JARVIS, B.D.W.; PANKHURST; PATEL, J.J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.32, p.378-380, 1982.
- JARVIS, B.D.W.; SIVAKUMARAN, S.; TIGHE, S.W.; GILLIS, M. Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. **Plant and Soil**, The Hague, v.184, n.1, p.143-158, 1996.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen .nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from Leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 32, n.1, p.136-139, Jan. 1982.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae, p. 234-244. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p.234-244.
- KAJALAINEN, S.; LINDSTRÖM, K. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Rhizobium galegae* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171, p.5561-5566, 1989.
- KARANJA, N.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris*) in Kenya: infectiveness in tolerance of acidity and aluminium. **Plant and Soil**, The Hague, v.112, p.7-13, 1988.
- KIRCHNER, O. Die Wurzelknöllchen der Sojabohne. **Beitraege zur Biologie der Pflanzen**, v.7, p.213-224, 1896.
- KOSIER, B.; PÜHLER, A.; SIMON, R. Monitoring the diversity of *Rhizobium meliloti* field and microcosm isolates with a novel rapid genotyping method using insertion elements. **Molecular Ecology**, Oxford, v.2, p.35-46, 1993.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp.nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, n.6, p.501-505, June 1992.



- LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.1, p.56-63, Jan. 1994.
- LAGUERRE, G.; GENIAUX, E.; MAZURIER, S.I.; CASARTELLI, R.R.; AMARGER, N. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, bv. trifolii, and bv. phaseoli revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, n.4, p.412-419, Apr. 1993.
- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; 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**, Washington, v.62, n.6, p.2029-2036, June 1996.
- LIM, G.; NG, H.L. Root nodules of some tropical legumes in Singapore. **Plant and Soil**, The Hague, v.46, n.2, p.317-327, Feb. 1977.
- LINDSTRÖM, K. Dados não publicados. 1998.
- LINDSTRÖM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.39, p. 365-367, 1989.
- LOWENDORF, H.S. Factors affecting survival of *Rhizobium* in soil. **Advances in Microbial Ecology**, v.4, p.87-123, 1980.
- LORQUIN, J.; LORTET, G.; FERRO, M.; MEAR, N.; PROMÉ, J.C.; BOIVIN, C. *Sinorhizobium teranga* bv. acaciae ORS1073 and *Rhizobium* sp. strain ORS1001, two distantly related Acacia-nodulating strains produce similar Nod factors that are O carbamoylated, N methylated, and mainly sulfated. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.179, p.3079-3083, 1997.
- MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, n.3, p.417-426, July. 1991.
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east Region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.1005-1010, May/June 1997.

- MAY, S.W.; BOHLOOL, B.B. Competition among *Rhizobium leguminosarum* strains for nodulating of lentils (*Lens esculenta*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.45, p.960-965, 1983.
- McINROY, S.G.; CAMPBELL, C.D.; HAUKKA, K.E.; ODEE, D.W.; SPRENT, J.I.; WANG, W.J.; YOUNG, J.P.W.; SUTHERLAND, J.M. Characterization of rhizobia from African acacias and other tropical woody legumes using Biolog (TM) and partial 16S rRNA sequencing. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.170, p.111-117, Jan. 1999.
- MHAMDI, R.; JEBARA, M.; AOUANI, M.E.; GHRIR, R.; MARS, M. Genotypic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.28, n.3, p.313-320, Jan. 1999.
- MOREIRA, F.M.S. Biodiversity of rhizobia from a wide range of forest Leguminosae species in Brazil. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 181-182.
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.16, p. 135-146, 1993.
- NICK, G.; LINDSTRÖM, K. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomic DNA of *Rhizobium galegae* strains and to identify the DNA obtained by sonicating the liquid cultures and root nodules. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.17, p. 265-273, 1994.
- NICK, G.; RÄSÄSNEN, L.A.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; LINDSTRÖM, K. The genetic diversity among rhizobia, agrobacteria and *Agrobacterium*-like strains assessed by 16S rDNA PCR-RFLP (submitted). 1998.
- NORRIS, D.O. Observation on the nodulation status of rainforest leguminous species in Amazonic and Guyana. **Tropical Agriculture**, London, v.46, p.145-151, 1969.
- NOUR, S.; CLEYET-MAREL, J.C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M.P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.640-648, 1995.

- NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. *Rhizobium ciceri* sp.nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n.3, p.511-522, July 1994.
- ODEE, D.W.; SUTHERLAND, J.M.; MAKATIANI, E.T.; McINROY, S.G.; SPRENT, J.I. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumines growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v.188, n.1, p.65-75, 1997.
- OLIVEIRA, V.M.; COUTINHO, H.L.C.; SOBRAL, B.W.S.; GUIMARÃES, C.T.; VAN ELSAS, J.D.; MANFIO, G.P. Discrimination of *Rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.28, n.2, p.137-141, Feb. 1999.
- PADMANABHAM, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes: cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, n.1, p.23-28, 1990.
- PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.7, p.2279-2285, July 1996.
- PARKER, M.A.; LUNK, A. Relationships of bradyrhizobia from *Platypodium* and *Machaerium* (Papilionoideae: tribe Dalbergieae) on Barro Colorado Island, Panama. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v.50, p.1179-1186, May 2000.
- RICE, D.J.; SOMASEGARAN, P.; MacGLASHAN, K.; BOHLOOL, B.B. Isolation of insertion sequence ISRLdTAL1145-1 from a *Rhizobium* sp. (*Leucaena diversifolia*) and distribution of homologous sequences identifying cross-inoculation group relationships. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.12, p.4394-4403, Dec. 1994.
- RICE, W.A.; PENNY, D.C.; NYBORG, M. Effects of acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation of alfalfa and red clover. **Canadian Journal of Soil Science**, v.57, p.197-203, 1977.
- RICHARDSON, A.E.; VICCARS, L.A.; WATSON, J.M.; GIBSON, A.H. Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, n.4/5, p.515-524, May 1995.

- RINAUDO, G.; ORENGA, S.; FERNANDEZ, M.P.; MEUGNIER, H.; BARDIN, R. DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem-and root-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.114-120, 1991.
- ROME, S.; FERNANDEZ, M.P.; BRUNEL, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. *Sinorhizobium medicae* sp.nov., isolated from annual *Medicago* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, n.4, p.972-980, Oct. 1996.
- SAMBA, R.T.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; NEYRA, M.; BARRETO, N.M.S.; DREYFUS, B. Diversity of rhizobia nodulating *Crotalaria* spp. from Senegal. **Symbiosis**, Rehovot, v.27, n.3/4, p.259-268, 1999.
- SCHOLLA, M.H.; ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp.nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.34, p.484-486, 1984.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, n.2, p.374-377, Apr. 1993.
- SELENSKA-POBELL, S.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; RADEVA, G.; SQUARTINI, A. Characterization of *Rhizobium* 'hedysari' by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.80, p.517-528, 1996.
- SINGLETON, P.W.; ABDEL-MAGID, H.M.; TAVARES, J.W. Effect of phosphorus on the effectiveness of strains of *Rhizobium japonicum*. **Soil Science Society of American Journal**, v.49, p.613-616, 1985.
- SO, R.B.; LADHA, J.K.; YOUNG, J.P.W. Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* spp. form a cluster with bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.392-403, 1994.
- SOBRAL, B.W.S.; HONEYCUTT, R.J.; ATHERLY, A.G. The genomes of the family Rhizobiaceae: size, stability, and rarely cutting restriction endonucleases. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.704-709, 1991.
- TESFAYE, M.; HOLL, F.B. *Rhizobium* strains that nodulate *Trifolium semipilosum* Fres. are phylogenetically distinct. **Plant and Soil**, The Hague, v.207, n.2, p.147-154, 1998.

- TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.A.; OVREAS, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.64, p.53-62, 1998.
- URTZ, B.E.; ELKAN, G.H. Genetic diversity among *Bradyrhizobium* isolates that effectively nodulate peanut (*Arachis hypogaea*). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, n.11, p.1121-1130, Nov. 1996.
- van BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, T.A.; EARDLY, B.D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.48, p.13-22, 1998.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Molecular and Cellular Biology**, New York, v.5, p.25-40, 1994.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: **International Biological Programme Handbook no.15**. Oxford:Blackwell Scientific Publications, 1970.
- VINUESA, P.; RADEMAKER, J.L.W.; BRUINJN, F.J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR- restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p.2096-2104, June 1998.
- WANG, E.T.; BERKUM, P.van; BEYENE, D.; SUI, X.H.; DORADO, O.; CHEN, W.X.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium huautlense* sp.nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p.687-699, 1998.
- WANG, E.T.; BERKUM, P.van; SUI, X.H.; BEYENE, D.; CHEN, W.X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p.51-65, 1999a.
- WANG, E.T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. **Molecular Ecology**, Amsterdam, v.8, n.5, p.711-724, May 1999.

- WANG, E.T.; ROGEL-HERNÁNDEZ, A.; DE LOS SANTOS, A.G.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; CEVALLOS, M.A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p.1479-1491, 1999b.
- WILLEMS, A.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.305-313, 1993.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Review**, Washington, v.51, p.221-271, 1987.
- XU, L.M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp.nov., isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n.4, p.706-711, Oct. 1995.
- 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**, Oxford, v.173, p.2271-2277, 1991.
- YOUNG, J.P.W.; WEXLER, M. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, Colchester, v.134, p.2731-2739, 1988.
- ZERHARI, K.; AURAG, J.; KHBAYA, B.; KHARCHAF, D.; FILALI-MALTOUF, A. Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.30, n.5, p.351-357, May. 2000.

## CAPÍTULO 2

### DENSIDADE, EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE POPULAÇÕES DE RIZÓBIO DE DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA NA AMAZÔNIA

#### RESUMO

PEREIRA, E.G. **Densidade, eficiência e caracterização cultural de populações de rizóbio em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.** Lavras: UFLA, 2000. Cap. 2. 33p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)

Siratro é considerado uma planta promíscua quando em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio denominadas vulgarmente rizóbio, sendo indicada em levantamentos de diversidade. Visando avaliar a densidade, eficiência e diversidade de populações de rizóbio em diferentes sistemas de uso da terra (SUTs- floresta, capoeira, sistema agroflorestal, pastagem e monocultura) na Amazônia, coletaram-se amostras de solo de 3 sítios de cada SUT, em abril/maio de 1997. Uma semana após a coleta instalou-se no laboratório de Microbiologia do Solo, instalou-se um experimento com siratro cultivado em sacos plásticos com solução nutritiva e inoculado com diluições sucessivas das amostras de solo, para estimativa do número mais provável (NMP) e isolamento de rizóbio. Após 23 dias, colheram-se as plantas e determinou-se a matéria seca da parte aérea das plantas que foram comparadas a dois tratamentos controles sem inoculação, sendo um com e outro sem N-mineral de modo a calcular a eficiência da população de rizóbio nativa. Para estudos de diversidade dos isolados de rizóbio obtidos dos nódulos, realizou-se sua caracterização cultural em YMA. Os isolados de crescimento rápido obtidos foram analisados quanto ao perfil de proteínas totais obtidos por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE). A maior densidade e eficiência das populações de rizóbio foram obtidas em solos sob pastagem, seguido pela monocultura e capoeira. O sistema agroflorestal apresentou o menor valor de densidade de rizóbio, porém o valor de eficiência das populações igual à monocultura e capoeira. Já solos sob floresta apresentaram menor eficiência de populações, mas a densidade de células de rizóbio foi intermediária à pastagem e ao sistema agroflorestal. Solos sob floresta apresentaram alta diversidade de populações de rizóbio, seguido do sistema agroflorestal e da pastagem. Nos SUTs da Amazônia estudados, foram encontrados tanto isolados de rizóbio com características de crescimento muito rápido, rápido e intermediário, como de

crescimento lento e muito lento, típicos dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* e *Mesorhizobium*. Nenhum isolado com características típicas de *Azorhizobium* foi encontrado. A diversidade dos isolados de crescimento rápido pelo padrão de proteína total por SDS-PAGE foi menor do que a diversidade dos mesmos obtida pelas características culturais.



## ABSTRACT

PEREIRA, E.G. Density, efficiency and phenotypic diversity of rhizobia populations at different land use systems in Amazon region. Lavras: UFLA, 2000. Chap. 2. 33p. (Thesis - Doctorate in Soil and plant nutrition)

Siratiro is considered a promiscuous plant specie when established symbiotic relationships with nitrogen fixing bacteria named rhizobia and it is recommended for studies aiming to evaluate rhizobia diversity. To evaluate density, efficiency and diversity of rhizobia populations at different land use systems (LUS: disturbed forest, fallow, pasture, agroforestry system and crop) in Amazon region, soil samples were collected from three sites in each LUS in April/May, 1997. One week after sampling an experiment with siratro cultivated in plastic pouches with nutrient solution and inoculated with serial dilutions of soil samples was carried out at soil microbiology laboratory of DCS/UFLA to determine most probable numbers and to isolate rhizobia. After 23 days plant dry matter weight of the first dilutions were determined and compared to two control treatments without inoculation, one with and the other without mineral nitrogen in order to calculate native rhizobia population efficiencies. To study rhizobia diversity from isolates of siratro nodules cultural characterization on YMA was performed. Fast growers were also characterized by polyacrilamide gel electrophoresis patterns of total proteins (SDS-PAGE). Highest densities and efficiencies occurred in pasture soil samples, followed by those of crops and fallows. Agroforestry system had the lowest rhizobia density but population efficiency was equal to crops and pastures. The highest rhizobia population diversity occurred under forest followed by agroforestry system and pasture. At Amazon region soil samples, very fast, fast, intermediary, slow and very slow growers on YMA were isolated, these are typical of the genera *Rhizobium*, *Sinorizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium* and *Bradyrhizobium*. No isolate with typical characteristics of *Azorhizobium* was found. Diversity of total protein patterns by SDS-PAGE was lower than that obtained by cultural characterization.

## 1 INTRODUÇÃO

A diversidade microbiana do solo tem sido apontada como fator importante na sustentabilidade do ecossistema. A redução desta comunidade, com eventual extinção de espécies de microrganismos, pode causar uma perda de funções, reduzindo a habilidade dos sistemas agrícolas de superar períodos de estresse, com sérias consequências para a produtividade. Uma das funções essenciais de certos grupos de microrganismos do solo é a fixação biológica de  $N_2$  mediada por diversas espécies procarióticas, especialmente bactérias que formam simbioses com leguminosas (rizóbios), classificadas atualmente em 6 gêneros e 25 espécies, e apresentando alta diversidade genética e fenotípica intraespecíficas. Moreira et al. (1993) mostraram alta diversidade entre isolados de rizóbio de várias espécies leguminosas florestais da Mata Atlântica e Amazônia, sendo que a maioria dos isolados era de crescimento lento, com alcalinização do meio e classificados como *Bradyrhizobium* sp. Entretanto, há poucos estudos pesquisando a diversidade de rizóbio em diferentes sistemas de uso da terra em solos tropicais. Oliveira et al. (1999) concluíram que diferentes práticas agrícolas analisadas (pastagem, tempo zero, plantio direto e plantio convencional, com e sem aplicação de inseticida) influenciaram a ocorrência de estirpes particulares de rizóbios no solo, porém sem efeitos significativos na diversidade geral destes organismos. Entretanto, Coutinho et al. (1999) observaram que diferentes práticas de manejo do solo produziram alterações visíveis no perfil das populações de rizóbio nas amostras ambientais. Os resultados observados sugerem que as amostras derivadas de solo sob pastagem, não cultivado com leguminosas, apresentaram diversidade de rizóbios significativamente maior do que aquelas sob o cultivo de soja.

O objetivo deste estudo foi verificar a densidade, diversidade e eficiência de isolados de rizóbio capturados por siratro como planta isca, além de isolados

de nódulos coletados de plantas em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de solo e nódulos no campo

Foram escolhidos cinco sistemas de uso da terra (SUT) para amostragem de solo e nódulos: Floresta (F), Capoeira (C), Sistema Agroflorestal (A), Pastagem (P) e Monocultura (M), sendo cada um amostrado em três locais diferentes nos estados de Rondônia e Acre. As características principais de cada local se encontram na tabela 1 e a localização dos municípios em que as amostras foram feitas se encontram na figura 1. As coletas de solo foram realizadas de 30 de abril a 03 de maio de 1997, em 20 pontos, dentro de um transecto de 4 x 25 m, na profundidade de 0-20 cm (Figura 2), resultando em uma amostra composta de mais ou menos 300 gramas por local. As quinze amostras de solo foram analisadas química e fisicamente. A textura foi determinada segundo metodologia descrita em EMBRAPA (1997). Para caracterização química, as amostras de solo foram secas e peneiradas em malha de 2 mm, sendo então analisadas, conforme metodologia descrita a seguir: pH em água na relação 1:2,5; Ca, Mg e Al trocáveis extraídos com KCl 1N, analisados por titulometria (EMBRAPA, 1997); P e K extraídos pelo método Mehlich 1 e analisados por colorimetria e fotometria de chama, respectivamente (Vettori, 1969), S por turbidimetria (Blanchar, Rehm e Galdwell, 1965) e matéria orgânica por colorimetria (EMBRAPA, 1997). Quando existentes, foram também coletados nódulos de plantas dentro de cada transecto, para posterior isolamento de rizóbio em laboratório (as espécies encontradas em cada local,

com o respectivo número de nódulos coletados, se encontram na tabela 2. As amostras de solo foram armazenadas em sacos esterilizados de polietileno da Millipore, com posterior transporte em caixa de isopor ao Laboratório de Análise do Solo, do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras. Os nódulos foram armazenados em recipientes contendo sílica, para posterior isolamento do rizóbio.

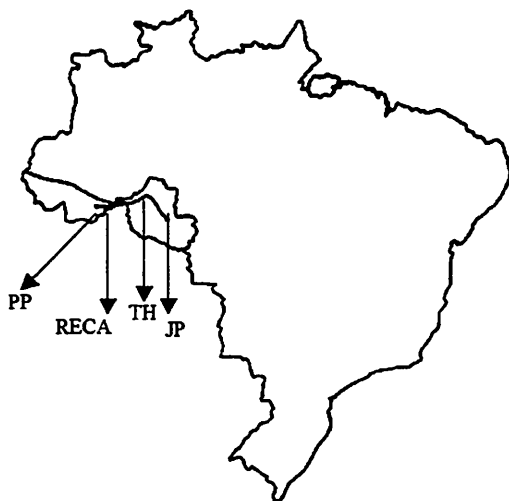


FIGURA 1. Localização dos municípios nos quais foram escolhidos os diferentes sistemas de uso da terra para os estudos de diversidade de rizóbio. PP- Pedro Peixoto; RECA- reflorestamento econômico consorciado e adensado- área de pequenos agrossilvicultores que surgiu em 1987, TH- Theobroma; JP- Ji-Paraná.

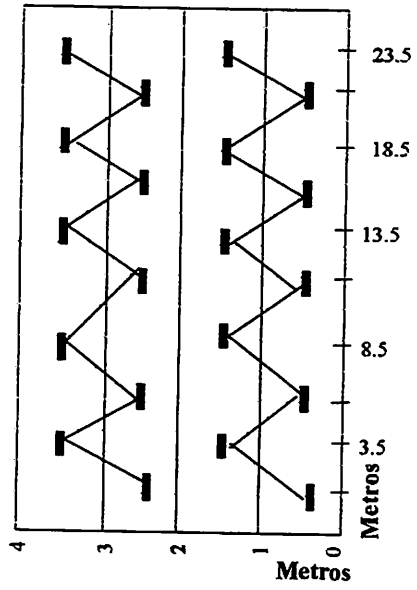


FIGURA 2. Esquema de amostragem do solo nos diferentes locais.

TABELA 1. Principais características dos locais amostrados nos diferentes sistemas de uso da terra (SUT).

Ident.	SUT	Localização (município, Estado)	Principais características
F1	Floresta	Theobroma- RO- 10°13'03''S, 62° 23'49''W, altitude de 252m	Desmatamento seletivo, liteira muito espessa com muitos galhos mortos e tocos. Ultissol
F2	Floresta	RECA-AC	Floresta com desmatamento seletivo e estrada próxima, liteira espessa
F3	Floresta	Pedro Peixoto- AC- 10°01'13''S, 67° 09'39''W, altitude de 271m	Solo com pedregosidade e baixa fertilidade, floresta pouco desenvolvida
C1	Capoeira	Theobroma- RO, 10°01'13''S, 67° 09'39''W, altitude de 295m	Recobrimento natural de 3 anos
C2	Capoeira	Theobroma- RO	Recobrimento natural de 2 anos após plantio de feijão e milho
C3	Capoeira	Pedro Peixoto- AC	Árvores muito desenvolvidas (recobrimento de 5 anos)
A1	Sistema agroflorestal	Ji- Paraná- RO, 10°58'30''S, 62°00'58''W, altitude de 265m	Café com <i>Schizolobium</i> (12 anos). <i>Schizolobium</i> no meio do transecto. Cobrimento vegetal de 40 a 60%. Liteira espessa com muitos galhos e tocos. Talvez anteriormente tenha sido floresta secundária. Ultissol
A2	Sistema agroflorestal	Ji- Paraná- RO, 10°55'23''S, 61°57'25''W, altitude de 230m	Café com seringueira (12 anos). Cobrimento vegetal de 70% com algumas espécies de árvores pioneiras. Poucos galhos mortos ou tocos. Talvez anteriormente tenha sido pastagem. Ultissol
A3	Sistema agroflorestal	RECA-AC, 09°46'48''S, 66°37'44''W, altitude de 287m	Cupuaçu , castanha do Brasil e pupunha (7anos). Cobrimento vegetal de 90%, liteira fina com muitos galhos e tocos. Oxissol
P1	Pastagem	Ji- Paraná- RO, 10°55'14''S, 61°58'27''W, altitude de 225m	Idade de 10 anos. Algumas árvores e tocos. Muitos montes de cupim. Ultissol
P2	Pastagem	Theobroma- RO, 10°01'03''S, 67°09'27''W, altitude de 316m	Pastagem de <i>Brachiaria brizantha</i> com 8-10 anos
P3	Pastagem	Pedro Peixoto- AC	Limpa com presença de poucos tocos
M1	Monocultura-mandioca	Theobroma- RO, 10°06'18''S, 62°11'40''W, altitude de 230m	Mandioca com presença de ervas daninhas após 3 anos de plantio (arroz, feijão, entre outras) Ultissol
M2	Monocultura-feijão	Theobroma- RO	Feijão após milho no fim de um ano de queimada. Muitos galhos e tocos.
M3	Monocultura-arroz	Pedro Peixoto- AC	Um ano após queimada. Arroz já colhido, com algumas plantas e palha presentes. Feijão plantado em alguns lugares. Muitos troncos, tocos e galhos. Significativo brotamento e presença de ervas daninhas.

TABELA 2. Espécies leguminosas encontradas e número de nódulos coletados por espécie nos locais sob diferentes sistemas de uso da terra (SUT).

SUT*	Espécies leguminosas	Número de nódulos coletados espécie <sup>-1</sup>
M1	<i>Machaerium aureiflorum</i> Ducke	10
M2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	30
M3	<i>Erytrina</i> sp.	1
A1	<i>Desmodium</i> sp.	18
A2	<i>Desmodium</i> cf. <i>cajanufolium</i> (HBK)	3
P1	<i>Chamaechrista</i> , <i>Calopogonium mucunoides</i> , <i>Aeschynomene americana</i> , <i>Desmodium asperum</i> (Poir) Desv.	2, 16, 6, 4
P3	<i>Desmodium</i> sp., <i>Crotalaria</i> sp.	6, 36
C1	<i>Pueraria</i> sp.	57
C2	<i>Vigna</i>	4
C3	<i>Desmodium</i> sp., <i>Desmodium camum</i>	13, 10

\* Identificação de acordo com tabela 1.

## 2.2 Densidade de rizóbio

A população de rizóbio foi determinada pelo método das diluições sucessivas nas quinze amostras de solo, sendo as diluições de 5<sup>-1</sup> (100 g de solo 50 ml<sup>-1</sup> de solução salina) a 5<sup>-6</sup> em solução salina, utilizando siratro como planta isca em sacos de polietileno estéreis da Millipore de 120 ml de solução nutritiva de Jensen (CaHPO<sub>4</sub> 1g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2g L<sup>-1</sup>, NaCl 0,2g L<sup>-1</sup>, FeCl<sub>3</sub> 0,1g L<sup>-1</sup>) esterilizada, com 4 repetições para cada diluição e duas plantas por saco (Figura 3). Uma visão geral do experimento pode ser vista na figura 4. Foram adicionados 2 tratamentos, sendo um com solução nutritiva e 70 mg kg<sup>-1</sup> de N na forma de KNO<sub>3</sub> e outro somente com solução nutritiva (controle). Após 23 dias, coletaram-se as plantas e determinou-se peso da matéria seca das plantas da primeira diluição (após peso constante em estufa de

circulação forçada de ar, a 60-70°C), para avaliação da eficiência das populações de rizóbio em promover produção de matéria seca da parte aérea. Para a estimativa do número mais provável (NMP) de células de rizóbio em cada amostra de solo coletada, considerou-se positivo para presença de nódulos radiculares e negativo para ausência, em cada diluição usando o programa MPNES (most probable number estimate)(Woomer, Singleton e Bohlool, 1988).

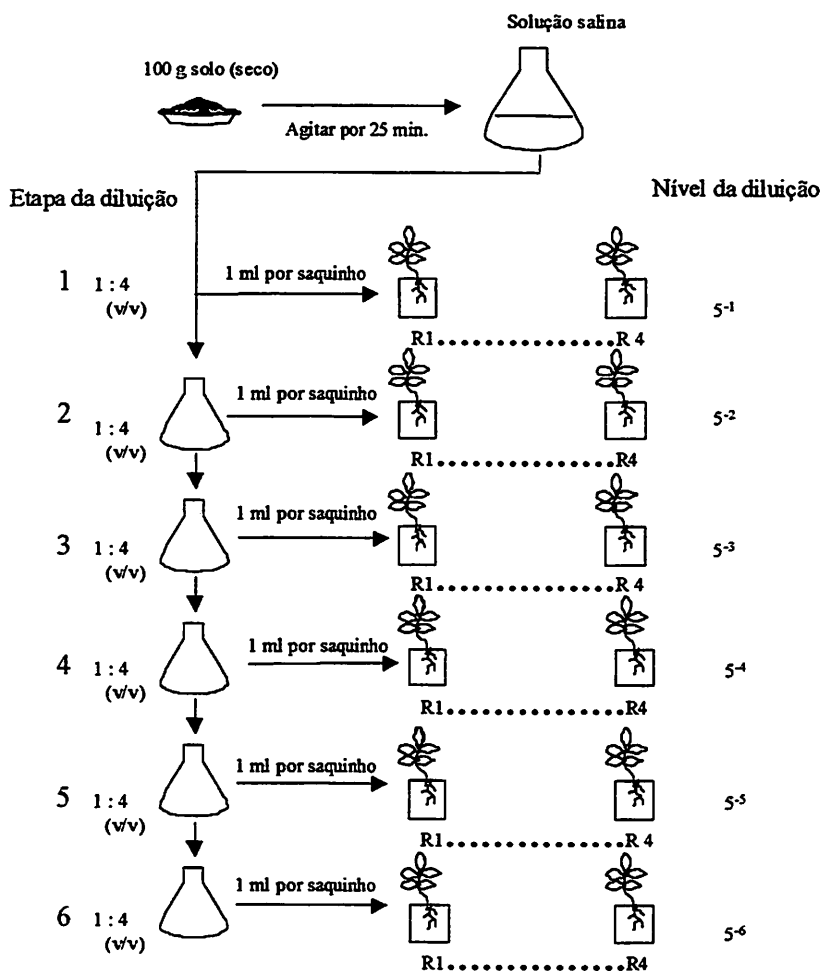


FIGURA 3. Esquema da diluição utilizada para estimar o número mais provável de células de rizóbio nas amostras de solo.



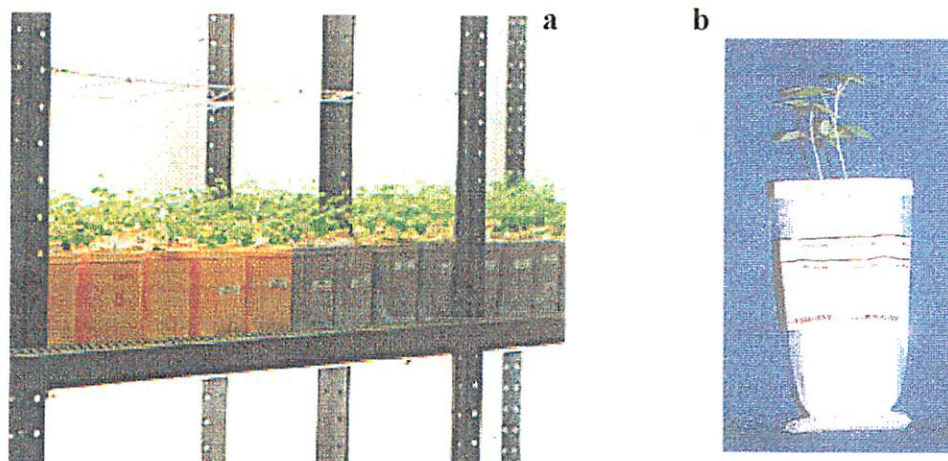


FIGURA 4. Vista do experimento instalado (a) e detalhe do siratro cultivado em saco plástico (b) para avaliação da densidade de rizóbios de amostras de solo dos diferentes sistemas de uso da terra.

### 2.3 Processo de isolamento e caracterização fenotípica de rizóbio

Obtiveram-se isolados de rizóbio de nódulos coletados no campo e de nódulos das plantas de siratro de todas as diluições utilizadas na estimativa do número mais provável de células de rizóbio das amostras de solo. Para isto os nódulos foram desinfectados superficialmente com álcool 70% e cloreto de mercúrio, seguindo-se seis lavagens sucessivas com água esterilizada. Os nódulos desinfectados foram macerados, em condições assépticas, sobre meio de cultura YMA (Vincent, 1970). Colônias isoladas foram transferidas para tubo com meio YMA inclinado, cobertas com uma camada de 4ml de glicerol estéril e mantidas em refrigerador. Os isolados também foram crescidos em meio YMA líquido e armazenados em super freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , com 50% de glicerol 20% em tubos eppendorf. Os isolados foram estudados de acordo com as seguintes características culturais: velocidade de crescimento (aparecimento de colônias isoladas) em dias: crescimento muito rápido (CMR) – 1 dia; crescimento rápido

(CR) – 2-3 dias, crescimento intermediário (CI)- 4-5 dias, crescimento lento (CL) – 6-10 dias, crescimento muito lento (CML) – mais que dez dias (Moreira, 1993), alteração do pH do meio (ácido, neutro ou alcalino), cor e diâmetro das colônias e absorção de indicador.

Com as características culturais dos isolados de rizóbio, fez-se o agrupamento pelo método Complete Linkage sendo que a medida de distância foi calculado pela Distância Euclidiana (Everitt, 1993) utilizando o programa STATISTICA 5.0. O programa gera um índice de similaridade (%) para todas as combinações e então cria um dendograma no qual os grupos são formados como um índice decrescente de similaridade (ex. 100% = idêntico). Foi calculado o índice de diversidade de Shannon-Weaver (Shannon e Weaver, 1949) de acordo com as características culturais dos rizóbios isolados de cada amostra de solo pela seguinte equação:

$$H' = - \sum_{i=1}^k p_i \ln p_i, \text{ onde:}$$

k = igual ao número de grupos formados com as diferentes características culturais, e

$p_i$  = abundância relativa dos isolados em cada grupo.

Duzentos e setenta e sete isolados de crescimento rápido capturados por siratro foram caracterizados quanto ao padrão de proteína total por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para isso, os isolados foram multiplicados em meio TY líquido durante 4 dias, a 30°C, sob agitação constante. Após centrifugação, as células foram solubilizadas em SDS e a proteína total submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pelo método Laemmli (1970), com modificações descritas por Jackman (1985, 1987). Os padrões eletroforéticos de proteínas dos isolados foram agrupados de acordo com a presença ou ausência de bandas de proteínas de cada isolado.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises químicas e físicas das amostras de solo mostraram que houve variabilidade entre locais, não ocorrendo uniformidade entre diferentes locais para o mesmo SUT (Tabela 3). No entanto, houve diferença significativa entre SUTs para as diversas características. Os teores de K, Zn, Mg e Al variaram de baixo a alto, e Ca e matéria orgânica variaram de baixo a médio. Os teores de P ocorreram em níveis semelhantes em todos os locais, em baixo nível, enquanto os valores de pH variaram de 4,1 a 6,6, sendo o menor valor médio obtido para os locais de Floresta (4,4) e o maior para os locais de Pastagem e Sistema Agroflorestal (5,7).

Os valores de densidade e eficiência (produção de matéria seca da parte aérea, MSPA) de populações nativas de rizóbio nos diferentes SUTs estão apresentados na tabela 4. A densidade dessas populações foi maior em amostras de solo sob pastagem, em relação aos demais SUTs. Solos sob sistema agroflorestal proporcionaram as menores densidades. A população de rizóbio variou de 15 rizóbios por grama de solo (A3) a mais de  $2 \times 10^4$  rizóbios por grama de solo (P1). A maior densidade de rizóbios em solos sob pastagem pode estar relacionada às melhores condições químicas nesses ambientes, maiores valores de pH e saturação por bases e menores teores de Al em relação aos outros SUTs (Tabela 3). Tem sido estimado que um grama de solo pode conter uma comunidade de  $10^9$  microrganismos e a população de rizóbio representa cerca de 0,1% desta comunidade, ou seja,  $10^6$  rizóbios por grama de solo (Thies, Singleton e Bohlool, 1991). No entanto, este número pode variar dependendo do solo e do ecossistema. Em uma série de experimentos de inoculação de rizóbio em soja, Weaver e Frederick (1974) observaram seis solos com uma população indígena de *B. japonicum* variando de 11 a  $23 \times 10^6$  rizóbios por grama de solo. Woomeer, Singleton e Bohlool (1988), estudando o número de rizóbios em 14

diferentes locais do Havai, obtidos através de 5 espécies de leguminosas (*Trifolium repens*, *Medicago sativa*, *Vicia sativa*, *Leucaena leucocephala* e *Macroptilium atropurpureum*), verificaram que o siratro foi a planta isca que possibilitou o isolamento de maior número de rizóbio nos diferentes locais, numa faixa de 4 a  $5,8 \times 10^5$  células por grama de solo. Verificaram ainda que pelas características culturais todos os rizóbios isolados pertenciam ao gênero *Bradyrhizobium* sp. Assim, os valores encontrados para os solos da Amazônia situam-se dentro da faixa observada por outros autores.

Verificou-se que plantas cultivadas em amostras de solo sob floresta apresentaram os menores valores de MSPA, quando comparadas àquelas cultivadas em solos sob outros SUTs, principalmente sob pastagem, com os maiores valores. A baixa eficiência de populações de rizóbios nativos dos solos sob floresta pode ter ocorrido devido às condições químicas estressantes neste ambiente, como baixo pH, altos teores de Al e baixos teores de Ca e Mg (Tabela 3), que selecionaram os organismos para a sobrevivência e não para eficiência; além disto, nestes ambientes em equilíbrio não há pressão seletiva à FBN. A capacidade saprofítica de populações de rizóbios presentes em condições estressantes geralmente é limitada, com perda da eficiência simbiótica (Denton et al., 2000; Graham, 1992).

TABELA 3. Características químicas e físicas dos solos amostrados nos diferentes locais dos sistemas de uso da terra (SUT).

	Pastagem				Monocultura				Capoeira			
	P1	P2	P3	X	M1	M2	M3	X	C1	C2	C3	X
pH (H <sub>2</sub> O 1:2,5)	6,57	5,2	5,47	5,8 A	4,27	6,7	4,5	5,2 B	4,53	5,2	6,13	5,3 B
P Mehlich (mg dm <sup>-3</sup> )	4	1	2	2,3 B	2	1	2	5,7 A	2	4	3	3,1 AB
K (mg dm <sup>-3</sup> )	76,67	59,67	110,3	82 A	29,3	47,7	120	66 AB	46	61,67	42	50 B
Ca (cmol dm <sup>-3</sup> )	3,1	1,17	1,47	1,9 B	0,63	3,87	2,1	2,2 AB	1,17	2	5,6	2,9 A
Mg (cmol dm <sup>-3</sup> )	0,8	1,03	0,6	0,8 AB	0,17	0,97	1	0,7 AB	0,33	1,17	1,3	0,9 A
Al (cmol dm <sup>-3</sup> )	0	0,07	0,2	0,09 C	1,1	0	1,6	0,90 B	0,73	0	0	0,24 C
H+Al (cmol dm <sup>-3</sup> )	1,17	3,73	2,33	2,4 C	5,03	1,36	6,16	4,2 B	5,5	3,03	1,5	3,3 BC
S-SO <sub>4</sub> (mg dm <sup>-3</sup> )	5,5	13,24	10,9	9,9 B	24,52	38,6	15,55	26,2 A	16,85	21,21	5,25	14,4 B
SB (cmol dm <sup>-3</sup> )	4,07	2,33	2,37	2,9 A	0,9	4,97	3,4	3,1 A	1,63	3,3	7	4,0 A
t (cmol dm <sup>-3</sup> )	4,07	2,4	2,57	3,0 B	2	4,97	4,96	4,0 A	2,37	3,3	7	4,2 A
T (cmol dm <sup>-3</sup> )	5,23	6,07	4,7	5,3 C	5,93	6,33	9,56	7,3 B	7,13	6,3	8,6	7,3 B
m (%)	0	2,67	8,53	4 C	55,17	0	32,9	29 B	31,6	0	0	11 C
V (%)	77,4	37,4	50,03	55 AB	15,37	77,87	36,6	43 B	23,47	52,2	81,5	52 AB
Matéria orgânica (g kg <sup>-1</sup> )	22,0	20,2	18,2	20,13	17,5	20,6	27,3	21,80	23,5	20,2	25,9	23,20
B (mg dm <sup>-3</sup> )	0,32	0,27	0,3	0,30	0,19	0,26	0,3	0,25	0,21	0,31	0,32	0,28
Cu DTPA (mg dm <sup>-3</sup> )	2,67	0,9	1,1	1,6 AB	0,77	1,27	2,13	1,4 B	2,33	1,47	1,17	1,7 AB
Zn DTPA (mg dm <sup>-3</sup> )	6,17	3,37	3,67	4,4	3,37	13,5	3,76	3,5	3,77	3,47	3,77	3,7
Mn DTPA (mg dm <sup>-3</sup> )	94,3	10	18,4	40,9 A	4,2	12,27	31,56	17,7 B	7,9	23,08	70,4	34,0 A
Fe DTPA (mg dm <sup>-3</sup> )	37,63	111,4	104,8	85 B	189,2	30,9	126,4	116 B	740	67,77	38,8	282 B
% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> total (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,028	0,026	0,028	3 D	0,028	0,1056	0,0757	7 A	0,041	0,0827	0,0407	5 B
% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> argila total (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,207	0,06	0,123	13	0,06	0,253	0,12	14	0,08	0,20	0,137	14
Areia (g kg <sup>-1</sup> )	576	480	576	580 A	450	483	157	360 D	393	463	510	460C
Silte (g kg <sup>-1</sup> )	158	87	158	160 A	83	100	170	120 B	93	243	80	140 B
Argila (g kg <sup>-1</sup> )	267	433	267	270 E	467	417	673	520 B	513	293	410	410 C

Médias (X) seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

...continua...

	Floresta					Sistema Agroflorestal		
	F1	F2	F3	X	A1	A2	A3	X
pH (H <sub>2</sub> O 1:2,5)	4,4	4,23	4,67	4,4 C	5,83	6,47	4,9	5,7 A
P Méhlich (mg dm <sup>-3</sup> )	2	1	2	1,7 B	2	5	1	2,8 B
K (mg dm <sup>-3</sup> )	40,67	36,67	98,3	59 AB	65,67	23,33	9,5	61 AB
Ca (cmol dm <sup>-3</sup> )	0,4	0,63	1,47	0,8 C	2,43	2,43	2,7	2,5 AB
Mg (cmol dm <sup>-3</sup> )	0,13	0,3	1,17	0,5 B	1,03	0,7	0,97	0,9 A
Al (cmol dm <sup>-3</sup> )	1,13	2,27	2,1	1,83 A	0	0	0,83	0,28 C
H+Al (cmol dm <sup>-3</sup> )	6,07	7,6	7,9	7,2 A	1,7	1,1	4,73	2,5 C
S-SO <sub>4</sub> (mg dm <sup>-3</sup> )	26,62	17,93	4,7	17,2 AB	8,42	7,04	12,27	9,2 B
SB (cmol dm <sup>-3</sup> )	0,63	1,03	2,86	1,5 B	3,63	3,23	3,9	3,6 A
t (cmol dm <sup>-3</sup> )	1,77	3,3	4,96	3,3 AB	3,63	3,23	4,73	3,9 AB
T (cmol dm <sup>-3</sup> )	6,7	8,63	10,7	8,7 A	5,33	4,33	8,63	6,1 C
m (%)	64,2	68,97	42,8	59 A	0	0	18,57	6 C
V (%)	9,47	11,87	26,4	16 C	68,27	74,47	46,07	63 A
Matéria orgânica (g kg <sup>-1</sup> )	19,4	25,1	33,9	26,13	17,0	13,2	27,7	19,30
B (mg dm <sup>-3</sup> )	0,16	0,17	0,37	0,23	0,32	0,35	0,32	0,40
Cu DTPA (mg dm <sup>-3</sup> )	1,03	1,97	2,9	2,0 A	1,5	0,43	2,33	1,4 B
Zn DTPA (mg dm <sup>-3</sup> )	3,7	3,63	4,7	4,0	4,67	3,7	4,83	4,4
Mn DTPA (mg dm <sup>-3</sup> )	7,3	7,23	21	11,8 B	74,5	14,27	18,83	35,9 A
Fe DTPA (mg dm <sup>-3</sup> )	573,3	427,5	630,8	544 A	84,33	30,6	237,7	118 B
% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> total (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,055	0,063	0,0403	7 A	0,0177	0,029	0,0807	4 C
% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> argila total (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,133	0,087	0,163	13	0,15	0,153	0,107	14
Areia (g kg <sup>-1</sup> )	650	117	823	280 E	480	137	230	630 B
Silte (g kg <sup>-1</sup> )	160	127	60	150 AB	100	133	227	120 B
Argila (g kg <sup>-1</sup> )	190	757	117	560 A	420	730	543	350 D

Médias (X) seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

TABELA 4. Densidade e eficiência de populações de rizóbio em diferentes sistemas de uso da terra (SUT), avaliada pela matéria seca da parte aérea (MSPA) de siratro.

SUT	Local*	log NMP células g <sup>-1</sup> de solo	MSPA (mg planta <sup>-1</sup> )
Pastagem	P1	4,30	35,5
	P2	4,01	22,3
	P3	2,22	29,1
	Média	3,51 a	28,9 a
	Desvio padrão	0,92	5,39
Sistema Agroflorestal	A1	1,79	32,2
	A2	2,40	23,5
	A3	1,18	26,3
	Média	1,79 b	27,3 ab
	Desvio padrão	0,50	3,63
Monocultura	M1	3,32	22,4
	M2	2,47	23,6
	M3	2,35	27,1
	Média	2,71 ab	24,4 ab
	Desvio padrão	0,43	1,99
Capoeira	C1	4,01	20,6
	C2	3,57	24,6
	C3	2,17	28,2
	Média	3,25 ab	24,5 ab
	Desvio padrão	0,78	3,10
Floresta	F1	2,32	23,8
	F2	3,23	19,3
	F3	2,54	22,2
	Média	2,70 ab	21,8 b
	Desvio padrão	0,39	1,86

\* Descrição dos locais consta na tabela 1. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Nas amostras de solo sob pastagem, verificou-se que uma maior densidade de rizóbios nativos promoveu maior produção de MSPA (maior eficiência), em comparação aos outros SUTs. No entanto, nem sempre há uma

relação direta entre número e eficiência de isolados, já que a população de rizóbio numa certa condição, pode ser composta de isolados de baixa eficiência simbiótica. Este fato pode ter ocorrido em amostras de solo sob Floresta, já que valores significativos de densidade de rizóbios promoveram os menores valores observados de MSPA de siratro, indicando baixa eficiência populacional nesses ambientes. Além disto, a eficiência da população de rizóbio em plantas de siratro, que é uma espécie introduzida, e portanto com diferentes relações de especificidade com a população nativa, pode ser diferente daquela observada com as espécies vegetais nativas.

Foram obtidos 126 isolados das amostras de solo do sob capoeira, 261 da pastagem, 106 do sistema agroflorestal, 111 da floresta e 110 da monocultura e 85 isolados de plantas nodulando no campo num total de 799 isolados. Os números de isolados de rizóbio obtidos de siratro, agrupados por taxa de crescimento nos diferentes SUTs, encontram-se na Tabela 5, e as suas respectivas porcentagens na Figura 5.

TABELA 5. Número de isolados de rizóbio obtidos conforme sua taxa de crescimento, nos diferentes sistemas de uso da terra (SUTs).

Velocidade de crescimento (dias pra aparecimento de colônias isoladas)	SUTs					TOTAL
	C	P	A	F	M	
Muito rápido (MR)*	2	36	6	25	60	129
Rápido (R)	41	81	44	35	9	210
Intermediário (I)	12	27	15	7	30	91
Lento (L)	71	102	40	19	11	243
Muito Lento (ML)	0	15	1	25	0	41

Sendo P (Pastagem), A (Sistema Agroflorestal), F (Floresta), M (Monocultura) e C (Capoeira). \* MR- 1 dia; CR- 2-3 dias; CI- 4-5 dias; CL- 6-10 dias; CML- mais que 10 dias.



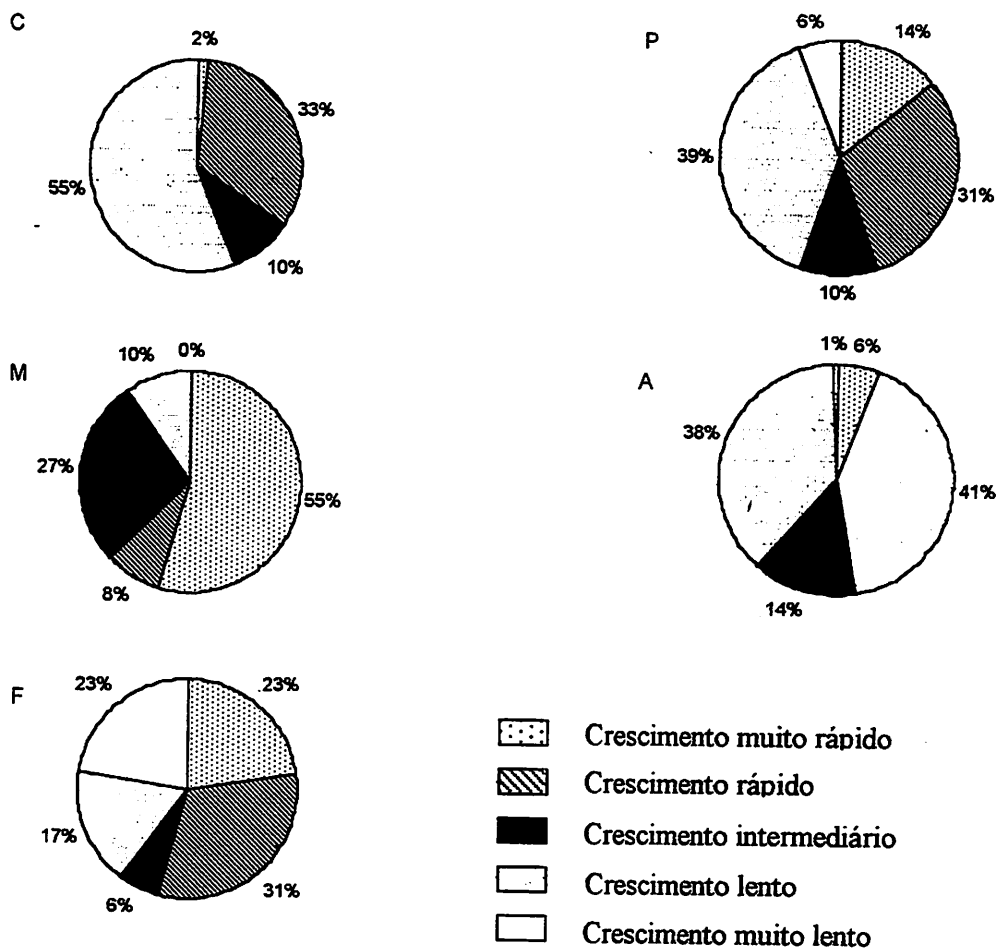


FIGURA 5. Porcentagem de isolados de rizóbio obtidos usando siratro como planta isca inoculado com amostras de solo dos diferentes SUTs cultivado em meio Jensen , com classificação de acordo com sua velocidade de crescimento. (C: Capoeira, M: Monocultura, F: Floresta, P: Pastagem, A: Sistema Agroflorestal).

Os sistemas capoeira e monocultura foram os únicos que não apresentaram todos os tipos culturais estudados (ausência de isolados de crescimento muito lento- *Bradyrhizobium* spp.), enquanto os outros SUTs apresentaram distribuições porcentuais homogêneas dos isolados (Tabela 5 e Figura 4). Houve domínio de isolados de rizóbio de crescimento lento (*Bradyrhizobium* spp.) no sistema de capoeira (55%), enquanto isolados de crescimento intermediário, rápido e muito rápido dominaram o sistema monocultura (90%), possivelmente devido ao cultivo atual ou anterior de feijoeiro nos locais, já que essas características são típicas dos microssimbiontes da leguminosa em questão. Este efeito do hospedeiro na seleção de isolados já foi estudado e confirmado por vários autores (Oliveira, 1999; Rosado et al., 1998; Lawson, Barnet e McGilchrist, 1987; Yousef et al., 1987) para diversas plantas leguminosas. O domínio de *Bradyrhizobium* spp. oriundo de espécies florestais tropicais nativas tem sido verificado por outros autores (Norris, 1969; Moreira e Franco, 1994; Gao et al., 1994; Moreira et al., 1993; Trinick, 1980). No entanto, o domínio de isolados de rizóbio de crescimento muito rápido, rápido e intermediário em solos sob floresta (60%) contraria aqueles autores e pode ser provavelmente reflexo da planta isca utilizada, o siratro, que é uma planta introduzida (Prasad, Khan e Akao, 2000; Heal e Ineson, 1984; Jenkins, 1987).

Os isolados de rizóbio obtidos na última diluição indicam a sua predominância nos solos em que foram isolados. Na floresta e sistema agroflorestal, sistemas mais estáveis, houve domínio de isolados de crescimento rápido e muito rápido na última diluição. Nos outros sistemas, menos estáveis, não houve predominância de tipos culturais nessa diluição.

A maioria dos isolados (56%) de nódulos coletados em plantas dos diversos SUTs foi de crescimento muito rápido, rápido e intermediário (Tabela 6), sendo que a metade dos isolados com crescimento rápido foram provenientes

de feijão. Por outro lado, plantas invasoras ou nativas das áreas estudadas foram noduladas, em sua maioria (60%), por rizóbios de crescimento lento. Os isolados de rizóbio obtidos de plantas nativas apresentaram a distribuição porcentual, quanto à taxa de crescimento, próxima aos isolados obtidos através de planta isca na monocultura, sistema agroflorestal e pastagem. Não foram obtidos isolados de todos os nódulos coletados no campo pelo fato de alguns estarem em senescência. Na floresta, não foram encontrados nódulos dentro dos transectos, fato já esperado por se tratar de um sistema em equilíbrio, em que a baixa demanda de nitrogênio é suprida por ciclagem eficiente, não havendo estímulo à FBN e, conseqüentemente, baixa ou nenhuma nodulação.

Os 714 isolados de rizóbio obtidos de amostras de solos dos diferentes SUTs usando siratro como planta isca foram agrupados de acordo com suas características culturais, cujo dendograma de similaridade pode ser observado na Figura 6, com a identificação e descrição dos grupos de isolados na Tabela 6, além da descrição dos isolados de campo.

O dendograma pode ser dividido em dois grandes grupos fenotípicos a 20% de similaridade, sendo um de isolados de crescimento muito rápido a intermediário, contendo a estirpe tipo BR322 (*Rhizobium tropici*), e outro de isolados de crescimento muito lento a lento, contendo a estirpe tipo BR110 (*Bradyrhizobium japonicum*). A 80% de similaridade, os 714 isolados foram agrupados em 32 grupos, sendo que 22 pertenceram ao primeiro grande grupo e 10 ao segundo grande grupo, independentemente dos SUTs, comprovando a maior diversidade de rizóbios com características de crescimento muito rápido a intermediário nos locais estudados da Amazônia, fato já verificado para rizóbio isolado de espécies florestais nativas da Amazônia e Mata Atlântica (Moreira et al., 1993).

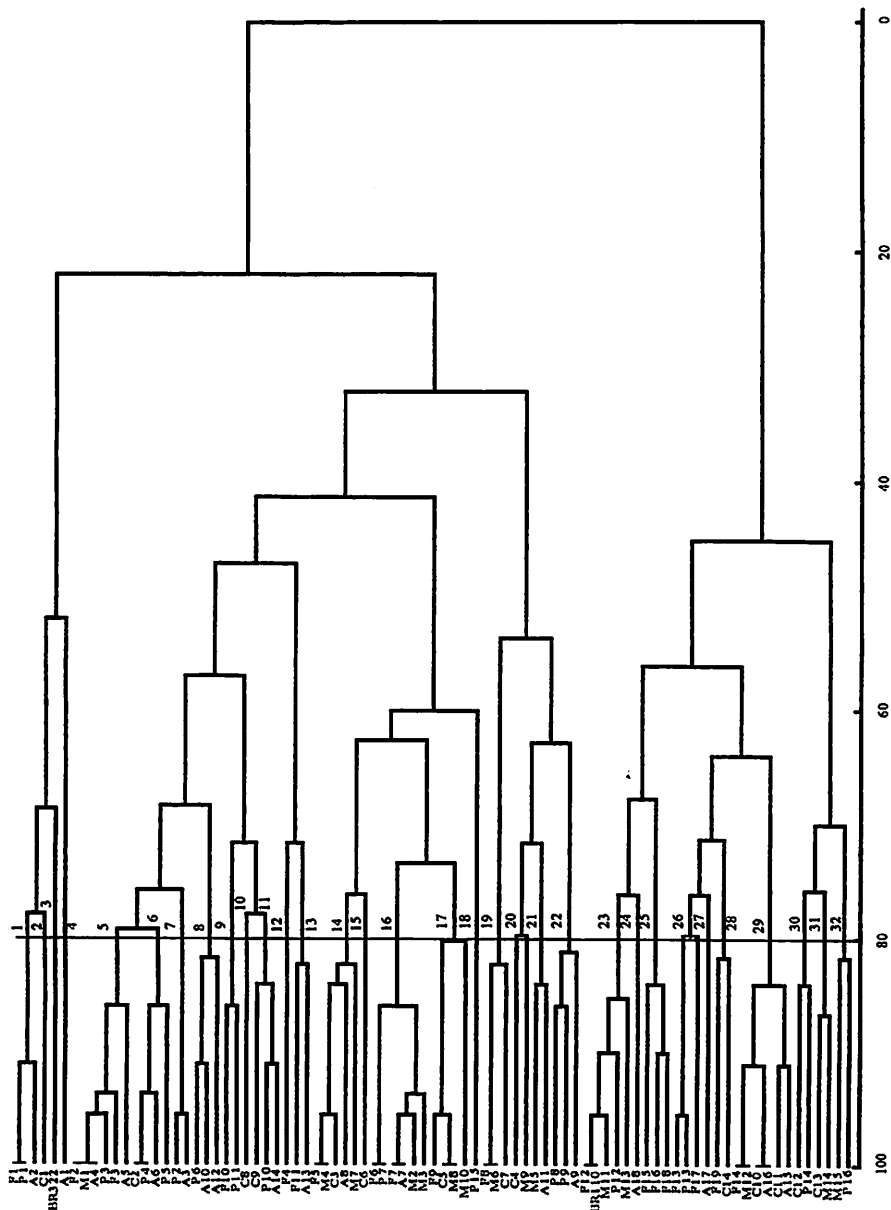


FIGURA 5. Dendrograma mostrando similaridade entre isolados de rizóbio, conforme suas características culturais (taxa de crescimento, cor e diâmetro da colônia, absorção de indicador, alteração do pH do meio, produção de goma).

TABELA 6. Agrupamento e número de isolados de rizóbio de siratro e de nódulos coletadas no campo, conforme suas características culturais, nos diferentes sistemas de uso da terra.

Grupos	Características culturais-nódulos coletados no campo						Número de isolados
	A	B	C	D	E	F	
<b>CAPOEIRA (C2)</b>							
1	R	>2	neutro	alta	não	branca	2
2	L	1-2	álcali	média	não	branca	12
3	ML	<1	álcali	baixa	não	branca	8
<b>CAPOEIRA (C1)</b>							
1	L	1-2	álcali	média	não	branca	3
<b>CAPOEIRA (C3)</b>							
1	R	>2	neutro	baixa	não	amarelada	1
2	L	1-2	álcali	média	não	branca	2
3	ML	<1	álcali	baixa	não	branca	1
<b>MONOCULTURA (M2)</b>							
1	R	>2	neutro	alta	sim	branca	24
<b>SISTEMA AGROFLORESTAL (A2)</b>							
1	MR	>2	ácido	alta	sim	amarelada	4
2	R	>2	neutro	média	não	amarelada	1
3	L	1-2	álcali	média	não	branca	2
<b>SISTEMA AGROFLORESTAL (A3)</b>							
1	L	<1	álcali	baixa	não	branca	1
<b>PASTAGEM (P1)</b>							
1	MR	>2	ácido	alta	sim	amarelada	2
2	R	>2	ácido	alta	não	amarelada	1
3	R	>2	neutro	média	não	amarelada	1
4	R	>2	neutro	alta	sim	amarelada	1
5	I	1-2	álcali	média	não	branca	8
6	L	<1	álcali	média	não	branca	4
7	ML	<1	álcali	baixa	não	branca	1
<b>PASTAGEM (P3)</b>							
1	MR	>2	ácido	alta	sim	amarelada	1
2	R	>2	neutro	alta	sim	amarelada	1
3	R	>2	neutro	baixa	não	amarelada	1
4	I	1-2	ácido	baixa	sim	amarelada	1
6	L	<1	álcali	baixa	não	branca	2

...continuação...

Grupos	Características culturais- nódulos de siratro						Número de isolados
	A	B	C	D	E	F	
<b>CAPOEIRA (C)</b>							
1	R	>2	neutro	alta	sim	branca	26
2	R	>2	ácido	média a alta	sim	amarelada	14
3	MR	>2	ácido	baixa a média	sim	amarelada	1
4	R	1-2	neutro	baixa a média	sim	amarelada	2
5	I	>2	ácido	alta	sim	amarelada	1
6	I	1-2	ácido	baixa a média	sim	amarelada	1
7	I	<1	álcali	baixa	não	rosa	1
8	I	>2	álcali	baixa a média	não	branca	1
9	I	>2	álcali	alta	não	branca	9
10	L	1-2	álcali	baixa a média	não	branca	30
11	L	<1	álcali	baixa a média	não	branca	8
12	L	<1	ácido	baixa a média	não	amarelada	11
13	L	<1	neutro	baixa a média	não	amarelada	4
14	L	1-2	álcali	baixa	não	creme	16
<b>FLORESTA (F)</b>							
1	MR	>2	ácido	média a alta	sim	amarelada	9
2	R	>2	neutro	média a alta	sim	branca	31
3	R	>2	neutro	média	não	branca	7
4	R	<1	neutro	baixa	não	amarelada	1
5	R	1-2	ácido	média a alta	sim	amarelada	7
6	R	1-2	ácido	alta	sim	branca	1
7	R	>2	ácido	alta	sim	amarelada	1
8	R	<1	álcali	baixa	não	rosa	3
9	I	>2	ácido	alta	sim	amarelada	3
10	I	>2	neutro	alta	sim	branca	3
11	I	<1	neutro	baixa	não	branca	1
12	L	1-2	álcali	alta	não	branca	1
13	L	<1	álcali	baixa	não	amarelada	11
14	L	1-2	álcali	baixa	não	branca	5
15	ML	<1	álcali	média a alta	não	branca	10
16	ML	1-2	álcali	alta	não	branca	5
17	ML	<1	álcali	baixa a média	não	amarelada	8
18	ML	1-2	álcali	média a alta	sim	branca	3
19	ML	1-2	álcali	baixa	sim	creme	1

...continuação...

Grupos	Características culturais-nódulos de siratro						Número de isolados
	A	B	C	D	E	F	
<b>MONOCULTURA (M)</b>							
1	R	>2	neutro	média a alta	sim	branca	30
2	R	>2	ácido	alta	sim	amarelada	20
3	R	>2	ácido	alta	não	amarelada	4
4	R	>2	ácido	média a baixa	sim	amarelada	3
5	R	>2	álcali	baixa a média	não	amarelada	1
6	R	<1	álcali	baixa	não	rosa	2
7	R	1-2	ácido	baixa	sim	amarelada	1
8	I	>2	ácido	alta	sim	amarelada	1
9	I	1-2	neutro	baixa	não	amarelada	2
10	L	1-2	álcali	alta	sim	branca	1
11	L	1-2	álcali	baixa	não	branca	14
12	L	>2	álcali	média a alta	não	branca	15
13	L	<1	neutro	baixa a média	não	branca	4
14	I	1-2	ácido	alta	não	branca	1
15	ML	<1	neutro	baixa	não	amarelada	11
<b>SISTEMA AGROFLORESTAL (A)</b>							
1	MR	>2	ácido	baixa	sim	laranja	2
2	MR	>2	ácido	alta	sim	amarelada	3
3	MR	>2	neutro	média a alta	sim	branca	1
4	R	>2	neutro	média a baixa	sim	branca	8
5	R	1-2	neutro	média a alta	não	branca	14
6	R	>2	neutro	alta	não	branca	1
7	R	>2	ácido	alta	sim	amarelada	2
8	R	1-2	ácido	baixa a média	sim	amarelada	10
9	R	2-3	neutro	média	não	creme	1
10	R	1-2	álcali	alta	não	branca	6
11	R	1-2	álcali	baixa	não	amarelada	1
12	R	1-2	álcali	baixa a média	sim	branca	1
13	I	<1	álcali	baixa	não	branca	7
14	I	1-2	álcali	média a alta	não	branca	8
15	L	<1	álcali	baixa	não	branca	9
16	L	1-2	álcali	baixa a média	não	branca	28
17	L	<1	álcali	média a alta	não	creme	2
18	ML	>2	álcali	alta	não	branca	1

...continuação...

Grupos	Características culturais-nódulos de siratro						Número de isolados
	A	B	C	D	E	F	
PASTAGEM (P)							
1	MR	>2	ácido	média a alta	sim	amarelada	31
2	MR	>2	neutro	média a alta	sim	branca	4
3	R	>2	neutro	média a alta	não	branca	35
4	R	>2	neutro	alta	sim	branca	31
5	R	>2	neutro	alta	não	amarelada	2
6	R	1-2	álcali	média a alta	não	branca	1
7	R	>2	ácido	alta	sim	amarelada	11
8	R	>2	neutro	média	não	rosa	1
9	R	1-2	neutro	baixa a média	não	rosa	2
10	I	1-2	álcali	alta	não	branca	21
11	I	1-2	neutro	alta	não	branca	6
12	L	1-2	álcali	média a alta	não	branca	67
13	L	<1	álcali	baixa	sim	amarelada	4
14	L	<1	ácido	baixa	sim	amarelada	29
15	L	>2	ácido	média a alta	não	amarelada	2
16	ML	<1	ácido	baixa	sim	amarelada	15

Características culturas: A (velocidade de crescimento, sendo MR muito rápido (1 dia para aparecimento de colônias isoladas), R rápido (2-3 dias), I intermediário (4-5 dias), L lento (6-10 dias), ML muito lento (>10 dias)), B (diâmetro da colônia, em mm), C (pH do meio de cultura), D (produção de goma), E (absorção de indicador), F (cor da colônia).

A figura 7 mostra o índice de diversidade de Shannon-Weaver baseado nas características culturais dos isolados de rizóbio nos três locais de cada SUT, e também o índice de diversidade calculado pelo número total de isolados de cada SUT. Analisando o índice por SUT, os menores valores de diversidade foram encontrados nos sistemas Monocultura e Capoeira, e os maiores para Floresta e Sistema Agroflorestal, concordando com a ocorrência e distribuição dos isolados de acordo com seu crescimento na figura 5. Quando calculamos o índice por local de cada SUT, os menores valores são encontrados nos locais de floresta. Isto é explicado pelo fato dos locais sob floresta apresentarem grupos morfológicos bem distintos, já os isolados de solos sob capoeira formam grupos morfológicos semelhantes nos diversos locais, e quando foram agrupados o



índice foi menor quando comparado com o índice para os isolados de floresta. Não houve correlação significativa entre número de isolados e índice de diversidade nos diferentes SUTs ( $r=-0,39ns$ ), ou seja, o tamanho da amostra não comprometeu o cálculo do índice de diversidade. O fato de se encontrar maior diversidade total sob Floresta pode estar ligado à adaptação de populações de rizóbio a estresses químicos e edáficos nos diversos locais, característica comum em rizóbio (Graham et al., 1992). Na natureza, a seleção de organismos é feita para sobrevivência e não para eficiência. No entanto, deve-se tomar cuidado com estas interpretações, uma vez que a diversidade obtida de rizóbio para uma certa condição está diretamente ligada à espécie de leguminosa utilizada como planta isca. Handley, Hedges e Beringer (1998) observaram que quanto maior o número de plantas utilizadas, maior foi a diversidade encontrada; porém, neste trabalho não foram isolados todos os nódulos das plantas.

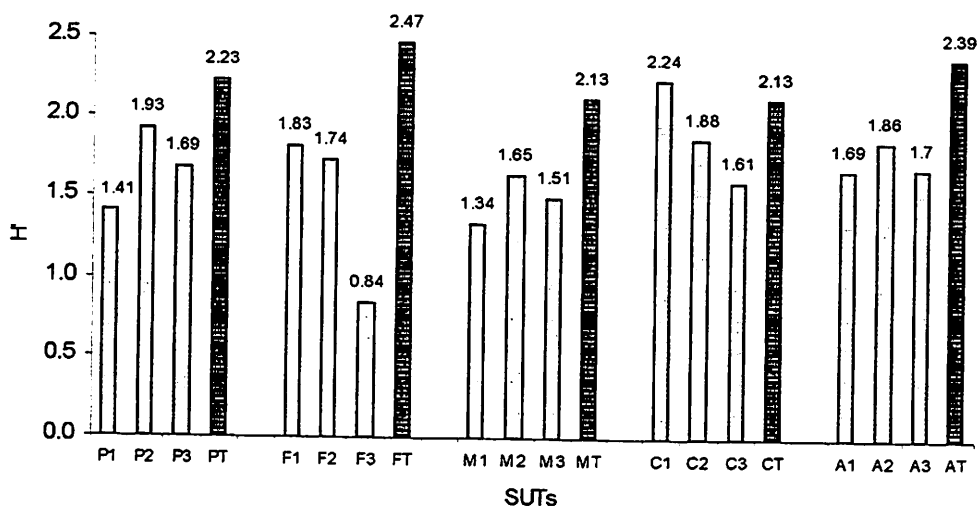


FIGURA 7. Índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) baseado nas características culturais para isolados de rizóbio nos três diferentes locais dos sistemas de uso da terra (SUTs): M (Monocultura), C (Capoeira), A (Sistema Agroflorestal), F (Floresta), P (Pastagem). Agrupamento por local ( $\square$ ) e agrupamento por SUT ( $\Sigma$  dos três locais) ( $\blacksquare$ ).

Os SUTs monocultura e capoeira apresentaram os menores valores de diversidade de populações de rizóbio, apesar de apresentarem densidade e eficiência semelhantes àquelas sob Pastagem (Tabela 4). Nesses sistemas, como já discutido anteriormente, não foram obtidos rizóbios de crescimento muito lento (Tabela 5 e Figura 4) e este fato fez com que o valor de diversidade fosse menor. Perdas de diversidade em sistemas agrícolas dominados por monoculturas são comuns na literatura (Coutinho et al., 1999; Lupwayi, rice e Clayton, 1998) e são respostas da seleção da população de rizóbios proporcionada pelas plantas hospedeiras, como já discutido.

O índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) e o número de perfis protéicos dos isolados de rizóbio de siratro de diferentes SUTs, em diferentes locais, se encontram na tabela 7. Os maiores índices de diversidade foram obtidos nos locais P1, F1 e A2, não se relacionando com os maiores índices calculados pelas características culturais. Verificou-se baixa diversidade na maioria dos locais, sendo que em A1, A3, M3, F2, F3, C2 e C3 encontrou-se somente um padrão de perfil para todos os isolados de crescimento rápido.

TABELA 7. Índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) e número de perfis eletroforéticos de proteínas obtidas por SDS-PAGE em diferentes sistemas de uso da terra (SUT).

SUT	Local*	$H'$	Número de perfis
Sistema Agroflorestral	A1	0	1
	A2	1,34	5
	A3	0	1
Monocultura	M1	1,00	3
	M2	1,00	4
	M3	0	1
Pastagem	P1	1,48	5
	P3	0,70	3
Floresta	F1	1,38	5
	F2	0	1
	F3	0	1
Capoeira	C1	0,41	2
	C2	0	1
	C3	0	1

\* Descrição dos locais encontra-se na tabela 1.

#### 4 CONCLUSÕES

A maior densidade e eficiência de populações de rizóbios na produção de matéria seca da parte aérea de siratro foram encontradas em solos sob pastagem. A menor densidade foi encontrada em solos sob sistema agroflorestral.

Solos sob floresta foram os que apresentaram menor fertilidade e menores valores de eficiência de populações de rizóbios, utilizando siratro como planta isca.

O índice de diversidade calculado pelas características culturais dos isolados de rizóbio em cada local dos solos sob floresta foi baixo quando comparado com os demais locais dos outros SUTs, mas foi maior quando comparado por SUT, indicando a presença de grupos morfológicos distintos nos três locais sob floresta. A capoeira apresentou locais com alto índice de

diversidade, mas quando agruparam-se os três locais, o índice encontrado foi menor quando comparado com a floresta, sistema agroflorestal e pastagem.

Com exceção da capoeira, nos sistemas de uso da terra estudados, foi capturado por siratro maior número de grupos de rizóbio com características de crescimento muito rápido a intermediário (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*) em relação aos de crescimento lento a muito lento (*Bradyrhizobium*). As leguminosas nativas dos diversos locais formaram simbiose predominantemente com *Bradyrhizobium*.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLANCHAR, R.W.; REHM, G.; CALDWELL, A.C. Sulfur in plant material digestion with nitric and perchloric acid. *Soil Science Society of America Proceedings*, Madison, v. 29, n. 1, p. 71-72, Jan./Feb. 1965.
- COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; LOVATO, A.; MAIA, A.H.N.; MANFIO, G.P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Applied Soil Ecology*, v.391, n.1, p.1-9, Mar. 1999.
- DENTON, M.D.; CONVENTRY, D.R.; BELLOTTI, W.D.; HOWIESON, J.G. Distribution, abundance and symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii from alkaline pasture soils in South Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v.40, n.1, p.25-35, Jan. 2000.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. *Manual de métodos de análise de solos*. 2.ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. 212p.
- EVERITT, B.S. *Cluster analysis*. New York: John Wiley & Sons, 1993. 170p.
- GAO, J.L.; SUN, J.G.; LI, Y.; WANG, E.T.; CHEN, W.X. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan Province, China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.44, p.151-158, 1994.

- GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, n.5, p.475-484, May 1992.
- HANDLEY, B.A.; HEDGES, A.J.; BERINGER, J.E. Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.10, n.2, p.241-249, Feb. 1998.
- HEAL, O.W.; INESON, P. Carbon and energy flow in terrestrial ecosystems: relevance to microflora. In: KLUG, M.J.; REDDY, C.A. (eds). **Current perspectives in microbial ecology**. Washington: American Society of Microbiology, 1984. p.394-404.
- JACKMAN, P.J.H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODEELLOW, M.; NINNIKIN, D. (eds). **Chemical methods in bacterial systematics**. London: Academic Press, 1985. p.115-129.
- JACKMAN, P.J.H. Microbial systematics based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: COLWELL, R.R.; GRIGORAVA, R. (eds). **Methods in microbiology**. London: Academic Press, 1987.
- JENKINS, M.B.; VIRGINIA, R.A.; JARREL, W.M. Rhizobial ecology of the woody legume mesquite (*Prosopis glandulosa*) in the Sonoran desert. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.1, p.36-40, Jan. 1987.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n.5259, p.680-685, Aug. 1970.
- LAWSON, K.; BARNET, Y.M.; MCGILCHRIST, C.A. Environmental factors influencing numbers of *R. leguminosarum* bv. trifolii and its bacteriophages in two field soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.5, p.1125-1131, May 1987.
- LUPWAYI, N.Z.; RICE, W.A.; CLAYTON, G.W. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n.13, p.1733-1741, Nov. 1998.
- MOREIRA, F.M.S.; FRANCO, A.A. Rhizobia-host interactions in tropical ecosystems in Brazil. In: SPRENT, J.I.; McKEY, D. (eds). **Advances in legume systematics 5: The Nitrogen Factor**. Kew: Royal Botanic Garden, 1994. p.63-74.

- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.16, p. 135-146, 1993.
- NORRIS, D.O. Observation on the nodulation status of rainforest leguminous species in Amazonic and Guyana. **Tropical Agriculture**, London, v.46, p.145-151, 1969.
- OLIVEIRA, V.M.O. **Diversidade genética de rizóbios em amostras ambientais analisadas através do uso de sondas moleculares e primers específicos**. Campinas: UNICAMP, 1999. 175p. (Tese- doutorado em Genética e Biologia Molecular).
- PRASAD, B.N.; KHAN, M.K.; AKAO, S. Competition between *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains NGR234 and CP283 for nodulation in siratro investigated with GUS reporter gene. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 630.
- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Genetic diversity of nifH gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analysed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.7, p.2770-2779, July 1998.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois Press, 1949.
- THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.1, p.19-28, Jan. 1991.
- TRINICK, M.J. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. **Journal of Applied Bacteriology**, New York, v.49, n.1, p.39-53, Jan. 1980.
- VETTORI, L. **Métodos de análises do solo**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1969. 24p. (Boletim Técnico 7).
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: **International Biological Programme Handbook no.15**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.

- WEAVER, R.W. ; FREDERICK, L.R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. I. Greenhouse studies. **Agronomy Journal**, Madison, n.2, v.66, p.229-232, Mar./Apr. 1974.
- WOOMER, P.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.7, p.1112-1116, July 1988.
- YOUSELF, A.N.; AL-NASSIRI, A.S.; AL-AZAWI, S.K.; ABDUL-HUSSAIN, N. Abundance of peanut rhizobia as affected by enviromental conditions in Iraq. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, n.3, p.319-396, 1987.

## CAPÍTULO 3

### **DIVERSIDADE FENOTÍPICA E SIMBIÓTICA ENTRE ISOLADOS DE RIZÓBIO DE *Vigna unguiculata* DE DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA NA AMAZÔNIA**

PEREIRA, E.G. Diversidade fenotípica e simbiótica entre isolados de rizóbio de *Vigna unguiculata* de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia. Lavras: UFLA, 2000. Cap. 4. 17p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)

#### **RESUMO**

Caupi é considerado uma planta promíscua quando em simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio denominadas rizóbio, sendo indicada em levantamentos de diversidade. Neste trabalho, caupi foi usado como planta isca para isolamento de rizóbio de solos sob diferentes sistemas de uso da terra da Amazônia (floresta, capoeira, pastagem, monocultura e sistema agroflorestal). A diversidade destes isolados foi avaliada através de características culturais em YMA e padrões de proteína total em gel de poliacrilamida (diversidade fenotípica) e através da eficiência simbiótica na produção de matéria seca de caupi (diversidade simbiótica) em vasos Leonard (casa de vegetação), comparado a dois tratamentos sem inoculação, com e sem adubação nitrogenada. O caupi mostrou-se adequado para estudo da diversidade dos isolados. Estes apresentaram grande variação na eficiência simbiótica com caupi, e o efeito da maioria foi superior ao da estirpe comercial BR 2001/SEMIA 6145 e da adubação nitrogenada com 300 mg dm<sup>-3</sup> de N, destacando-se os isolados UFLA 03-128, UFLA 03-84 e UFLA 03-129. Não houve relação entre o agrupamento de isolados por características culturais e a eficiência simbiótica dos isolados estudados. A análise do perfil protéico apresentou-se eficiente na discriminação dos isolados, mas foi menos discriminatória que a caracterização cultural, e 47% destes isolados foram similares a *Bradyrhizobium*, que apresentaram de média a alta eficiência simbiótica com caupi. Para a maioria dos isolados, não houve relação entre agrupamento por características culturais e agrupamento por perfil protéico, e nem efeito dos sistemas de uso de terra da Amazônia nestes agrupamentos.



## ABSTRACT

PEREIRA, E.G. Phenotypic and symbiotic diversity among *Vigna unguiculata* isolates from different land use systems in Amazon region. - Lavras: UFLA, 2000. Chap. 2. 17p. (Thesis - Doctorate in Soil and Plant Nutrition)

Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) is considered a promiscuous plant specie when established symbiotic relationship with nitrogen fixing bacteria named collectively as rhizobia. Thus it is recommended for studies aiming to evaluate rhizobia diversity, and it was used as trap host for rhizobia isolation from different land use systems in Amazon region (forest, fallow, pasture, crop and agroforestry system). Isolates phenotypic diversity was evaluated by cultural characteristics on YMA and total protein patterns by polyacrylamide gel electrophoresis. Symbiotic efficiency of isolates was determined by plant dry matter production at Leonard jars at greenhouse conditions compared to two controls without inoculation and with and without mineral nitrogen. Cowpea showed to be a promiscuous host as a high diversity was obtained by all characterizations. The majority of the isolates were more efficient in the dry matter production than recommended strain BR 2001/SEMIA 6145 and control receiving mineral nitrogen ( $300 \text{ mg dm}^{-3}$ ), specially isolates UFLA 03-128, UFLA 03-84 and UFLA 03-129. There was no relationship among clusters obtained by cultural and symbiotic characterization. Total protein patterns by SDS-PAGE discriminate reasonably the isolates however less than cultural characterization. Forty seven per cent of isolates can be classified as *Bradyrhizobium* and they showed medium to high symbiotic efficiency with cowpea. There was no relationship among clustering by cultural characteristics and protein patterns and neither LUS effects on them.

## 1 INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata*) é uma leguminosa amplamente cultivada na Região semi-árida e no Norte do Brasil, bastante tolerante a estresse de temperatura e umidade e usado no consumo humano como uma importante fonte de proteína (Ferreira et al., 2000). Esta leguminosa forma simbiose com bactérias diazotróficas, vulgarmente denominadas de rizóbio, e é muito dependente da fixação biológica de nitrogênio na aquisição de nitrogênio, podendo fixar 66 a 120 kg N ha<sup>-1</sup>, com 54 a 70 % do N originado do N fixado (Awonaike, Kumarasinghe e Danso, 1990; Giller e Wilson, 1991). É uma planta bastante promíscua, sendo nodulada por uma ampla faixa de bactérias simbiontes (Lewin et al., 1987; Martins, neves e Rumjanek, 1997), tanto de crescimento rápido quanto lento. Por esta característica peculiar, o caupi é indicado como planta isca em experimentos relacionados a estudos de densidade e diversidade de rizóbios de solos.

A diversidade de rizóbio em diferentes ecossistemas é alta (Haukka e Lindström, 1994; van Rossum et al., 1995). Moreira et al. (1993) verificaram que a maioria dos isolados de rizóbio de espécies florestais da Mata Atlântica e Amazônia apresentava características culturais de crescimento lento e alcalinização de meio, pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* sp, e que alguns isolados não se agruparam com espécies conhecidas, podendo ser, provavelmente, novas espécies. Há um crescente interesse no conhecimento da diversidade de rizóbio pelo fato da mesma ser uma fonte de recursos genéticos para a seleção de novos isolados com capacidade de nodularem eficientemente leguminosas específicas, além de fornecer subsídios importantes para que se introduzam com sucesso estirpes inoculantes em solo com população nativa estabelecida.

Existem poucos estudos (Coutinho et al., 1999; Oliveira et al., 1999) demonstrando os efeitos dos sistemas de uso da terra em solos tropicais sobre a diversidade de rizóbio. Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar a diversidade simbiótica e fenotípica (características culturais e perfis protéicos) de isolados de rizóbio obtidos de diferentes sistemas de uso da terra da Amazônia, utilizando o caupi como planta isca.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Obtiveram-se amostras de solo coletadas entre abril e maio de 1997 de diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) da Amazônia (Tabela 1), e procedeu-se a inoculação com 1 ml destas amostras de solo diluídas ( $5^{-1}$  a  $5^{-6}$ ) em solução salina 0,55%, utilizando caupi como planta isca, em sacos plásticos estéreis da Millipore com solução nutritiva de Jensen ( $\text{CaHPO}_4$  1g  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2 g  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2g  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$  0,2g  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{FeCl}_3$  0,1g  $\text{L}^{-1}$ ) estéril.

Para obtenção dos isolados de rizóbio, os nódulos foram desinfectados superficialmente com álcool 70%, cloreto de mercúrio e lavados 10 vezes em água esterilizada, sendo, posteriormente, macerados assepticamente em meio YMA. Após repicagem para novas placas com YMA, as colônias dos isolados foram caracterizadas morfológicamente. As características analisadas foram as seguintes: tempo para aparecimento das primeiras colônias isoladas (crescimento rápido (CR)- 2-3 dias; crescimento intermediário (CI)- 4-5 dias; crescimento lento (CL)- 6-10 dias; crescimento muito lento (CML)- mais que 10 dias), diâmetro das colônias, alteração do pH do meio, produção de goma, absorção de indicador e coloração das colônias. A tabela 1 mostra os isolados obtidos e os respectivos locais, nos diferentes SUTs. Quarenta e um isolados de rizóbio foram caracterizados culturalmente.

**TABELA 1. Isolados obtidos e os respectivos locais nos diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) da Amazônia.**

Identificação dos isolados	SUTs*	Local de coleta dos nódulos
UFLA 03-22, UFLA 03-24/ UFLA 03-25	Mandioca (M1)	Theobroma- RO
UFLA 03-31, UFLA 03-32, UFLA 03-33, UFLA 03-34, UFLA 03-35, UFLA 03-36, UFLA 03-37, UFLA 03-38, UFLA 03-39, UFLA 03-321, UFLA 03-322	Capoeira (C1)	Theobroma- RO
UFLA 03-41, UFLA 03-42, UFLA 03-44, UFLA 03-46	Capoeira (C2)	Theobroma- RO
UFLA 03-61, UFLA 03-63, UFLA 03-65 ;	Floresta (F1)	Theobroma- RO
UFLA 03-81, UFLA 03-82, UFLA 03-83, UFLA 03-84, UFLA 03-85	Pastagem (P1)	Ji-paraná- RO
UFLA 03-91, UFLA 03-92, UFLA 03-95, UFLA 03-96	Sistema Agroflorestal (A2)	Ji-paraná- RO
UFLA 03-121, UFLA 03-122, UFLA 03-123, UFLA 03-124, UFLA 03-125, UFLA 03-126, UFLA 03-127, UFLA 03-128, UFLA 03-129, UFLA 03- 1211, UFLA 03-1213	Pastagem (P3)	Pedro Peixoto- AC

\*Descrição dos locais e resultados de análise de fertilidade das amostras de solo nas tabelas 1 e 2 do capítulo 2.

Para avaliação da diversidade simbiótica de 26 isolados de rizóbio, instalou-se um experimento em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições. As parcelas experimentais foram vasos Leonard, contendo areia e vermiculita na proporção 2:1 e solução nutritiva de Jensen sem nitrogênio, com os seguintes tratamentos: inoculação individual com 26 isolados obtidos; inoculação com a estirpe recomendada para caupi (BR 2001/SEMIA 6145), inoculação com a estirpe INPA 0311b, adubação nitrogenada em duas doses (240 e 300 mg kg<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) e testemunha (sem inoculação e sem adubação). As plantas foram colhidas na floração, aos 50 dias da semeadura, procedendo-se a determinação da matéria seca da parte aérea (após peso constante em estufa de circulação forçada de ar, a 60-70°C), número e peso de nódulos secos.

Trinta e quatro isolados, junto com as estirpes INPA 0311B (*Bradyrhizobium* spp.), considerada eficiente em caupi (Magalhães, 1986); BR 2001/SEMIA 6145 (*Bradyrhizobium* spp., recomendada comercialmente como inoculante de caupi); BR 29 (estirpe referência de *Bradyrhizobium elkanii*), BR 111 (estirpe tipo de *B. japonicum*) e BR 10051 (estirpe referência de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*), foram analisados quanto ao perfil de proteína total por SDS-PAGE. Para isso, os isolados foram multiplicados em meio TY líquido durante 4 dias, a 30°C, sob agitação constante. Após centrifugação, as células foram solubilizadas em SDS e a proteína total submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), pelo método Laemmli (1970), com modificações descritas por Jacknam (1985 e 1987).

Os resultados de matéria seca da parte aérea, número e peso de nódulos secos foram submetidos à análise de variância e teste de médias, utilizando o programa estatístico SANEST (Zonta, Machado e Silveira Júnior, 1984), enquanto o agrupamento dos perfis protéicos em dendograma foi feito pelo método UPGMA (Everitt, 1993) através dos programas NTSYS 1.80 e

STATISTICA 5.0 (Slice, Kim e Walker, 1994), considerando a presença ou ausência de bandas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de matéria seca da parte aérea (MSPA), número e peso de nódulos secos encontram-se na tabela 2. Treze isolados proporcionaram valores de MSPA superiores aos apresentados pela estirpe recomendada BR 2001/SEMIA 6145 (*Bradyrhizobium* spp.) e resultados têm mostrado que a maioria dos isolados obtidos através desta planta isca apresenta características culturais semelhantes à estirpe recomendada, ou seja, crescimento lento e alcalinização de meio específico (Thies et al., 1991; Martins, Neves e Rumjanek, 1997). Plantas inoculadas com os isolados UFLA 03-128, UFLA 03-84 e UFLA 03-129 apresentaram os maiores pesos de parte aérea, quando comparadas àquelas que receberam 300 mg dm<sup>-3</sup> de N ou aos demais tratamentos, demonstrando alta eficiência simbiótica destes isolados. A figura 1 mostra plantas de caupi adubadas com N, inoculadas com a estirpe INPA 0311B, inoculadas com o isolado UFLA 03-129 e testemunha.

Estes isolados proporcionaram também grande massa de nódulos, apesar dos resultados variarem muito entre isolados. Houve correlação significativa entre MSPA e peso de nódulos secos ( $r=0,55^{**}$ ) e nenhuma entre MSPA e número de nódulos ( $r=0,12ns$ ). Os isolados UFLA 03-44 e UFLA 03-95 foram os menos eficientes e as plantas inoculadas apresentaram produção de matéria seca da parte aérea sem diferença estatística daquelas testemunhas, sem N e não inoculadas.

TABELA 2. Matéria seca da parte aérea (MSPA), peso e número de nódulos de caupi inoculado com diferentes isolados de rizóbio, obtidos da Região Amazônica.

Tratamento	MSPA (g)	Peso de nódulos secos (g)	Número de nódulos
UFLA 03-128	9,56A	0,681AB	142ABC
UFLA 03-84	9,47A	0,754A	197ABC
UFLA 03-129	9,41A	0,744A	171ABC
N 300 mg kg <sup>-1</sup>	8,42AB	0,000C	0D
UFLA 03-32	8,28AB	0,764A	119ABC
UFLA 03-322	8,12AB	0,731A	158ABC
UFLA 03-24	7,92ABC	0,667AB	142ABC
N 240 mg kg <sup>-1</sup>	7,49ABC	0,000C	0D
UFLA 03-35	7,47ABC	0,496ABC	97ABC
UFLA 03-39	7,44ABC	0,516ABC	102ABC
UFLA 03-1213	7,03ABC	0,744A	169ABC
INPA 0311B	7,01ABC	0,782A	238AB
UFLA 03-36	6,93ABC	0,739A	117ABC
UFLA 03-121	6,20ABC	0,704AB	205ABC
UFLA 03-33	6,03ABC	0,537ABC	153ABC
UFLA 03-123	5,74ABCD	0,413ABC	159ABC
UFLA 03-25	5,50ABCD	0,546ABC	162ABC
UFLA 03-1211	5,17ABCD	0,627AB	110ABC
UFLA 03-22	5,02ABCD	0,403ABC	76BC
UFLA 03-37	5,00ABCD	0,382ABC	71BC
UFLA 03-124	4,96ABCD	0,479ABC	95ABC
UFLA 03-83	4,77ABCD	0,510ABC	100ABC
BR 2001	4,53ABCD	0,292ABC	108ABC
UFLA 03-321	4,48ABCD	0,363ABC	60C
UFLA 03-41	4,29ABCD	0,382ABC	306A
UFLA 03-126	3,40BCD	0,349ABC	104ABC
UFLA 03-127	3,34BCD	0,450ABC	92ABC
UFLA 03-63	3,00BCD	0,404ABC	226ABC
UFLA 03-44	2,38CD	0,297ABC	147ABC
UFLA 03-95	2,21CD	0,164BC	142ABC
TESTEMUNHA	0,25D	0,000C	0D

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Os quarenta e um isolados de rizóbio obtidos foram agrupados conforme suas características culturais, cujo dendograma de dissimilaridade se encontra na figura 2. Formaram-se dois grandes grupos de acordo com estas características, sendo um agrupando a estirpe tipo de *Bradyrhizobium japonicum* e 21 isolados, e outro com a estirpe tipo de *Rhizobium tropici* e 20 isolados, comprovando a

promiscuidade da planta isca utilizada (Lewin et al., 1987; Martins, Neves e Rumjanek, 1997). A distribuição porcentual dos isolados de caupi de acordo com o tempo de crescimento nos diferentes SUTs não teve relação com a distribuição dos isolados de siratro. Na monocultura, 100% dos isolados capturados por caupi foram de crescimento lento. Na capoeira, 67% dos isolados foram de crescimento muito rápido, rápido e intermediário e, 33% foram de crescimento lento. Na floresta, 33% foram de crescimento rápido e 67% de crescimento lento. Na pastagem, 53% foram de crescimento rápido e intermediário e 47% de crescimento lento. No sistema agroflorestal, 25% foram de crescimento rápido e 75% de crescimento lento.

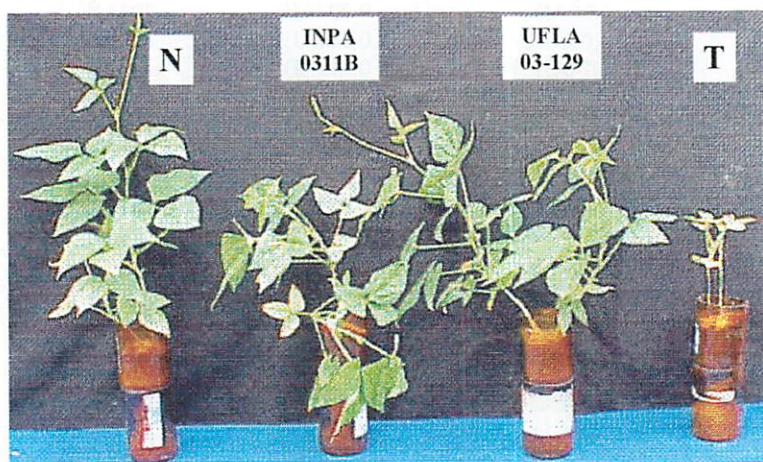


FIGURA 1. Plantas de caupi adubadas com N, inoculadas com a estirpe INPA 0311B, inoculadas com o isolado UFLA 03-129 e testemunha sem adubação nitrogenada e sem inoculação.

A 60% de similaridade, 9 grupos foram formados, sendo o grupo 1 com 5 isolados (UFLA 03-81, UFLA 03-91, UFLA 03-31, UFLA 03-65, UFLA 03-82), o grupo 2 com a estirpe de *Rhizobium* e 6 isolados (UFLA 03-38, UFLA 03-



127, UFLA 03-46, UFLA 03-37, UFLA 03-34), o grupo 3 com 6 isolados (UFLA 03-122, UFLA 03-124, UFLA 03-123, UFLA 03-121, UFLA 03-126, UFLA 03-33), o grupo 4 com 4 isolados (UFLA 03-129, UFLA 03-321, UFLA 03-322, UFLA 03-32), o grupo 5 com 2 isolados (UFLA 03-1213, UFLA 03-1211), o grupo 6 com a estirpe de *Bradyrhizobium* e 8 isolados (UFLA 03-44, UFLA 03-42, UFLA 03-83, UFLA 03-63, UFLA 03-84, UFLA 03-95, UFLA 03-61, UFLA 03-24), o grupo 7 com apenas 1 isolado (UFLA 03-128), o grupo 8 com 3 isolados (UFLA 03-125, UFLA 03-35, UFLA 03-25) e o grupo 9 com 6 isolados (UFLA 03-96, UFLA 03-85, UFLA 03-83, UFLA 03-92, UFLA 03-39, UFLA 03-22). O grupo 7 teve a presença exclusiva do isolado UFLA 03-128, evidenciando suas características culturais diferenciadas (crescimento muito lento, colônias de 1 a 2 mm, alcalinização de meio, baixa produção de goma, não absorção de indicador e cor amarela), a 60% ou mais de similaridade. Cabe lembrar que este isolado foi o que apresentou maior eficiência simbiótica com o caupi, junto com os isolados UFLA 03-84 e UFLA 03-129 (Tabela 1), que apresentaram baixa (37%) ou nenhuma similaridade com a UFLA 03-128, respectivamente, de acordo com as características culturais. Os isolados apresentaram grande variação na eficiência simbiótica. Como exemplo, temos os isolados UFLA 03-84, mais eficiente, e UFLA 03-95, menos eficiente, que apresentaram mais de 80% de similaridade de acordo com as características culturais.

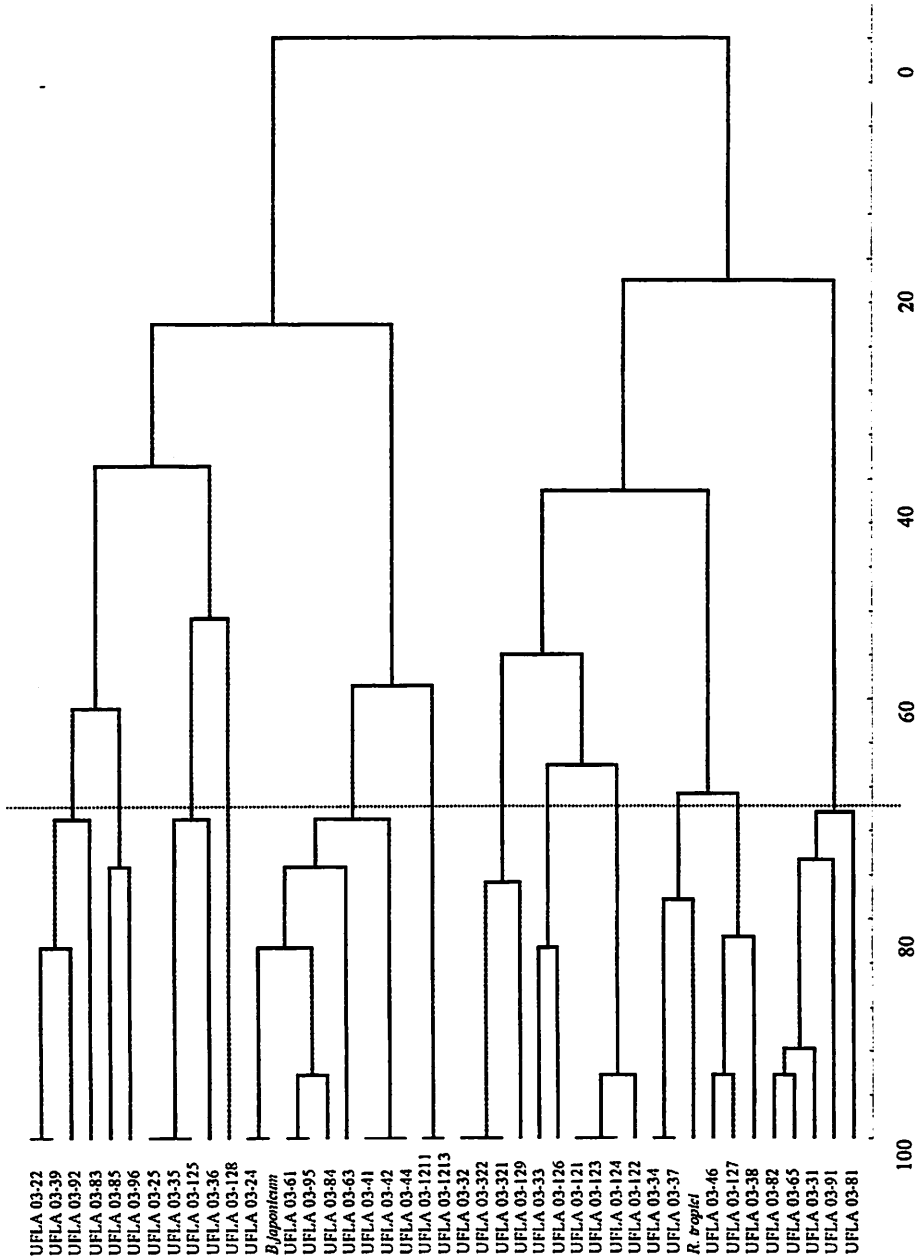


FIGURA 2. Dendrograma de similaridade entre isolados de rizóbio de caupi, construído com base nas suas características culturais (taxa de crescimento, cor e diâmetro da colônia, absorção de indicador, alteração do pH do meio e produção de goma).

Fez-se um agrupamento dos isolados de rizóbio conforme os perfis protéicos (Figura 3), construindo-se posteriormente um dendograma de similaridade (Figura 4).

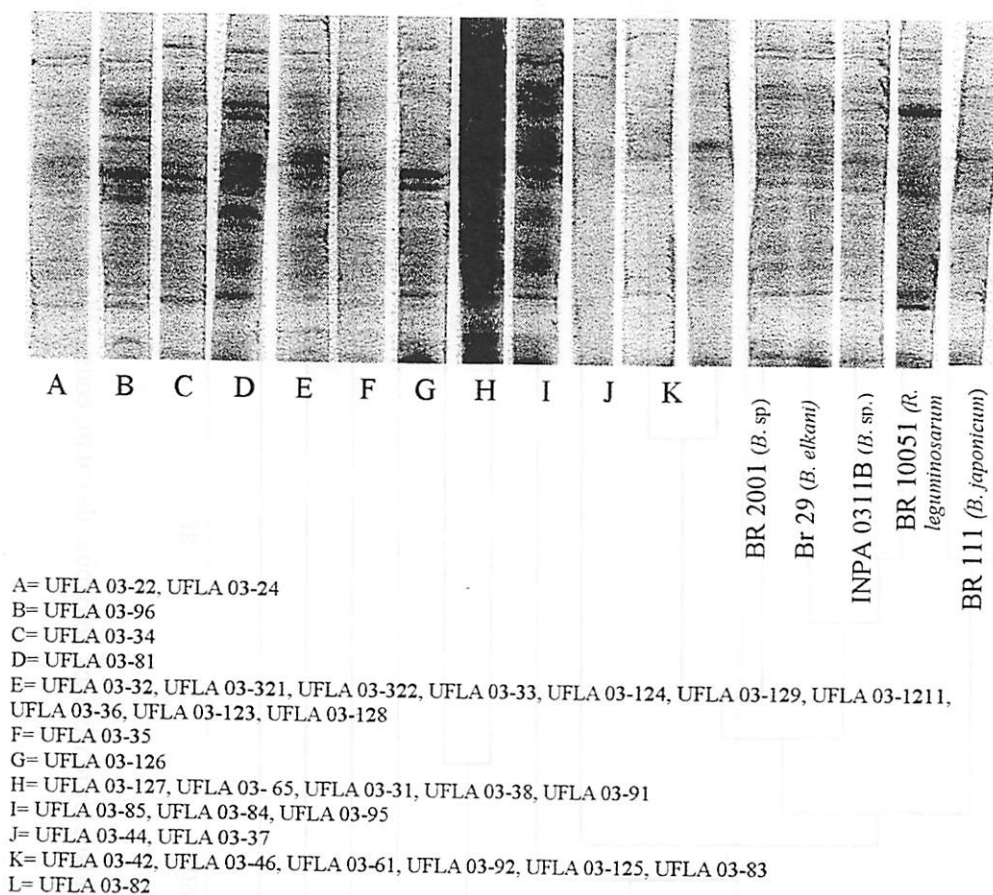


FIGURA 3. Perfis de proteína total dos grupos de isolados de rizóbio capturados por caupi e da BR 111, INPA 0311B, BR 10051, BR 2001 e BR 29.

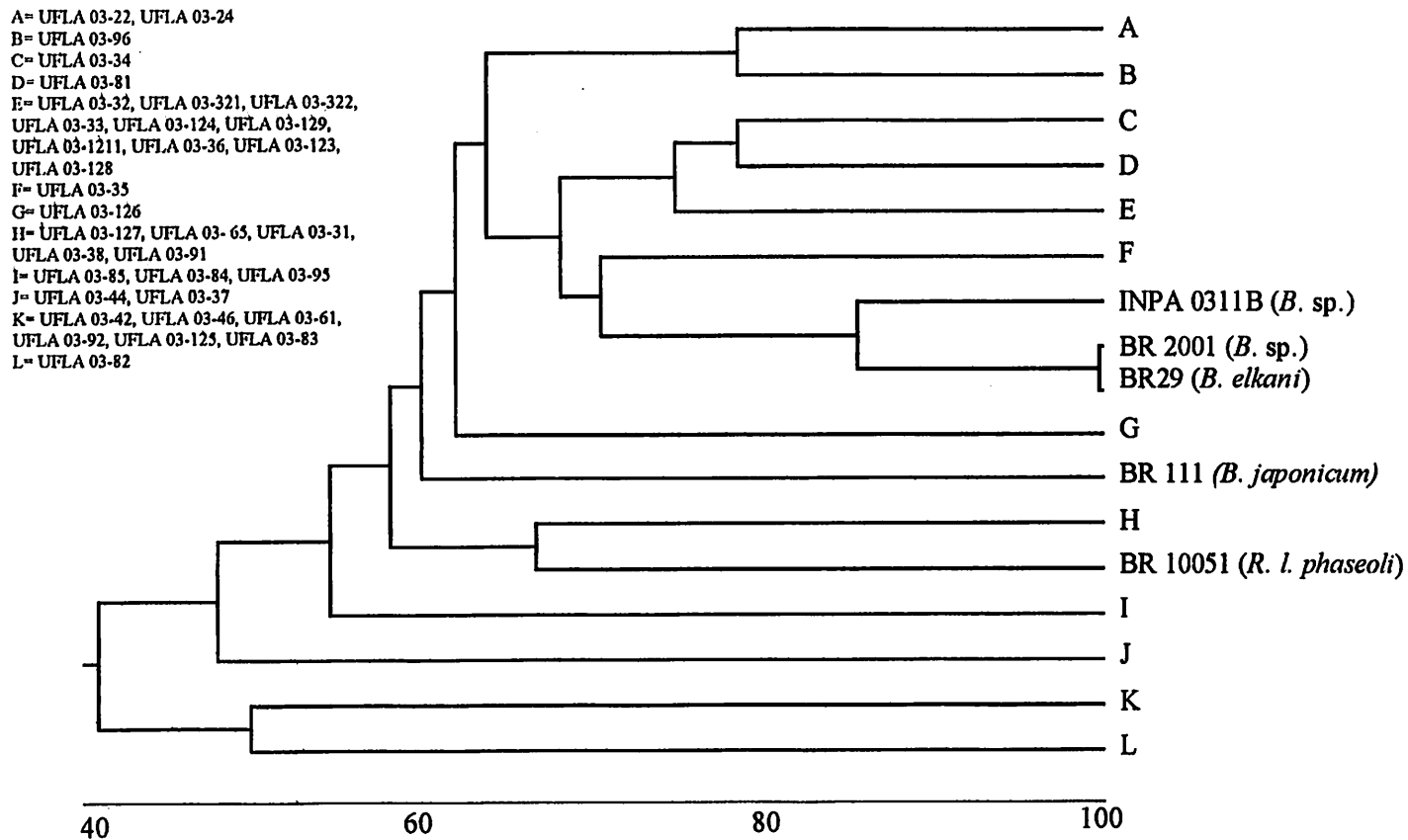


FIGURA 4. Dendrograma de similaridade entre isolados de rizóbio de caupi, construído com base nos perfis protéicos.

Analisando o dendograma de similaridade formado pelo agrupamento de perfis protéicos dos isolados (Figura 4), verificou-se que as estirpes BR 2001 (*Bradyrhizobium* sp.) e BR 29 (*B. elkanii*), isoladas de solo do sudeste brasileiro, foram 100% similares. A 85% de similaridade, estas duas estirpes foram agrupadas com a INPA 0311B (*Bradyrhizobium* sp.), isolada da Amazônia, e este grupo apresentou aproximadamente 60% de similaridade com a outra estirpe de *Bradyrhizobium*, a BR 111 (*B. japonicum*, oriunda dos USA). Dezesesseis isolados de rizóbio pertencentes aos grupos A, B, C, D, E, G e principalmente F, foram agrupados com as estirpes de *Bradyrhizobium* (INPA 0311B, BR 2001 e BR 29) a 62% de similaridade ou mais. Portanto, todos os isolados com características de *Bradyrhizobium* foram mais similares às estirpes isoladas de solos brasileiros do que à BR 111. Nestes grupos, a maioria dos isolados apresentou média a alta eficiência simbiótica com caupi (Tabela 2).

Os grupos de isolados de rizóbio I, J, K e L (12 isolados) foram os que apresentaram menor similaridade dos demais. O grupo I apresentou isolados de alta (UFLA 03-84) e baixa eficiência (UFLA 03-95) simbiótica (Tabela 2), mostrando que não há uma relação entre agrupamento protéico e características simbióticas. Sete isolados dos grupos L e K se agruparam com 50% de similaridade e foram os que mais se distanciaram dos demais isolados e estirpes. Destes, somente o isolado UFLA 03-83 foi avaliado simbioticamente, com média eficiência (Tabela 2).

Para a maioria dos grupos de isolados de rizóbio estudados, não se verificou relação entre o agrupamento por características culturais e agrupamento por perfil protéico (Figuras 2 e 4). Também não houve relação entre agrupamento de isolados por perfil protéico ou por características culturais e os diferentes sistemas de uso da terra da Amazônia, indicando a alta diversidade das populações de rizóbio nesses sistemas.

## 4 CONCLUSÕES

Os isolados de rizóbio apresentaram grande variação na eficiência simbiótica com caupi, e o efeito da maioria foi superior ao da estirpe comercial BR 2001/SEMIA 6145 e da adubação nitrogenada com  $300 \text{ mg dm}^{-3}$  de N, destacando-se os isolados UFLA 03-128, UFLA 03-84 e UFLA 03-129.

O caupi mostrou-se altamente promíscuo pela análise de agrupamento dos isolados por características culturais devido à grande diversidade de rizóbio proporcionada em amostras de solo dos diferentes sistemas de uso da terra, na Amazônia, com características de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

Não houve relação entre o agrupamento de isolados por características culturais e a eficiência simbiótica dos isolados estudados.

A análise do perfil protéico apresentou-se eficiente na discriminação dos isolados, mas foi menos discriminatória que a caracterização cultural e 47% destes isolados foram similares a *Bradyrhizobium*, que apresentaram de média a alta eficiência simbiótica com caupi.

Para a maioria dos isolados, não houve relação entre agrupamento por características culturais e agrupamento por perfil protéico, e nem efeito dos sistemas de uso de terra da Amazônia nestes agrupamentos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AWONAIKE, K.O.; KUMARASINGHE, K.S.; DANSO, S.K.A. Nitrogen Fixation and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) as influenced by cultivar and *Bradyrhizobium* strain. *Field Crops Research*, Amsterdam, v.24, p.163-171, 1990.
- COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; LOVATO, A.; MAIA, A.H.N.; MANFIO, G.P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.391, n.1, p.1-9, 1999.
- EVERITT, B.S. *Cluster analysis*. New York: John Wiley & Sons, 1993. 170p.
- FERREIRA, E.P.B.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Selection of an efficient and competitive rhizobia inoculant for cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) cultivated in the Brazilian Semi-Arid Region. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds) *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*, Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 617.
- GILLER, K.E.; WILSON, K.J. *Nitrogen fixation in tropical cropping systems*. Wallingford: C.A.B. International, 1991. 313p.
- HAUKKA, K.; LINDSTRÖM, K. Pulsed-field gel electrophoresis for genotypic comparison of *Rhizobium* bacteria that nodulate leguminous trees. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.119, p.215-220, 1994.
- JACKMAN, P.J.H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (eds). *Chemical methods in bacterial systematics*. London: Academic Press, 1985. p.119-129.
- JACKMAN, P.J.H. Microbial systematics based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: COLWELL, R.R.; GRIGORAVA, R. (eds). *Methods in microbiology*. London: Academic Press, 1987.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, n.4259, p.680-685, Aug. 1970.
- LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, Z.A.; WONG, C.H.; NELSON, L.; MANEN, J.F.; STANLEY, J.; DOWLING, D.N.; DÉNARIE, J.; BROUGHTON, W.J. Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v.8, p.447-459, 1987.

- MAGALHÃES, F.M.M. O estado atual do conhecimento sobre a fixação biológica de nitrogênio na Amazônia. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1984, Belém. Anais... Belém: EMBRAPA-CPATU, 1986. v.1., p.499-512.
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east Region of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.1005-1010, May/June 1997.
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v.16, p. 135-146, 1993.
- OLIVEIRA, V.M.; COUTINHO, H.L.C.; SOBRAL, B.W.S.; GUIMARÃES, C.T.; VAN ELSAS, J.D.; MANFIO, G.P. Discrimination of *Rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v.28, n.2, p.137-141, Feb. 1999.
- SLICE, D.E.; KIM, J.; WALKER, J. NTSYS-Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Versão 1.80. 1994.
- THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field grown legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.57, n.1, p.19-28, Jan. 1991.
- VAN ROSSUM, D.; SCHUURMANS, F.P.; GILLIS, M.; MUYOTCHA, A.; VAN VERSEVELD, H.W.; STOUTHAMER, A.H.; BOOGERD, F.C. Genetic and Phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaeae* L.) roots. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.61, n.7, p.1599-1609, July 1995.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Sistemas de análise estatística para microcomputadores (SANEST). Pelotas: UFPel-Departamento de Matemática e Estatística, 1984. 151p.



## CAPÍTULO 4

### DIVERSIDADE SIMBIÓTICA, FENOTÍPICA E GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE RIZÓBIO DE *Phaseolus vulgaris* L. DA REGIÃO AMAZÔNICA

#### RESUMO

PEREIRA, E.G. Diversidade simbiótica, fenotípica e genética entre isolados de rizóbio de *Phaseolus vulgaris* L. da Região Amazônica. Lavras: UFLA, 2000. Cap. 4. 15p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)

*Phaseolus vulgaris* é uma planta hospedeira altamente promiscua, que pode ser nodulada pelo menos por 8 espécies de rizóbio. As principais limitações para o aumento da fixação biológica de nitrogênio (FBN) relacionadas a rizóbios de feijoeiro são a instabilidade genética, baixa competitividade das estirpes inoculantes com a população indígena, que é geralmente ineficiente, e sensibilidade aos fatores ambientais, tais como acidez do solo e altas temperaturas. Assim, populações nativas de solos ácidos de regiões tropicais podem ser uma importante fonte de recursos genéticos para seleção de estirpes adaptadas a esses estresses. Para verificar a diversidade genética, fenotípica e simbiótica de estirpes de rizóbio nativas nodulando feijoeiro em dois locais em Theobroma, RO, na Região Amazônica, utilizaram-se as metodologias de PCR-RFLP (padrões de restrição com as enzimas Alu I, Hae I, Hinf III e Rsa I do fragmento 16S rRNA), perfis protéicos (SDS-PAGE) e produção de matéria seca da parte aérea de feijoeiro cv. Carioca, em vasos Leonard. Os padrões de restrição 16S rDNA indicaram que as enzimas Alu I e Hae III foram as mais discriminatórias, embora a maioria dos isolados apresentaram o mesmo padrão de restrição. Todos os 42 isolados apresentaram mesmas características culturais, com crescimento rápido, sem alteração de pH do meio, alta produção de goma e cor branca. Pelo perfil protéico, formaram-se 3 grupos com níveis de similaridade superiores a 90% e 3 isolados com posições distintas (UFLA 02-139, UFLA 02-113 e UFLA 02-63), sendo todos com maior similaridade à estirpe *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Dos 14 isolados avaliados para produção de matéria seca da parte aérea, 13 foram mais eficientes que a estirpe recomendada para a cultura (BR 322/CIAT 899), com destaques para os isolados UFLA 02-127 e UFLA 02-68.

## ABSTRACT

PEREIRA, E.G. Symbiotic, phenotypic and genetic diversity among rhizobia isolated from *Phaseolus vulgaris* L. in Amazon Region. Lavras: UFLA, 2000. Chap. 3. 15p. (Thesis of Doctorate in Soil and Plant Nutrition)

*Phaseolus vulgaris* is a highly promiscuous host that can be nodulated by at least 8 rhizobia species. Main limitations for improvement of biological nitrogen fixation related to rhizobia are the genetic instability, low competitiveness of introduced (inoculant) strains with native populations, usually inefficient, and sensitiveness to environmental factors as soil acidity and high temperature. Thus, native populations of acid tropical soils can be an important genetic resource for selection of rhizobia strains adapted to these stresses. Genetic, phenotypic and symbiotic diversity among isolates of bean plantings at Theobroma, Amazon region, were studied by the following methodologies: restriction patterns with enzymes Alu I, HaeI, Hinf III and Rsa I of 16 S rRNA amplified fragments, total protein patterns by polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and shoot dry matter production of *Phaseolus vulgaris* var. carioca at Leonard jars. Restriction patterns with enzymes AluI and Hae III were more discriminatory among strains although all isolates present the same restriction patterns. All 42 isolates showed the same cultural characteristics on YMA : fast growth, high exopolissacharide production and no change of medium pH. Three groups at similarity levels higher than 90% and three unclustered strains were obtained by SDS-PAGE of total proteins, being all more similar to *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. Thirteen out of fourteen isolates produced more shoot dry matter than the recommended strain CIAT 899, specially isolates UFLA 02-127 and UFLA 02-68.

## 1 INTRODUÇÃO

*Phaseolus vulgaris* é uma planta hospedeira altamente promiscua, que pode ser nodulada por 8 espécies de rizóbio: *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* (Jordan, 1984), *R. (Mesorhizobium) loti* (Jordan, 1984), *R. (Sinorhizobium) fredii* (Scholla e Elkan, 1984), *R. (Mesorhizobium) huakuii* (Chen et al., 1991), *R. tropici* (Martinez-Romero et al., 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. giardinii* e *R. gallicum* (Amarger et al., 1997). As principais limitações na fixação biológica de nitrogênio (FBN) relacionadas a rizóbios de feijoeiro são atribuídas à instabilidade genética, baixa competitividade das estirpes inoculantes com a população indígena, que é geralmente ineficiente, e sensibilidade aos fatores ambientais, tais como acidez do solo e altas temperaturas (Hungria et al., 1997).

*R. tropici* tem sido considerada a espécie mais promissora na seleção de estirpes usadas como inoculante por sua estabilidade genética, tolerância à acidez e altas temperaturas e ocorrência em regiões tropicais. Três estirpes de *R. tropici* têm sido atualmente recomendadas oficialmente como inoculantes à cultura do feijoeiro, PRF 81 (SEMIA 4080), CIAT 899 (SEMIA 4077) e SEMIA 4064. Porém, nem sempre os resultados de FBN são positivos, o que pode ser ocasionado pela competição com a população nativa. Porém, resultados satisfatórios de nodulação e produtividade foram obtidos utilizando as estirpes recomendadas (RELARE, 2000). Mercante et al. (1998) verificaram que 36% dos isolados de rizóbio nodulantes de feijoeiro em solos de cerrado poderiam ser classificados como *R. tropici*. Assim, estudos são necessários para caracterizar a população indígena de rizóbios que nodulam o feijoeiro de regiões tropicais com altas temperaturas e acidez do solo, geralmente consideradas fator limitante ao aumento da FBN nessa espécie e que podem, também, representar importante fonte de recursos genéticos para seleção de estirpes adaptadas a estas condições.

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genotípica, fenotípica e simbiótica de populações de rizóbio nativas nodulantes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) na Região Amazônica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* cv. carioca) não inoculado foram coletados entre abril e maio de 1997 de dois diferentes locais no município de Theobroma (RO), em áreas recém desmatadas. No local 1 foram coletados 30 nódulos e no local 2, 122 nódulos. As características químicas e físicas do solo de cada local foram as seguintes: Área 1: pH 6,6; P e K, 14 e 41 mg dm<sup>-3</sup>, respectivamente; Ca, Mg e Al 4,0, 1,7 e 0,0 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, respectivamente; carbono, matéria orgânica, areia, silte e argila 9, 16, 500, 150 and 350 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Área 2: pH 4,7; P e K 1 e 39 mg dm<sup>-3</sup>, respectivamente; Ca, Mg e Al 1,0, 0,6 e 0,9 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, respectivamente; carbono, matéria orgânica, areia, silte e argila 11, 19, 420, 150 e 430 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Os nódulos foram armazenados em recipientes contendo sílica gel para transporte até o laboratório.

Para obtenção dos isolados de rizóbio, os nódulos foram desinfetados superficialmente com álcool 70%, cloreto de mercúrio e lavados 10 vezes em água esterilizada, sendo, posteriormente, macerados assepticamente em meio YMA. Após repicagem para novas placas com YMA, as colônias dos isolados foram caracterizadas morfológicamente. As características analisadas foram as seguintes: tempo (em dias) para aparecimento das primeiras colônias isoladas, diâmetro das colônias, alteração do pH do meio, produção de goma, absorção de indicador e coloração das colônias.

Todos os isolados obtidos foram previamente autenticados em feijoeiro em condições de laboratório em meio Jensen ( $\text{CaHPO}_4$  1g L<sup>-1</sup>,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2g L<sup>-1</sup>,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2g L<sup>-1</sup>,  $\text{NaCl}$  0,2g L<sup>-1</sup>,  $\text{FeCl}_3$  0,1g L<sup>-1</sup>) estéril, em sacos plásticos Millipore, antes da conservação em tubos com meio YMA inclinado cobertos com uma camada de 4 ml de vaselina estéril, em geladeira. Os isolados foram também crescidos em meio YMA líquido, com posterior armazenamento em tubos eppendorff com glicerol 20%, em deep freezer. Por razões ainda não identificadas, somente 42 isolados de rizóbio permaneceram viáveis. Estes foram estudados quanto à diversidade fenotípica através do padrão de proteína total (SDS-PAGE), sendo 14 deles utilizados nos estudos de eficiência em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Carioca.

Para estudos de eficiência dos 14 isolados de rizóbio, instalou-se um experimento com delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento. Os tratamentos foram: inoculação de cada isolado individualmente, inoculação da estirpe comercial CIAT 899/BR 322, tratamento com nitrogênio na forma de nitrato de amônio (240 mg kg<sup>-1</sup> de N) e testemunhas sem nitrogênio e sem inoculação. O inóculo de rizóbio foi obtido após cultivo dos isolados em meio YMA semi-sólido por 3 dias, e após inoculação das plantas, procedeu-se o cultivo em vasos Leonard (Vincent, 1970) contendo areia e vermiculita na proporção 2:1 e solução nutritiva de Jensen sem nitrogênio. No início da floração (45 dias da semeadura), as plantas foram colhidas, com posterior determinação da matéria seca da parte aérea (após secagem a 60-70°C em estufa de circulação forçada de ar) e avaliação do número e peso de nódulos secos. A eficiência simbiótica foi dada pela produção de matéria seca da parte aérea das plantas inoculadas em relação às testemunhas nitrogenadas e não nitrogenadas.

A diversidade fenotípica dos quarenta e dois isolados e das estirpes tipo de *R. leguminosarumbiovar phaseoli* (ATCC 10004), *R. tropici* (CIAT 899), *R. etli* (CFN 42) e *S. fredii* (USDA 205) foi analisada quanto ao perfil de proteína

total por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para isso, as bactérias foram cultivadas em meio TY líquido, sob agitação constante, por 5 dias, a 30° C. Após crescimento, as células foram solubilizadas com SDS e posteriormente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), pelo método Laemmli (1970) e modificações descritas por Jackman (1985, 1987).

A análise da diversidade genética foi feita em 36 isolados utilizando a técnica PCR - RFLP do 16S rDNA (ARDRA) (Massol-Deya et al., 1995). A região de 1400 pares de bases, entre os primers Y1 (5'TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC3') e Y3 (5'CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT3') foi amplificada por PCR e, em seguida, cortada com as seguintes enzimas de restrição: Hinf, Rsa, Alu e Hae (Laguerre et al., 1994). O tamanho dos fragmentos de restrição obtidos de cada enzima foi comparado por eletroforese em gel de agarose 2,5%.

Os resultados de matéria seca da parte aérea, número e peso de nódulos secos foram submetidos à análise de variância e teste de médias pelo programa estatístico SANEST (Zonta et al., 1984), enquanto os dendogramas protéicos foram obtidos pelo método UPGMA (Everitt, 1993), utilizando os programas NTSYS 1.80 e STATISTICA 5.0 (Slice, Kim e Walker, 1994), comparando-se os perfis protéicos pela presença ou ausência de bandas.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todos os isolados obtidos dos dois locais estudados apresentaram as seguintes características culturais: velocidade de crescimento de 2 a 3 dias (CR-crescimento rápido), sem alteração do pH do meio YMA, colônias com mais de 2 mm de diâmetro, alta produção de goma, absorção de indicador e coloração

branca. Por apresentarem colônias morfologicamente semelhantes em placas, os isolados não puderam ser discriminados por estas características.

Os resultados de eficiência dos isolados de rizóbio na produção de matéria seca da parte aérea de feijoeiro cv. Carioca, número e peso de nódulos secos encontram-se na tabela 1. Na figura 1 consta uma foto de feijoeiro adubado com nitrogênio (N), inoculado com o isolado UFLA 02-127, inoculado com a estirpe tipo de *R. tropici* recomendada CIAT899/BR322 e testemunha sem N e não inoculada.

TABELA 1. Matéria seca da parte aérea (MSPA), número e peso de nódulos secos de feijoeiro, inoculado com diferentes isolados de rizóbio, obtidos da Região Amazônica.

Tratamento	MSPA (g)	Número de nódulos	Peso de nódulos secos (g)
N (240 mg L <sup>-1</sup> )	5,07 A <sup>1</sup>	-	-
UFLA 02-127	3,53 B	627 AB	0,60 ABC
UFLA 02-68	3,21 BC	614 AB	0,55 BC
UFLA 02-86	3,16 BCD	569 ABC	0,71 AB
UFLA 02-100	2,91 BCD	531 BC	0,62 ABC
UFLA 02-54	2,84 BCD	484 BCD	0,42 C
UFLA 02-87	2,67 BCD	647 AB	0,81 A
UFLA 02-84	2,60 BCD	443 BCDE	0,64 ABC
UFLA 02-104	2,55 BCD	382 CDE	0,60 ABC
UFLA 02-66	2,49 BCD	341 DE	0,41 C
UFLA 02-97	2,44 CD	485 BCD	0,43 C
UFLA 02-116	2,38 CD	563 ABC	0,54 BC
UFLA 02-63	2,28 CD	393 CDE	0,42 C
UFLA 02-102	2,14 CD	846 A	0,79 A
BR 322/CIAT 899	2,11 D	635 AB	0,59 ABC
Testemunha <sup>2</sup>	0,52 E	-	-
UFLA 02-60	0,44 E	306 E	0,11 D

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. <sup>2</sup> Plantas sem inoculação e sem aplicação de N mineral.



FIGURA 1. Feijoeiro adubado com nitrogênio (N), inoculado com o isolado UFLA 02-127, inoculado com a estirpe tipo de *R. tropici* recomendada CIAT899/BR322 e testemunha sem N e não inoculada.

Todas as estirpes estudadas, exceto a UFLA 02-60, aumentaram o crescimento das plantas em relação ao controle. A produção de matéria seca da planta com a estirpe mais eficiente, UFLA 02-127 correspondeu a 70% da matéria seca da parte aérea das plantas que receberam  $240 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  e 165% daquelas inoculadas com BR 322/CIAT 899 (Tabela 1). Quanto ao número e peso de nódulos produzidos, houve variação nos resultados em função dos isolados utilizados, o isolado UFLA 02-102 promoveu os maiores valores com as menores eficiências, os isolados UFLA 02-127 e UFLA 02-68 proporcionaram nodulação semelhante ao da estirpe comercial (BR 322/CIAT 899) mas com maior eficiência simbiótica, ou seja, maior produção de matéria seca da parte aérea do feijoeiro.

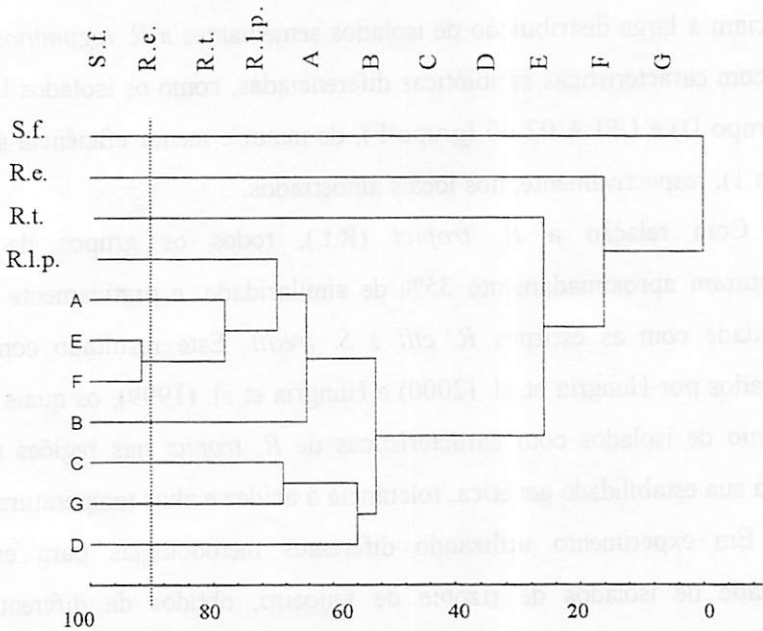
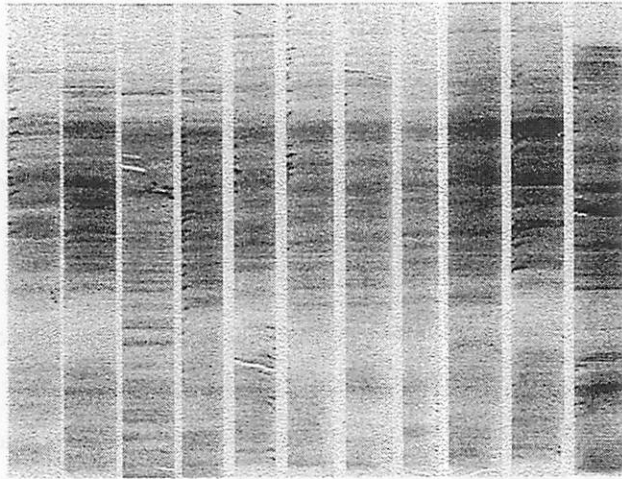
Os perfis protéicos e o respectivo dendograma de dissimilaridade dos quarenta e dois isolados se encontram na Figura 2. Quatro grupos foram formados com níveis de similaridade de 90% ou mais (B, D, E e F) e três isolados ocuparam posições distintas no dendograma (A, C e G) (Figura 1). Todos os grupos e os isolados distintos apresentaram 56% de similaridade com



*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (R.l.p.), sendo os grupos A, E, F e B mais próximos (64% de similaridade ou mais) desta estirpe em relação aos grupos C, G e D (aproximadamente 56% de similaridade). Andrade, Murphy e Giller (2000) verificaram maior ocorrência de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, em relação ao *R. tropici*, em solos que não receberam calagem, portanto com valores menores de pH. Mhamdi et al. (1999) obtiveram isolados de feijoeiro em solos da Tunísia, sendo 1/3 classificados como *R. gallicum*, 1/3 como *R. etli* e *R. leguminosarum* e o restante em outras espécies que nodulam o feijoeiro, e os isolados com características de *R. leguminosarum* foram os que apresentaram menor eficiência simbiótica, quando comparados aos demais. Esses resultados evidenciam a larga distribuição de isolados semelhantes a *R. leguminosarum* em solos, com características simbióticas diferenciadas, como os isolados UFLA 02-127 (grupo D) e UFLA 02-60 (grupo F), de maior e menor eficiência simbiótica (Tabela 1), respectivamente, nos locais amostrados.

Com relação à *R. tropici* (R.t.), todos os grupos de isolados apresentaram aproximadamente 35% de similaridade, e praticamente nenhuma similaridade com as estirpes *R. etli* e *S. fredii*. Este resultado contraria os encontrados por Hungria et al. (2000) e Hungria et al. (1999), os quais discutem o domínio de isolados com características de *R. tropici* nas regiões tropicais, devido à sua estabilidade genética, tolerância à acidez e altas temperaturas.

Em experimento utilizando diferentes metodologias para estudo de diversidade de isolados de rizóbio de feijoeiro, obtidos de diferentes áreas agroecológicas de Senegal e Gâmbia (Diouf et al., 2000), verificou-se predominância de isolados pertencentes a *R. tropici* e *R. etli*.

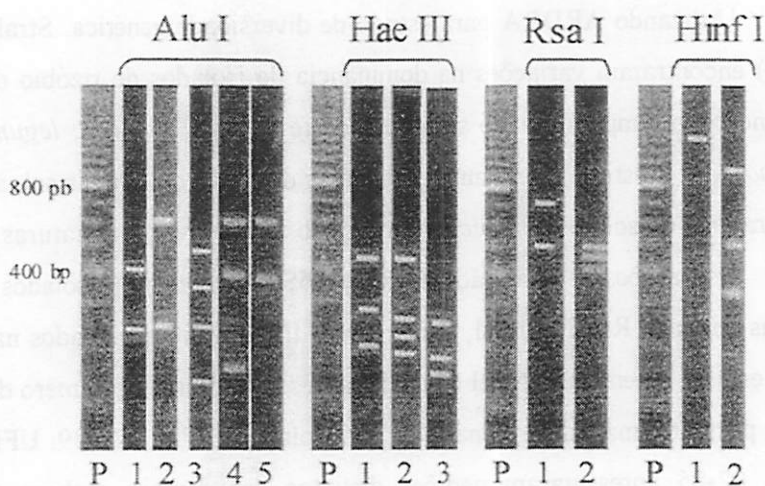


Grupo A: UFLA 02-63; B: UFLA 02-61, UFLA 02-84, UFLA 02-85, UFLA 02-86, UFLA 02-87, UFLA 02-90, UFLA 02-92, UFLA 02-97, UFLA 02-100, UFLA 02-102, UFLA 02-103, UFLA 02-104, UFLA 02-105, UFLA 02-106, UFLA 02-110, UFLA 02-116, UFLA 02-117, UFLA 02-132, UFLA 02-133, UFLA 02-134; C: UFLA 02-113; D: UFLA 02-49, UFLA 02-52, UFLA 02-55, UFLA 02-70, UFLA 02-72, UFLA 02-91, UFLA 02-108, UFLA 02-115, UFLA 02-122, UFLA 02-127, UFLA 02-138; E: UFLA 02-64; F: UFLA 02-54, UFLA 02-60, UFLA 02-65, UFLA 02-66, UFLA 02-67, UFLA 02-68, UFLA 02-71; G: UFLA 02-139; S.f. (*Sinorhizobium fredii*); R.e. (*Rhizobium etli*); R.t. (*R. tropici*); R.l.p. (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*).

FIGURA 2. Padrões eletroforéticos e respectivo dendograma de similaridade dos grupos de isolados de feijoeiro, obtidos da Amazônia.

Utilizando ARDRA para estudo de diversidade genética, Stralio et al. (2000) encontraram variações na dominância de isolados de rizóbio de feijoeiro em função da temperatura do solo no sudeste do país, sendo *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, a estirpe dominante em plantas de feijão cultivadas sob às menores temperaturas do solo e *R. tropici* em solos sob às maiores temperaturas.

Os padrões de restrição da região 16S rDNA dos 36 isolados estudados para as enzimas Rsa I, Hinf I, Alu I e Hae III estão representados na figura 3. Neste estudo, as enzimas Alu I e Hae III apresentaram maior número de padrões, sendo, portanto, mais discriminatórias. Os isolados UFLA 02-139, UFLA 02-60, UFLA 02-85 apresentaram padrões distintos das demais, embora somente o primeiro formasse um padrão protéico exclusivo (Figura 2). A maioria dos isolados analisados apresentou o mesmo padrão de restrição (Grupo I) para as 4 enzimas, sendo este método, portanto, menos discriminatório que análise fenotípica pelo padrão de proteína total. Um trabalho conduzido por Laguerre et al. (1994), avaliando isolados de rizóbio com 9 enzimas de restrição, concluiu que seriam necessárias, no mínimo, 4 enzimas de restrição. A enzima de restrição Hae III foi a mais discriminatória para a região de genes simbióticos, agrupando as estirpes em 11 padrões distintos. Esta enzima, juntamente com as enzimas Cfo I, Hinf I e Msp I, tiveram o mesmo nível de discriminação do obtido com a combinação de 8 enzimas de restrição. Por outro lado, Nick et al. (1998) encontraram baixa discriminação utilizando as enzimas AluI, CfoI, DdeI, HaeIII, HinfI, MboI, MseI, MspI, RsaI e TaqI, combinadas quatro a quatro.



**Alu Grupo 1:** UFLA 02-63, 64, 71, 91, 96, 97, 108, 111, 116, 117, 122, 49, 87, 133, 102, 105, 115, 68, 110, 113, 127, *R. tropici*, *S. fredii*. **Alu Grupo 2:** UFLA 02-60. **Alu Grupo 3:** UFLA 02-85. **Alu Grupo 4:** UFLA 02-132. **Alu Grupo 5:** UFLA 02-139. **Hae Grupo 1:** UFLA 02-63, 64, 71, 91, 96, 97, 108, 111, 116, 117, 122, 49, 110, 113, 127, *R. tropici*. **Hae Grupo 2:** UFLA 02-67, UFLA 02-68, *S. fredii*. **Hae Grupo 3:** UFLA 02-85. **RSA Grupo 1:** UFLA 02-63, 64, 71, 91, 96, 97, 108, 111, 116, 117, 122, 67, 86, 87, 92, 103, 110, 113, 127, 54. **RSA Grupo 2:** UFLA 02-104, 139, *R. tropici*. **Hinf Grupo 1:** UFLA 02-110, 113, 115, 96, 103, 113, 67, 92, 122, 86, 105, 127, 97, 102, 87, 100, 65, 84, 108, 97, 91, 63, 122, 116, 49, 64, 111, 71, *R. tropici*. **Hinf Grupo 2:** UFLA 02-60, 139, 104. P – marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder).

FIGURA 3. Padrões de restrição da região 16S rDNA de diferentes isolados obtidos com as enzimas Rsa I, Hinf I, Alu I e Hae III.

#### 4 CONCLUSÕES

Todos isolados obtidos apresentaram características culturais semelhantes, com crescimento rápido, sem alteração de pH do meio, alta produção de goma e cor branca.

Todos os isolados, excetuando UFLA 02-60, apresentaram eficiência simbiótica superior à da estirpe recomendada BR 322/CIAT 899, com destaque para os isolados UFLA 02-127 e UFLA 02-68, que promoveram os maiores valores de produção de matéria seca do feijoeiro. Estudos fenotípicos dos

isolados por perfil protéico mostraram que 3 grupos foram formados com níveis de similaridade superiores a 90% e 3 isolados com posições distintas (UFLA 02-139, UFLA 02-113 e UFLA 02-63). Todos os isolados apresentaram maior similaridade com a estirpe tipo de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* do que com a estirpe tipo de *R. tropici*.

Os padrões de restrição 16S rDNA utilizados para estudo de diversidade genética mostraram que as enzimas Alu I e Hae III foram as mais discriminatórias, com a formação de 4 e 3 padrões de restrição, respectivamente. A maioria dos isolados se agrupou no mesmo padrão de restrição para as quatro enzimas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp.nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, n.4, p.996-1006, Oct. 1997.
- ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. Diversity and abundance of populations of bean-nodulating rhizobia as a function of liming and cropping history in acidic Brazilian soils. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p.546.
- CHEN, W.X.; LI, G.S.; QI, Y.L.; WANG, E.T.; YUAN, H.L.; LI, J.L. *Rhizobium huakuii* sp.nov. isolated from root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, n.2, p.275-280, Apr. 1991.
- DIOUF, A.; DE LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; KERSTERS, K.; GILLIS, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; GUEYE, M. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v.50, p.159-170, Jan. 2000.
- EVERITT, B.S. **Cluster analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 170p.

- HUNGRIA M.; VARGAS, M.A.T.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.M.O.; FERREIRA, M.C.; MENDES, I.C. Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas de grãos. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIM, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds) *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Viçosa: SBSC, 1999. p.597-620.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (eds) *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.187-294.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.M.O.; ANDRADE, D.S. The Brazilian experience with the soybean (*Glycine max*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbioses. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds) *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Dordrecht: Kluwer, 2000. p.515-518.
- JACKMAN, P.J.H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (eds). *Chemical methods in bacterial systematics*. London: Academic Press, 1985. p.119-129.
- JACKMAN, P.J.H. Microbial systematics based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: COLWELL, R.R.; GRIGORAVA, R. (eds). *Methods in Microbiology*. London: Academic Press, 1987.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p. 234-244.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, n.5259, p.680-685, Aug. 1970.
- LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.60, n.1, p.56-63, Jan. 1994.
- MHAMDI, R.; JEBARA, M.; AOUANI, M.E.; GHRIR, R.; MARS, M. Genotypic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.28, n.3, p.313-320, Jan. 1999.
- MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v. 41, n.3, p.417-426, July 1991.

- MASSOL-DEYA, A.; ODELSON, D.A.; HICKEY, R.F.; TIEDJE, J.M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). **Molecular Microbial Ecology Manual**, 3.3.2, p.1-8, 1995.
- MERCANTE, F.M.; CUNHA, C.O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. *Leucena Leucocephala* as trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian "Cerrado" region. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 49-55, 1998.
- NICK, G.; RÄSÄSNEN, L.A.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; LINDSTRÖM, K. The genetic diversity among rhizobia, agrobacteria and *Agrobacterium*-like strains assessed by 16S rDNA PCR-RFLP (submitted). 1998.
- REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DA TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIOLÓGICOS DE INTERESSE AGRÍCOLA-RELARE, 9., 2000. São Joaquim da Barra. Ata... São Joaquim da Barra: BIOSOJA, 2000. 4p.
- SCHOLLA, M.H.; ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp.nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.34, p.484-486, 1984.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, n.2, p.374-377, Apr. 1993.
- SLICE, D.E.; KIM, J.; WALKER, J. NTSYS-Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Versão 1.80. 1994.
- STATISTIC, Statistic Analysis. Versão 5.0. 1995.
- STRALIOTTO, R.; FERREIRA, M.E.; RUMJANEK, N.G. Genotypic diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Brazilian tropical soils. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds) **Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p.610.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: **International Biological Programme Handbook no.15**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A.; SILVEIRA JÚNIOR, P. **Sistemas de análise estatística para microcomputadores (SANEST)**. Pelotas: UFPel-Departamento de Matemática e Estatística, 1984. 151p.