



CLEUDISON GABRIEL NASCIMENTO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA O
MONITORAMENTO DE RIZÓBIOS ELITE INOCULADOS
NO FEIJOEIRO UTILIZANDO PCR E qPCR**

**LAVRAS-MG
2022**

CLEUDISON GABRIEL NASCIMENTO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA O
MONITORAMENTO DE RIZÓBIOS ELITE INOCULADOS NO FEIJOEIRO
UTILIZANDO PCR E qPCR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Biotecnologia de Microrganismos Aplicada à Agropecuária e ao Meio Ambiente, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. Ederson da Conceição Jesus
Orientador

Dr. Eustáquio Souza Dias
Coorientador

Dra. Márcia Soares Vidal
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Cleudison Gabriel Nascimento da.

Desenvolvimento e validação de método para o monitoramento
de rizóbios elite inoculados no feijoeiro utilizando PCR e qPCR /
Cleudison Gabriel Nascimento da Silva. - 2022.

251 p. : il.

Orientador(a): Ederson da Conceição Jesus.

Coorientador(a): Eustáquio Souza Dias, Márcia Soares Vidal.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Rizóbios elite. 2. Feijão-comum. 3. PCR. I. Jesus, Ederson
da Conceição. II. Dias, Eustáquio Souza. III. Vidal, Márcia Soares.
IV. Título.

CLEUDISON GABRIEL NASCIMENTO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA O
MONITORAMENTO DE RIZÓBIOS ELITE INOCULADOS NO FEIJOEIRO
UTILIZANDO PCR E qPCR**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR MONITORING ELITE
RHIZOBIA INOCULATED IN BEANS USING PCR AND qPCR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Biotecnologia de Microrganismos Aplicada à Agropecuária e ao Meio Ambiente, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de abril de 2022.

| | |
|---|------------------------|
| Dr. Enderson Petrônio de Brito Ferreira | Embrapa Arroz e Feijão |
| Dr. Eustáquio Souza Dias | UFLA |
| Dra. Márcia Soares Vidal | Embrapa Agrobiologia |
| Dr. Jean Luiz Simões de Araújo | Embrapa Agrobiologia |
| Dr. Rafael Mazer Etto | UEPG |
| Dr. Victor Satler Pylro | UFLA |

Dr. Ederson da Conceição Jesus
Orientador

Dr. Eustáquio Souza Dias
Coorientador

Dra. Márcia Soares Vidal
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2022**

Ao meu pai Edson Ribeiro da Silva, por ter sido meu principal professor, pilar da nossa família, e o mais entusiasmado com toda a minha formação, e que, infelizmente, não comemorará comigo, em virtude de já ter partido.

In memoriam dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, pelo alimento, saúde, força, conhecimento, família, determinação e vida. Ao meu povo brasileiro, por financiar essa pesquisa.

Aos meus familiares Suzana, Junior, Juliana, Eduardo, Edson, Maria de Fátima, Arthur e Maria Luiza, por ser o meu pilar.

À Universidade Federal de Lavras juntamente ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelo suporte técnico e estrutural prestado à minha qualificação, pela oportunidade de conhecer novos laboratórios e áreas relacionadas à microbiologia, assim como excelentes profissionais (Rose, Carla, Cristina, Cidinha, Ivani, Victor, Whasley, Eustaquio, Rosane, Disney, Dirceu etc).

À Embrapa Agrobiologia, pelo suporte técnico e estrutural, por ter me proporcionado uma qualificação profissional de primeiro mundo, por ter me dado a chance de conhecer muitos profissionais de diversas áreas (Sr. Claudinho, Patrícia, Carol, Karine, Ernani, Nivaldo, Geraldo, Lúcio, João, Alderi, Roberto, Wilson, Marcelo, Adriana, Carmem, Jean, Marcia Vidal, Marcia Red, Luck, Veronica, Ivo, Vera, Stefan, Segundo, Sérgio, Alex, Juliana, Ederson, Josias etc.), que levarei para sempre no meu coração, enfim, pela acolhida institucional concedida a mim desde a iniciação científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao meu orientado Anderson, por ter acreditado em mim e aceitado nossa parceria, por todo o apoio e compreensão nos momentos bons e difíceis que passei durante o doutorado.

A todas as amigas criadas e cultivadas durante essa jornada (Josimar, Letícia, Edevaldo, Leonardo Terra, Vinícios, Rita, Albiane, Leonardo, Diego, Deivison, Priscila, Lorraine, Liliandra, Jéssica, Cleiton, Daniela, Carlos, Elizabeth, Gabriela, Cleiton, Cristiane, Maura, Márcio, Lucas, Luan, Isis, Ruan, Tatiane, Junini, Oclísio, Luana, Angélica, Beatriz, Damiany, João, Lundo, Gustavo, Hugo etc).

À minha futura esposa Suzana, pela compreensão em estarmos distantes a maior parte do nosso namoro e pelo companheirismo nos momentos que estamos juntos.

Muito obrigado!

*“O papel do infinitamente pequeno na natureza
é infinitamente grande”. (Louis Pasteur)*

RESUMO

O feijoeiro é uma planta capaz de realizar simbiose com rizóbios de modo que a Fixação Biológica de Nitrogênio é uma alternativa sustentável na utilização de adubos nitrogenados para a cultura. No entanto, o sucesso da simbiose depende de diversos fatores bióticos e abióticos, dentre eles, a competitividade de estirpes selecionadas frente à microbiota natural existente no solo. Uma forma de acessar essa competitividade é pela avaliação da ocupação nodular e persistência da bactéria no solo. Porém, os métodos atualmente existentes são muito laboriosos e/ou não apresentam especificidade suficiente para diferenciar as estirpes inoculadas de rizóbios nativos do solo. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variantes se apresentam como uma alternativa conveniente e de alta especificidade para o monitoramento e a quantificação de microrganismos associados a plantas e/ou no solo. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenhar e validar *primers* estirpe-específicos para detectar e quantificar as bactérias *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 e CPAC H12 e *R. freirei* estirpe PRF 81, utilizando as técnicas de PCR e PCR em Tempo Real (qPCR). Para tal, os *primers* foram desenhados a partir de regiões codantes do genoma e selecionados *in silico* de modo a conter sequências de DNA exclusivas do genoma de cada estirpe. O processo de validação desses *primers* envolveu teste de especificidade exclusiva para as estirpes alvo em relação a outras geneticamente próximas e distante a elas, ensaios de PCR envolvendo diversos extratos de DNA e avaliação da ocupação nodular em experimentos de casa de vegetação. Cada par de *primer* foi avaliado principalmente quanto a sua eficiência de amplificação e curva de dissociação e, posteriormente, quanto a quantificação das estirpes alvo a partir das amostras de DNA isoladas de raízes e solo rizosférico do feijoeiro. Por fim, os pares de *primers* foram testados quanto a sua aplicabilidade para avaliar a taxa de ocupação nodular e quantificar a população de rizóbios elite em solo rizosférico e raízes do feijoeiro em condição de campo. Essas informações permitiram discorrer sobre os dados de nodulação e fitotécnicos inerentes à interação rizóbio-planta, bem como a aptidão das estirpes CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81 para nodular o feijoeiro.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. Rizóbios elite. Detecção. Quantificação.

ABSTRACT

The common bean performs symbiosis with rhizobia, so Biological Nitrogen Fixation is a sustainable alternative to nitrogen fertilizers. However, the success of the symbiosis depends on several biotic and abiotic factors, among them the competitiveness of selected strains against the natural microbiota in the soil. One way to assess this competitiveness is by evaluating the nodular occupation and persistence of the bacteria in the soil. Unfortunately, the currently existing methods are laborious and/or do not have sufficient specificity to differentiate the inoculated strains of soil native rhizobia. Therefore, the Polymerase Chain Reaction (PCR) and its variants are presented as a convenient and highly specific alternative for the monitoring and quantifying of microorganisms associated with plants and/or in the soil. In this context, the objective of the present work was to design and validate strain-specific primers to detect and quantify the bacteria *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and CPAC H12 and *R. freirei* strain PRF 81, using PCR and Real-Time PCR (qPCR). To this end, the primers were designed from coding regions of the genome and selected in silico to contain DNA sequences unique to the genome of each strain. The validation process of these primers involved exclusive specificity testing for the target strains in relation to others genetically close and distant to them, PCR assays involving several DNA extracts, and evaluation of nodular occupancy in greenhouse experiments. First, each primer pair was evaluated for its amplification efficiency and dissociation curve. Then, the best pairs were used for quantifying target strains from DNA samples isolated from roots and rhizospheric soil. Finally, the primers were tested for their applicability to evaluate the nodular occupation rate and quantify the elite rhizobia population in rhizospheric soil and common bean roots under field conditions. This information allowed us to discuss the nodulation and the performance of the rhizobial-plant interaction, as well as the fitness of strains CIAT 899, CPAC H12, and PRF 81 to nodulate the common bean.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L. Rhizobia elite. Detection. Quantification.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| | CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 2.1 | Produção e consumo de feijão-comum no Brasil | 16 |
| 2.2 | Exigências nutricionais do feijoeiro | 17 |
| 2.3 | Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas | 18 |
| 2.4 | Fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro..... | 20 |
| 2.5 | Inoculante para feijoeiro | 22 |
| 2.6 | Estirpes bacterianas alvo desse estudo | 23 |
| 2.7 | Deteccção e quantificação de rizóbios inoculados | 24 |
| | REFERÊNCIAS..... | 29 |
| | CAPÍTULO 2 PRIMERS ESPECÍFICOS PARA DETECÇÃO RÁPIDA POR PCR DAS BACTÉRIAS RHIZOBIUM TROPICI ESTIRPES CIAT 899 E CPAC H12 E RHIZOBIUM FREIREI ESTIRPE PRF 81 | 39 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 41 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| 2.1 | Desenho dos <i>primers</i> | 44 |
| 2.2 | Análise utilizando SM MALDI TOF..... | 45 |
| 2.3 | Extração de DNA | 46 |
| 2.4 | Condições de PCR..... | 47 |
| 2.5 | Especificidade dos <i>primers</i> | 47 |
| 2.6 | Sensibilidade dos <i>primers</i> | 51 |
| 2.7 | Aplicabilidade dos <i>primers</i> para avaliação de ocupação nodular | 51 |
| 2.8 | Estatística..... | 54 |
| 3 | RESULTADOS | 55 |
| 3.1 | Condição de amplificação dos <i>primers</i> | 55 |
| 3.2 | Especificidade e sensibilidade dos <i>primers</i> | 57 |
| 3.3 | Validação dos <i>primers</i> para ocupação nodular | 65 |
| 4 | DISCUSSÃO | 69 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 74 |

| | | |
|-------|--|------------|
| | REFERÊNCIAS..... | 75 |
| | APÊNDICES | 82 |
| | CAPÍTULO 3 QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL DAS BACTÉRIAS <i>RHIZOBIUM TROPICI</i> ESTIRPE CIAT 899 E <i>RHIZOBIUM FREIREI</i> ESTIRPE PRF 81 | 105 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 107 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 110 |
| 2.1 | Extração de DNA | 110 |
| 2.2 | Condições de PCR em Tempo Real..... | 111 |
| 2.3 | Plotagem das curvas de calibração | 113 |
| 2.4 | Experimentos para validação dos <i>primers</i> na qPCR | 114 |
| 2.4.1 | Suspensões bacterianas adicionadas no solo e raízes maceradas de feijoeiro .. | 114 |
| 2.4.2 | Experimento em casa de vegetação | 114 |
| 2.4.3 | Quantificação das estirpes CIAT 899 e PRF 81 utilizando qPCR | 117 |
| 2.5 | Avaliação da ocupação nodular utilizando qPCR | 117 |
| 2.6 | Estatística..... | 118 |
| 3 | RESULTADOS | 119 |
| 3.1 | Curvas de calibração, limite de detecção e curvas de <i>melting</i> | 119 |
| 3.2 | Quantificação das estirpes CIAT 899 e PRF 81 inoculadas em diluição seriada em raízes de feijoeiro maceradas ou solo | 137 |
| 3.3 | Quantificação das estirpes CIAT 899 e PRF 81 nas raízes e solo rizósferico do feijoeiro cultivado em casa de vegetação | 139 |
| 3.4 | Análise da ocupação nodular por meio da qPCR..... | 142 |
| 4 | DISCUSSÃO | 147 |
| 5 | CONCLUSÃO | 153 |
| | REFERÊNCIAS..... | 154 |
| | APÊNDICES | 160 |
| | CAPÍTULO 4 AVALIAÇÃO DA OCUPAÇÃO NODULAR PELAS ESTIRPES ELITE CIAT 899, CPAC H12 E PRF 81 EM RAÍZES DE FEIJOEIRO CULTIVADO EM SOLO COM E SEM HISTÓRICO DE CULTIVO COM A CULTURA | 165 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 167 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 169 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.1 | Estirpes bacterianas utilizadas | 169 |
| 2.2 | Levantamento da população de rizóbios nativos | 169 |
| 2.3 | Experimentos de campo | 170 |
| 2.4 | Experimento em casa de vegetação | 174 |
| 2.5 | Avaliação de ocupação nodular | 174 |
| 2.6 | Avaliação da diversidade de rizóbios nativos..... | 177 |
| 2.7 | Estatística..... | 177 |
| 3 | RESULTADOS | 178 |
| 3.1 | Populações de rizóbios nativos das áreas com e sem histórico prévio de cultivo com feijoeiro..... | 178 |
| 3.2 | Experimento de campo em áreas com e sem histórico prévio de cultivo com feijoeiro | 179 |
| 3.3 | Experimento em casa de vegetação | 183 |
| 3.4 | Diversidade de rizóbios nativos que nodularam o feijoeiro cultivado em solo das Áreas 1 e 2..... | 186 |
| 4 | DISCUSSÃO | 188 |
| 5 | CONCLUSÃO | 194 |
| | REFERÊNCIAS | 195 |
| | APÊNDICES | 201 |
| | CAPÍTULO 5 MONITORAMENTO DAS ESTIRPES ELITE CIAT 899 E PRF 81 A PARTIR DE RAÍZES E SOLO RIZOSFÉRICO DE FEJJOEIRO CULTIVADO EM EXPERIMENTO DE CAMPO | 210 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 212 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 215 |
| 2.1 | Estirpes utilizadas no presente trabalho..... | 215 |
| 2.2 | Experimentos..... | 215 |
| 2.2.1 | Experimento de campo | 217 |
| 2.2.2 | Primeiro experimento em casas de vegetação | 219 |
| 2.2.3 | Segundo experimento em casa de vegetação | 219 |
| 2.3 | Extração de DNA | 220 |
| 2.4 | Avaliação de ocupação nodular utilizando PCR..... | 221 |
| 2.4.1 | Análise das amostras de DNA isoladas de raízes e solo rizosférico utilizando qPCR | 223 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 2.5 | Diversidade da ocupação nodular por rizóbios nativos | 224 |
| 2.6 | Estatística..... | 225 |
| 3 | RESULTADOS | 226 |
| 3.1 | Experimento de campo | 226 |
| 3.2 | Primeiro experimento em casa de vegetação..... | 229 |
| 3.3 | Segundo experimento em casa de vegetação | 231 |
| 3.4 | Diversidade de rizóbios nativos que nodularam o feijoeiro..... | 233 |
| 3.5 | Quantificação das estirpes CIAT 899 e PRF 81 | 236 |
| 4 | DISCUSSÃO | 240 |
| 5 | CONCLUSÃO | 244 |
| | REFERÊNCIAS | 245 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 251 |

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores mundiais de feijão-comum. Essa leguminosa, juntamente com o arroz, pode fornecer os aminoácidos essenciais para uma alimentação balanceada diária, apreciada por milhares de brasileiros. O feijoeiro pode ser cultivado em todas as regiões do território nacional, podendo ter até três safras por ano na região Sul do Brasil (EMBRAPA ARROZ & FEIJÃO, 2022).

Assim como a maioria das culturas, a planta de feijoeiro também precisa de fontes de nitrogênio para apresentar um bom rendimento de grãos. Usualmente, o nitrogênio aplicado é derivado da síntese industrial em um processo conhecido como Haber-Bosch. Essa tecnologia demanda altas temperaturas e pressões que são alcançadas com a queima de um grande volume de combustível fóssil. Além disso, estima-se que mais da metade do fertilizante nitrogenado aplicado no solo é perdido para o meio ambiente, podendo se tornar um problema (ZAMBUDIO; FERREIRA, 2012).

Uma alternativa para minimizar o consumo de N-fertilizante no campo, e também para reduzir o custo do cultivo, é a utilização de bactérias que fixam nitrogênio atmosférico (N₂) na planta do feijoeiro. Tais bactérias são selecionadas tendo em vista que podem prover, parcialmente, o nitrogênio exigido pela planta de feijoeiro. Até então, é recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a comercialização de três estirpes inoculantes do feijoeiro no Brasil, sendo elas: a CIAT 899 (SEMIA 4077) e a CPAC H12 (SEMIA 4088) da espécie *Rhizobium tropici*, e a PRF 81 (SEMIA 4080) da espécie *R. freirei*. Essas estirpes mostraram ser eficientes na nodulação das raízes do feijoeiro, bem como resistentes a condições adversas do solo. No entanto, quando inoculadas, essas bactérias competem com outras nativas por sítios de infecção para a nodulação de raízes. Tal fato pode fazer com que não exerçam todo o seu potencial para a nodulação, o que acarreta em menores ganhos em termos de nitrogênio fixado para a planta e, conseqüentemente, na produtividade da cultura.

Diante do exposto, é necessário conhecer a ocupação nodular bacteriana em plantas do feijoeiro inoculadas com as estirpes comerciais. A prática de detectar as estirpes inoculantes é recorrente no meio científico, pois confirma sua interação com a planta hospedeira. Para tal, utiliza-se diversas técnicas, desde sorológicas a moleculares. Para identificar e quantificar

microrganismos a partir de diferentes amostras, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sua variante, a PCR em Tempo Real ou PCR quantitativa (qPCR) são bastante empregadas para avaliação de ocupação nodular e para a enumeração de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) associadas a plantas (COUILLEROT *et al.*, 2010; URREA-VALENCIA *et al.*, 2021). As técnicas de PCR e qPCR têm as seguintes vantagens em relação as demais: rapidez na obtenção dos resultados, reprodutibilidade e especificidade. Para isso, na PCR e suas variantes são utilizados *primers* que determinam a amplificação *in vitro* de regiões específicas de DNA presente até mesmo em baixas concentrações na amostra. Os *primers* ou oligonucleotídeos iniciadores são pequenos fragmento de DNA de fita simples, responsáveis por nortear nos ensaios de PCR ou qPCR a amplificação de fragmentos de DNA específicos do organismo alvo. Para a obtenção dos *primers* são utilizados *softwares* apropriados para selecionar regiões específicas no genoma do organismo de interesse. A exclusividade de tais regiões se dá por meio de análise *in silico*, onde elas são contrastadas com outros genes e genomas de milhares de organismos depositados num banco de dados como, por exemplo, o GenBank que pertence ao *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Existem *primers* que podem ser utilizados para detecção das bactérias *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 e CPAC H12 e *R. freirei* estirpe PRF 81 por meio da técnica de PCR e derivadas. No entanto, para esses *primers* é necessário na análise final a adoção de técnicas tais como: *fingerprinting*, sequenciamento ou a expressão de genes. Por exemplo, os *primers* REP, ERIC, BOX e RPO1 utilizados em ensaios de PCR formam perfis complexos de bandas que devem ser analisados por *fingerprinting*, servindo, portanto, mais para caracterização genética. Quanto a utilização de *primers* para genes conservados no genoma, como por exemplo, o gene *nif*, relacionado à fixação de nitrogênio, a análise final carece que o produto amplificado na PCR seja sequenciado, o que pode tornar a análise lenta e onerosa. Já os *primers* utilizados para expressão gênica empregados em RT-qPCR podem ter alta similaridade com trecho de genes encontrados em outros microrganismos diferentes dos alvos, o que pode tornar a análise de detecção inespecífica (OLIVEIRA *et al.*, 2009, 2013; CERRO *et al.*, 2015). Contudo, as características dos *primers* anteriormente desenhados não se aplicam para o propósito do presente estudo, que objetiva conseguir *primers* para análise em larga escala a partir de diversas matrizes tais como: inoculantes, nódulos, raízes e solo. Para isso, é necessário haver *primers* que detectem as estirpes CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81 de forma exclusiva, rápida e com o menor custo possível.

Com base no exposto, pretende-se como objetivo geral nesse trabalho, desenhar *primers* estirpe-específicos para detecção e quantificação das estirpes CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81 utilizando as técnicas de PCR e qPCR. E como objetivos específicos: i - validar os *primers* para detecção das estirpes alvo a partir de amostras do DNA extraídas de diversas matrizes (suspensão celular, nódulo, raiz e solo); ii - utilizar tais *primers* para avaliação da taxa de ocupação nodular do feijoeiro; iii - quantificar por meio dos *primers* as estirpes alvo a partir de raízes e solo rizosférico do feijoeiro; iv- utilizar os *primers* para detecção das estirpe alvo em experimento de campo e casa de vegetação em áreas com e sem histórico de cultivo com feijoeiro e; v - monitorar as bactérias alvo inoculadas em campo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção e consumo de feijão-comum no Brasil

O semeio do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ser realizado em praticamente todas as regiões do território nacional (EMBRAPA ARROZ & FEIJÃO, 2020). Dependendo das condições edafoclimáticas regionais, no Brasil, o cultivo do feijoeiro pode ocorrer em até três safras por ano. A safra das águas (primeira safra) é realizada de setembro a novembro, nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, visando aproveitar o início das chuvas da primavera. O semeio do feijão-comum da seca (segunda safra, entressafra ou safrinha) pode ser realizado em todas as regiões brasileiras, e busca aproveitar as últimas chuvas do verão que podem ir de março a maio. A semeadura de inverno (terceira safra) é realizada em regiões em que, de junho a agosto, a temperatura local é maior que 18 °C. A produtividade do feijoeiro está associada ao nível tecnológico empregado pelos produtores da cultura, que em sua maioria são agricultores familiares (SILVA; WANDER, 2013).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de feijão-comum, com uma área plantada na atual safra (2021/22) de 2.907,2 mil hectares com produção estimada em 3.084 mil toneladas, o que equivalerá a uma produtividade média de 1,061 t ha⁻¹ (CONAB, 2022). Todo o feijão produzido nacionalmente abastece o mercado interno e o Brasil não é autossuficiente na produção dessa leguminosa, necessitando, dessa forma, importá-la, para atender a demanda interna (CONAB, 2022). Além disso, projeções apontam que o país continuará importando feijão-comum (SILVA; WANDER, 2013). Dentro da espécie *Phaseolus vulgaris* L. existem diversas cultivares, que juntas, respondem por 82% de todo o feijoeiro cultivado no Brasil (EMBRAPA ARROZ & FEIJÃO, 2022). A segunda espécie de feijão mais cultivada no Brasil é a *Vigna unguiculata* (feijão caupi) respondendo por aproximadamente 18% da produção nacional total (EMBRAPA ARROZ & FEIJÃO, 2022). Dentro da espécie mais cultivada no país, as variedades que possuem o grão tipo carioca são as mais cultivadas e consumidas (ABBOUD *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2018).

A cultura do feijoeiro é de suma importância para a segurança alimentar nacional. Os grãos dessa leguminosa são utilizados na alimentação diária de milhões de brasileiros, resultando no consumo per capita de 15,2 kg/habitante/ano (EMBRAPA ARROZ & FEIJÃO, 2020). O feijão-comum tem uma importância fundamental do ponto de vista nutricional por ter na sua composição teores de vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, vitaminas B1, B2 e

B6) e certos minerais (K, Fe, Cu, Zn, P, Ca, e Mg) que podem suprir necessidades nutricionais primárias (SGARBIERI, 1989). No Brasil, país com mais de 214 milhões de habitantes, o feijão-comum é servido com arroz em pelo menos uma refeição diária (FERREIRA *et al.*, 2018). Assim como para o Brasil, o feijão-comum é considerado um legume modelo de estudo para o mundo, tendo em vista que é a fonte de proteína mais acessível em diversos países subdesenvolvidos (BROUGHTON *et al.*, 2003). Daí a importância de se pesquisar fontes sustentáveis e mais econômicas para melhorar a produtividade da cultura. Com esse propósito, a relação simbiótica do feijoeiro com bactérias fixadoras de nitrogênio é pesquisada com frequência (CABALLERO-MELLADO; MARTINEZ-ROMERO, 1999; PELEGRIN *et al.*, 2009; POHAN *et al.*, 2019).

2.2 Exigências nutricionais do feijoeiro

Os índices de produtividade de feijão-comum obtidos nas propriedades rurais brasileiras são bastante variáveis. A atual média nacional, 1.061 kg ha⁻¹ (CONAB, 2022), está abaixo das observadas em trabalhos científicos. O feijoeiro tem potencial para produzir em ótimas condições de cultivo e adubação 5 t ha⁻¹ de grãos secos (BARBOSA; GONZAGA, 2012). A baixa média nacional pode estar correlacionada com o perfil das áreas cultivadas, que são, em sua maioria, de pequenos e médios produtores (SILVA; WANDER, 2013). O uso de adubos químicos, especialmente dos nitrogenados, contribui para aumentar o rendimento da cultura do feijoeiro (FARINELLI *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2021; LOPES *et al.*, 2017). O nitrogênio é requerido em maior quantidade pela planta de feijoeiro no período de 35 a 50 dias após a emergência, coincidindo com o florescimento, e estima-se que nesse período o feijoeiro absorva entre 2,0-2,5 kg de N/ha/dia (ROSOLEM; MARUBAYASHI, 1994). Na Tabela 1 são mostradas as quantidades de N extraído pela planta de feijão bem como o exportado por meio dos grãos, evidenciando que o N é o nutriente que mais sai do sistema. Na média geral dos trabalhos científicos em 1.000 kg de grãos de feijão-comum são exportados: 35,5 kg de N, 4,0 kg de P, 15,3 kg de K, 3,1 kg de Ca, 2,6 kg de Mg e 5,4 kg de S (ROSOLEM; MARUBAYASHI, 1994).

No entanto, o custo com a aquisição e a aplicação dos fertilizantes pode tornar onerosa a produção do feijão-comum. O valor investido em N-fertilizante na cultura é próximo a 25% do gasto com insumos e pode ser de 15 a 17,5% do custo total (SILVEIRA *et al.*, 2015). Além disso, o uso de fertilizantes nitrogenados pode causar problemas ambientais. Estima-se que

metade do nitrogênio aplicado nas lavouras é perdida por volatilização em forma de óxidos de nitrogênio, potenciais destruidores da camada de ozônio, o que contribui para o efeito estufa, e por percolação e/ou lixiviação no solo, para a contaminação dos lençóis freáticos, lagos e rios (ZAMBUDIO; FERREIRA, 2012).

Tabela 1 - Extração e exportação de nutrientes pela cultura do feijoeiro, conforme diferentes autores.

| Nutrientes | GALLO & MIYASAKA (1961) | | | HAAG et al. (1967) | | | COBRA NETO et al. (1971) | | |
|------------|---------------------------------|-----------------------------------|----|---------------------------------|-----------------------------------|----|---------------------------------|-----------------------------------|----|
| | Extração kg ha ⁻¹ | Exportação kg ha ⁻¹ | % | Extração kg ha ⁻¹ | Exportação kg ha ⁻¹ | % | Extração kg ha ⁻¹ | Exportação kg ha ⁻¹ | % |
| N | 102 | 67 | 66 | 201 | 28 | 14 | 102 | 37 | 36 |
| P | 9 | 6 | 67 | 18 | 4 | 22 | 9 | 4 | 44 |
| K | 93 | 31 | 33 | 201 | 20 | 10 | 93 | 22 | 24 |
| Ca | 54 | 6 | 11 | 116 | 4 | 4 | 54 | 4 | 7 |
| Mg | 18 | 5 | 27 | 36 | 2 | 6 | 18 | 4 | 22 |
| S | 26 | 11 | 44 | 36 | 4 | 12 | 25 | 10 | 40 |
| Cultivar | Chumbinho opaco | | | Chumbinho opaco | | | Roxinho | | |

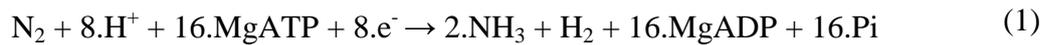
Fonte: Rosolem e Marubayashi (1994).

Além dos adubos químicos e da matéria orgânica presente no solo, o nitrogênio também pode ser obtido pelo feijoeiro por meio do processo chamado Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Entretanto, é importante ressaltar que a simbiose do feijoeiro com rizóbios não provê toda a demanda da planta devido a uma série de fatores que afetam a fixação de N₂, mas pode minimizar gastos com insumos nitrogenados (BOMFIM *et al.*, 2021). Além disso, pode proporcionar considerável entrada de N em ecossistemas agrícolas e reduz parte dos danos que o N-fertilizante pode causar para o meio ambiente (NASEER *et al.* 2019)

2.3 Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas

A maioria das espécies da família Leguminosae é capaz de associar-se com bactérias simbiontes fixadoras de nitrogênio em estruturas nodulares desenvolvidas em seu hospedeiro (PEIX *et al.*, 2015). Nesse, a FBN começa a ocorrer a partir do momento em que a planta passa a ter energia para manter o sistema, ou seja, fornecer assimilados fotossintéticos ‘açúcares’ para as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N₂). Até então, as reservas cotiledonares suprem as necessidades de nitrogênio da planta (MERCANTE *et al.*, 1992). Nessa interação simbiótica, atuam bactérias chamadas diazotróficas (diazó = nitrogênio, trofos = nutrição) que colonizam as raízes da leguminosa formando nódulos (BELLONE; BELLONE, 2006). Nesses, as bactérias fixam N₂ por meio do complexo enzimático chamado nitrogenase capaz de quebrar a tripla ligação do N₂ (N≡N) e disponibilizá-lo para planta na

forma de amônia (NH₃) (BELLONE; BELLONE, 2006). Em contrapartida, a planta fornece fonte de carbono para o desenvolvimento das bactérias em seu interior. O processo de FBN tem um elevado custo energético, 960 KJ mol⁻¹ de nitrogênio fixado (BELLONE; BELLONE, 2006), o que acarreta um alto consumo de ATP, como mostra a Equação 1 (HOWARD; REES, 1996; SEEFELDT *et al.*, 2009).



A nodulação tem início com as bactérias do solo sendo atraídas por sinais químicos que ocorrem na rizosfera das plantas. Esse processo é chamado de quimiotaxia (VENTURI; KEEL, 2016). As substâncias químicas pertencentes ao grupo dos flavonoides são as mais evidenciadas, atuantes no processo de quimiotaxia (WANG *et al.*, 2018). Essas substâncias induzem bactérias a expressar genes de nodulação (LINDSTRÖM; MOUSAVI, 2020; ROY *et al.*, 2020). Depois da transcrição desses genes, as bactérias nodulíferas colonizam rapidamente as raízes das leguminosas em desenvolvimento. Nas raízes são liberadas substâncias que induzirão à diferenciação das células vegetais e à aderência das bactérias na parede celular, onde serão liberadas celulasas responsáveis pela abertura do ponto de infecção (BELLONE; BELLONE, 2006). Em função disso, a raiz sofre uma torção de 360° englobando a população de bactérias nodulíferas presentes no ponto de infecção (ARAÚJO; HUNGRIA, 1994). A presença das bactérias nos pelos radiculares induz a formação de um canal de infecção. A partir do momento em que as bactérias se estabelecem no interior, as células vegetais são diferenciadas, levando à formação do nódulo. As bactérias também passam por uma transformação, sendo envolvidas por uma vesícula simbiótica denominada simbiossomo, daí, então, são chamadas de bacteróides. Nessa forma, elas estão aptas a oxidar o dinitrogênio (N₂) no interior dos nódulos por meio do complexo enzimático nitrogenase. Em suma, a formação dos nódulos e a metamorfose da raiz de leguminosa ocorrem conforme descrito a seguir:

- 1- Quimiotaxia
- 2- Multiplicação do rizóbio na rizosfera, colonização (Roc, root colonization);
- 3- Adesão do rizóbio às raízes da planta hospedeira (Roa, root attachment);
- 4- Troca de sinais moleculares entre a planta hospedeira e as bactérias;
- 5- Alterações nos fenótipos radiculares, com a formação de raízes curtas e grossas (Tsr, thick and short root), encurvamento dos pêlos radiculares (Hac, hair curling), pêlos radiculares deformados (Had, hair deformation), aumento no número de pêlos radiculares (Hai, hair increase);
- 6- Penetração da bactéria;
- 7- Crescimento do cordão de infecção (Inf, infection);
- 8- Início de formação e desenvolvimento dos nódulos (Noi,

nodule initiation); 9- Liberação das bactérias (Bar, bacterial release); 10- Diferenciação dos bacteróides (Bad, bacteroid differentiation); 11- Desenvolvimento da nitrogenase, leghemoglobina e enzimas relacionadas com a fixação do N₂ (Nif, nitrogen fixation e Fix, fixation); 12- Manutenção do tecido bacteroidal, função e persistência do nódulo (Nop, nodule persistence) (HUNGRIA *et al.*, 1994, p. 21).

Hoje são conhecidas diversas espécies de bactérias que atuam em simbiose com leguminosas (PEIX *et al.*, 2015). A utilização dessas bactérias para promover o crescimento vegetal em leguminosas de interesse econômico já é explorada há um bom tempo, como por exemplo, para o feijoeiro (HUNGRIA *et al.*, 2003).

2.4 Fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro

Algumas leguminosas, assim como o feijoeiro, formam simbiose com diversas espécies de rizóbios e biovars¹ (ANDREWS; ANDREWS, 2017). Leguminosas com essa característica são definidas como promíscuas (MICHIELS *et al.*, 1998). Essa predisposição do feijoeiro de ser nodulado por vários biovars pode conferir à planta relevante vantagem ecológica (SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020). A maioria das espécies que nodulam o feijoeiro é do grupo das α -Proteobacteria, sendo principalmente do gênero *Rhizobium* seguido pelos gêneros *Ensifer*, *Pararhizobium* e *Bradyrhizobium*, respectivamente (SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020). No grupo das β -Proteobactérias, espécies dos gêneros *Paraburkholderia* e *Cupriavidus* também podem formar nódulos no feijoeiro (SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020). Porém, muito das bactérias pertencentes a esses gêneros não são eficientes para fixação de N₂ (MICHIELS *et al.*, 1998). Devido a isso, assim como ocorreu para as bactérias *Rhizobium tropici* estirpes CIAT 899 (MARTINEZ-ROMERO *et al.*, 1991) e CPAC H12 (MOSTASSO *et al.*, 2002) e *R. freirei* estirpe PRF 81 (HUNGRIA *et al.*, 2000) constantemente novos isolados de rizóbios são testados quanto a eficiência de fixar N₂ e promover ganhos de produtividade pelo feijoeiro (LISBOA *et al.*, 2021; MERCANTE *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2006).

A FBN em plantas de feijoeiro começa a ocorrer entre 15 a 20 dias após a germinação (MERCANTE *et al.*, 1992), sendo genótipos de ciclo precoce e semiprecoce mais beneficiados pelo processo do que os de ciclo regular ou tardio (ANDRAUS *et al.*, 2016). A

¹ Biovars (biological variants) have been described in diverse bacterial species and reveal the different biochemical and enzymatic characteristics within a species. A biovar represents a group of bacterial strains distinguishable from other strains of the same species on the basis of physiological or biochemical characters. Biovars were formerly known as biotypes. In rhizobia biovars have been used to distinguish symbiotically distinct subgroups within a single rhizobial species. (ROGE; ORMENO-ORRILLO; ROMERO, 2011).

presença de nódulos no feijoeiro pode ser avaliada no período 20 a 25 dias após a emergência (DAE) com a retirada cuidadosa de uma amostra aleatória de plantas. Se a média do número de nódulos com tamanho aproximado de 5 mm, estiver entre 10 e 20, é um indicativo de que a inoculação foi bem-sucedida (MERCANTE *et al.*, 1992). Caso nesse período, as plantas apresentem um número baixo de nódulos e amarelecimento na lavoura, ainda pode ser aplicado em cobertura 40 kg N ha⁻¹, de modo a garantir o retorno financeiro esperado com a cultura (MERCANTE *et al.*, 1992).

O ganho promocional em grãos do feijoeiro por meio da FBN não é tão elevado como no caso da soja, em que as estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas podem suprir até 85% das necessidades de N da cultura (REIS JUNIOR *et al.*, 2011). No caso do feijoeiro, há possibilidade dos rizóbios inoculados concorrerem para nodular a planta com espécies nativas ineficientes em fixar N₂ (DOWLING; BROUGHTON, 1986; THIES *et al.*, 1991; MUÑOZ-AZCARATE *et al.*, 2017; MWENDA *et al.*, 2018). Segundo Vargas *et al.* (2000), áreas com histórico de cultivo sucessivo de feijoeiro tendem a aumentar sua população de bactérias nativas no solo, o que pode interferir no desempenho para nodulação de rizóbios elites inoculados. Além disso, a nodulação do feijoeiro por estirpes elite pode ter entraves relacionados ao manejo e à fertilidade do solo, ao genótipo da planta, ao tipo e modo de aplicação do inoculante, à instabilidade genética ocasionada nas bactérias utilizadas como inoculante, dentre outros. (HARTWIG, 1998; RENGEL, 2002; TORABIAN; FARHANGI-ABRIZ; DENTON, 2019).

Apesar de algumas limitações, estudos mostram que a FBN no feijoeiro pode ser bem-sucedida, podendo contribuir com até 75,8% do nitrogênio total requerido pela planta (HUNGRIA; NEVES, 1987; MOREIRA *et al.*, 2017). Em campo, há relatos de rendimentos em grãos, superiores ao controle sem inoculação, igual a 1.776 kg ha⁻¹ para a variedade CNPAF-178 testada com as estirpes de *Rhizobium* spp. UMR1020, UMR1135 e CIAT 899 (MENDES *et al.*, 1994); a 1.085 kg ha⁻¹ para a variedade Capixaba Precoce testada com as estirpes de *Rhizobium* spp. UMR1024, UMR 1135 e CPAC V-23 (MENDES *et al.*, 1994); a 906 kg ha⁻¹ para a variedade Carioca testada com *R. freirei* estirpe PRF 81 (HUNGRIA *et al.*, 2000); a 437 kg ha⁻¹ média para as variedades Ouro Negro e Pérola avaliada com *R. tropici* estirpe CPAC H12 (HUNGRIA *et al.*, 2003). Estudos mostram que a inoculação com rizóbios pode substituir a adubação nitrogenada em até 20 kg ha⁻¹ no semeio do feijão-comum (BARROS *et al.*, 2013). Dependendo da variedade de feijão-comum a inoculação com as estirpes CIAT 899 e PRF 81 pode substituir até 80 kg ha⁻¹ de N-fertilizante (OTSUBO *et al.*,

2013). Há relatos também, para a produção significativa de grãos, quando comparado ao controle, para o feijoeiro inoculado com estirpes elite e complementação com N-fertilizante em adubação de cobertura (BRITO *et al.*, 2015) ou de plantio (SOARES *et al.*, 2016), bem como para a coinoculação de estirpes de *R. tropici* com estirpes da espécie *Azospirillum brasilense* (FERREIRA; DA SILVA; WANDER, 2020; FILIPINI *et al.*, 2021). No entanto, deve se ter cuidado ao utilizar adubação com N-fertilizante, pois pode reduzir o número de nódulos e, conseqüentemente, afetar o processo de FBN (SOARES *et al.*, 2016; DE SOUSA *et al.*, 2020). Por outro lado, existem trabalhos mostrando que não houve ganho de produção do feijoeiro em função da inoculação com estirpes de rizóbios elite, com ou sem N-fertilizante (BUTTERY *et al.*, 1987; FIGUEIREDO *et al.*, 2016). E que a produtividade (kg ha⁻¹) do feijoeiro inoculado com rizóbios pode ser significativamente responsiva ou não, conforme o solo cultivado (FONSECA *et al.*, 2013).

2.5 Inoculante para feijoeiro

A comercialização de inoculante a base de bactérias diazotróficas no Brasil teve início em meados do século passado no Rio Grande do Sul (FREIRE; VERNETTI, 1999). Atualmente, existem no país várias empresas que fornecem inoculantes para diversas culturas, inclusive a do feijoeiro. Atualmente é autorizado no Brasil a fabricação de três inoculantes à base de rizóbios, sendo duas da espécie *Rhizobium tropici*, CIAT 899 (SEMIA 4077) de origem colombiana isolada no *International Center for Tropical Agriculture* (CIAT) e a CPAC H12 (SEMIA 4088), isolada no Distrito Federal (MOSTASSO *et al.*; 2002; HUNGRIA *et al.*, 2003) e a PRF 81 (SEMIA 4080) da espécie *R. freirei* (DALL'AGNOL *et al.*, 2013) isolada pelo Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) (HUNGRIA *et al.*, 2000).

A capacidade de novos isolados promoverem o desenvolvimento vegetativo e produtivo do feijoeiro é avaliada tendo como modelo as estirpes elite já certificadas CIAT 899, PRF 81 e CPAC H12 (ABOU-SHANAB *et al.*, 2019; MERCANTE *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018). É possível que determinada estirpe tenha melhor desempenho para nodular e fixar N₂ no feijoeiro na sua região de origem (ARGAW; MULETA, 2018). Entretanto, a estabilidade da estirpe frente às adversidades ambientais é um importante fator a ser considerado (HUNGRIA; VARGAS, 2000), bem como sua capacidade de crescer em meio de cultivo gerando elevada população de células viáveis (> 10⁸ UFC mL⁻¹) e resistir ao armazenamento prolongado, mantendo-se viável até sua utilização como inoculante

(MORENO CONN *et al.*, 2014). As principais características que um isolado rizóbio deve apresentar antes de sua validação como inoculante comercial são:

1- Capacidade de formar nódulos e fixar N na leguminosa alvo; 2- Capacidade de competir na formação de nódulos com populações de rizóbios já presentes no solo; 3- Capacidade de fixar N em uma variedade de condições ambientais; 4- Capacidade de formar nódulos e fixar N na presença de nitrato do solo; 5- Capacidade de crescer bem em meio artificial, em carreador de inoculante e no solo; 6- Capacidade de persistência no solo, particularmente para leguminosas em regeneração anual; 7- Capacidade de migração do local inicial de inoculação; 8- Capacidade de colonizar o solo na ausência de leguminosa hospedeira; 9- Capacidade de tolerar estresses ambientais; 10- Capacidade de fixar N com uma ampla gama de genótipos de hospedeiros; 11- Estabilidade genética; 12- Compatibilidade com agroquímicos. Os fabricantes de inoculantes acrescentam: 13- Ampla gama de hospedeiros; 14- Baixa mortalidade em sementes inoculadas; 15- Capacidade de colonizar a rizosfera da planta hospedeira (BROCKWELL *et al.*, 1995, p. 161).

O inoculante como produto é composto por bactérias selecionadas misturadas a um veículo sólido, geralmente turfoso ou líquido, em forma de fluidos que protegem a célula. Segundo Keyser *et al.* (1992) um bom veículo para inóculo deve apresentar:

1- Alta capacidade de retenção de água; 2- Não ser tóxico para rizóbios; 3- Fácil de esterilizar por autoclave ou irradiação gama; 4- Disponível de forma fácil e barata; 5- Suficientemente adesivo para aplicação eficaz na semente; 6- Capacidade de tamponamento de pH; 7- Capacidades de troca catiônica e aniônica (KEYSER *et al.*, 1992, p. 126-127).

Em termos gerais, a melhor formulação de um inoculante deve considerar aquela que garanta um maior número de células viáveis respeitando o número mínimo de unidades formadoras de colônias, $1,0 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ ou g⁻¹ (BRASIL, 2011). No produto comercial deve constar o prazo de validade de no mínimo seis meses a partir da data de fabricação, conforme exigências do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2011). A formulação utilizada deve assegurar a viabilidade das células nas sementes e no solo contra os efeitos adversos enfrentados até a planta estar receptiva para a colonização (DEAKER *et al.*, 2004). A forma de aplicação do inoculante, em sulcos, foliar, ou revestimento de semente pode ser também um fator determinante para o sucesso de rizóbios elite inoculados (GARCÍA-BLASQUEZ MOROTE; SATO PALOMINO, 2019).

2.6 Estirpes bacterianas alvo desse estudo

As bactérias *Rhizobium tropici* estirpes CIAT 899 (SEMIA 4077) e CPAC H12 (SEMIA 4088) e *R. freirei* estirpe PRF 81 (SEMIA 4080) foram isoladas individualmente a partir de nódulos destacados do feijoeiro cultivados nas cidade de Carmen de Viboral, ANT, Colômbia (MARTINEZ-ROMERO *et al.*, 1991) Planaltina, GO, Brasil (MOSTASSO *et al.*, 2002) e Irati, PR, Brasil (HUNGRIA *et al.*, 2000) respectivamente. Todas elas são Proteobactérias, da classe das α -proteobactérias, gram-negativas de crescimento rápido com tempo de geração entre 2 a 4h (HUNGRIA *et al.*, 2016). Particularmente, a estirpe CIAT 899 se apresenta na forma de colônias circulares, convexas, semitranslúcidas e geralmente de 2 a 4 mm de diâmetro em 48 a 96 h em meio de ágar PY (MARTINEZ-ROMERO *et al.*, 1991). Seu pH ideal de crescimento varia de 5 a 7, e a temperatura na qual ocorre o crescimento pode ser tão alta quanto 40 °C (MARTINEZ-ROMERO *et al.*, 1991). Forma nódulos e fixa nitrogênio em *P. vulgaris*, *Leucaena esculenta* e *Leucaena Eeucocephala* (MARTINEZ-ROMERO *et al.*, 1991). Seu genoma tem tamanho igual a 6,69 Mb resultando em 6.351 genes e conteúdo C+G de 59,5 mol% (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2012). Para a bactéria *R. tropici* estirpe CPAC H12 não existe um trabalho de caracterização em específico, porém, a morfologia das colônias e condições de crescimento são similares àquelas observadas para a estirpe CIAT 899. O genoma da estirpe CPAC H12 possui o tamanho de 6,62 Mb com um total de 6.319 genes e conteúdo C+G de 59,5%, até então não publicado (NCBI, 2022). Quanto à bactéria *R. freirei* estirpe PRF 81, ela se apresenta na forma de colônias circulares, convexas, rosadas, opacas e pegajosas, com produção moderada de muco e geralmente de 2 a 4 mm de diâmetro em 48 a 72 h de incubação a 28 °C em meio YMA (DALL'AGNOL *et al.*, 2013). Além de *P. vulgaris*, essa estirpe também forma nódulos eficazes em *Leucaena leucocephala*, *Leucaena esculenta*, *Crotalaria juncea* e *Macroptilium atropurpureum* (DALL'AGNOL *et al.*, 2013) e possui tamanho de genoma igual a 7,08 Mb com um total de 6.331 genes e conteúdo C+G de 59,9 mol% (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2012).

2.7 Detecção e quantificação de rizóbios inoculados

A inoculação das bactérias capazes de fixar N₂ em plantas de feijoeiro, mostra, em muitos casos, incremento significativo na produção de grãos (HUNGRIA *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 1994; PELEGRIN *et al.*, 2009; PERES *et al.*, 1994). Entretanto, a interação do feijoeiro com rizóbios inoculados depende de *n* variáveis como por exemplo, o genótipo da planta, o meio ambiente e os microbiomas da planta e do solo (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*,

2021). Mesmo assim, a ocupação nodular e/ou o estabelecimento das estirpes inoculadas passa despercebido em alguns trabalhos, que atribuem à fixação de N_2 e, conseqüentemente, os ganhos fitotécnicos a efetividade dos rizóbios em nodular o feijoeiro (MOREIRA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2019; STEINER *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2020). A fixação de N_2 pode ser monitorada utilizando técnicas capazes de inferir o nitrogênio fixado (FARID *et al.*, 2017; LARUE; PATTERSON, 1981). Porém, pode haver rizóbios nativos no sistema que também são eficientes em fixar N_2 no feijoeiro (LISBOA *et al.*, 2021). Além disso, estes são capazes de competir com os rizóbios inoculados por sítios de infecção nas raízes do feijoeiro (THIES *et al.*, 1991). Tudo isso gera incertezas a respeito da eficiência por parte dos rizóbios inoculados estarem fixando N_2 na planta. Baseado nisso, a melhor forma de atribuir os ganhos fitotécnicos bem como a fixação de N_2 por meio de rizóbios elite inoculados é o seu monitoramento nos nódulos e/ou solo rizosférico do feijoeiro (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2021). Portanto, se faz necessária a utilização de técnicas que permitam identificar e quantificar as estirpes inoculadas e presentes nos nódulos do feijoeiro. Essa prática vem sendo adotada há bastante tempo nos ensaios experimentais que envolvem rizóbios inoculados em leguminosas (BROCKWELL, 1963; MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2020; SVENNING *et al.*, 2001; THOMPSON; VINCENT, 1967).

A avaliação da ocupação nodular pode ser realizada por meio de diversos métodos tais como: sorológicos (HUNGRIA *et al.*, 2003; REVELLIN *et al.*, 2018; XAVIER *et al.*, 2006), genes repórteres (STREIT *et al.*, 1995; SESSITSCH *et al.*, 1997; IRISARRI *et al.*, 2019), resistência a antibióticos (ABOU-SHANAB *et al.*, 2019), *fingerprinting* (PERRET; BROUGHTON, 1998; BINDE *et al.*, 2009; MUÑOZ-AZCARATE *et al.*, 2017), Espectrometria de Massa MALDI TOF (ZIEGLER *et al.*, 2012; NDUNGU *et al.*, 2018; ROLIM *et al.*, 2019), sequenciamento de genes altamente conservados (DOTY *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2014; JI *et al.*, 2017) dentre outros. Entretanto, algumas técnicas têm especificidade limitada, necessitando da associação com uma ou mais para uma análise mais robusta (MEKONNENTETO, 2020; REVELLIN *et al.*, 2018), haja vista que bactérias que não nodulam podem coabitar nódulos com bacteróides (MORESU *et al.*, 2008). Enquanto outras técnicas, por envolver manipulação no genoma do organismo alvo, tal como a de genes repórteres, possuem limitações quanto à aplicabilidade em experimento de campo (MERCANTE *et al.*, 2000). Algumas técnicas podem apresentar também como desvantagem, o alto custo por amostra, além do tempo despendido para a análise final (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2020). Dentre as possibilidades para o monitoramento de rizóbios inoculados

a partir dos nódulos, destacam-se as técnicas envolvendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR permite aumentar exponencialmente fragmentos de DNA alvo disponível em baixa concentração numa amostra (GREEN; SAMBROOK, 2019). Em teoria a PCR ocorre *in vitro* envolvendo *primers* ou oligonucleotídeos que variam entre 20 e 25 bases, a amostra de DNA molde, as bases nitrogenadas ou desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), a enzima DNA polimerase, um cofator Mg^{2+} para a enzima e água deionizada, submetidos a 30-35 ciclos compreendidos em três etapas, com variações de temperatura específica para cada uma delas, que são: a desnaturação geralmente acima de 95 °C, o anelamento dos *primers*, variável de 45 a 65 °C e a extensão podendo ser de 55 a 72 °C (GREEN; SAMBROOK, 2019). Os *primers* são as ferramentas moleculares responsáveis pela especificidade da técnica, pois são eles que norteiam as regiões a serem amplificadas (ROBERTSON; WALSH-WELLER, 1998).

Diversos *primers* vêm sendo desenhados no intuito de detectar especificamente rizóbios nos nódulos (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999; RICHARDSON *et al.*, 1995; OSEI *et al.*, 2017). Dentre eles há os que possibilitam separar os gêneros *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* ou até mesmo as espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Sinorhizobium meliloti* (AKIMOVA *et al.*, 2017). Entretanto, os *primers* disponíveis na literatura e que permitem separar as espécies *Rhizobium tropici* estirpes CIAT 899 e CPAC H12 e *R. freirei* estirpe PRF 81 precisam de análise pós PCR por *fingerprinting* (OLIVE; BEAN, 1999; RICHARDSON *et al.*, 1995; SELENSKA-POBELL, 1994) e/ou sequenciamento (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999; OLIVE; BEAN, 1999). Isso inviabiliza as avaliações em grande escala por demandar tempo e custo. Além disso, podem não ser específicos a ponto de diferenciar as estirpes alvo desse estudo com outras da mesma espécie. É importante ressaltar também, que até pouco tempo, a estirpe PRF 81 era classificada como sendo da espécie *R. tropici* (DALL'AGNOL *et al.*, 2013). Tendo em vista essa problemática, o mais apropriado para identificar as estirpes CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81 seria a adoção de *primers* que possibilitem sua análise rápida e específica por PCR. Essa estratégia foi adotada pelos autores Wong-Villarreal e Caballero-Mellado (2010) que desenharam *primers* a partir do gene 16S rRNA para detecção de espécies do gênero *Burkholderia* que nodulam o feijoeiro. Os genomas das bactérias *R. tropici* estirpes CIAT 899 (SEMIA 4077) e CPAC H12 (SEMIA 4088) e *R. freirei* estirpe PRF 81 (SEMIA 4080) estão depositados respectivamente no GenBank: GCA_000330885.1, RefSeq: NZ_QERI000000000.1 e RefSeq: GCF_000359745.1 disponíveis para livre acesso no NCBI. O acesso a esses genomas facilita o desenho de

primers para diversas finalidades, inclusive, para a quantificação das estirpes alvo nos nódulos, raízes e solo em ensaios de qPCR.

Na década de 90, os pesquisadores Higuchi *et al.* (1992) e Holland *et al.* (1991) aperfeiçoaram a técnica da PCR de maneira que a amplificação pudesse ser monitorada e mensurada em tempo real, por meio de fluorescência, surgindo dessa forma, a PCR em Tempo Real ou PCR quantitativa (qPCR) (KRALIK; RICCHI, 2017). Para análise de ácidos nucleicos na qPCR existem métodos baseados em moléculas fluorescentes intercalantes de DNA de fita dupla, como por exemplo, o EvaGreen e SYBR Green I, e o que utiliza nucleotídeos marcados com fluoróforo, como por exemplos, *primer*-sondas (Scorpions), sondas e hidrólise (TaqMan), hibridização (Molecular Beacons) dentre outros, e análogos de ácidos nucleicos, bases não naturais (*primer* Plexor™) etc. (NAVARRO *et al.*, 2015). No entanto, a tecnologia mais em conta e fácil de utilizar é a que contém o corante fluorescente SYBR® Green I (FRAGA *et al.*, 2014; NAVARRO *et al.*, 2015). Apesar da tecnologia SYBR® Green I ser menos específica do que as demais, esse corante é usualmente aplicado em ensaios de qPCR para quantificação de diversos microrganismos (DE SOUZA GODOI *et al.*, 2017; ILHA *et al.*, 2016; PAULO *et al.*, 2014). Entretanto, após os ensaios de qPCR utilizando corantes intercalantes, deve ser observada a curva de dissociação ou de *melting* que mostra, se houve ou não na reação ampliações de falso-positivos facilmente diferenciados dos verdadeiros positivos (LIFE TECHNOLOGIES, 2014; SIGMA-ALDRICH, 2014). Essa curva representa a queda acentuada da emissão de fluorescência durante a dissociação do corante intercalado no produto amplificado submetido à temperatura variando de 50 a 95 °C (NAVARRO *et al.*, 2015). Se tiver havido na reação ampliações inespecíficas e/ou dímero de *primers* eles serão identificados, pois são detectados a baixas temperaturas (NAVARRO *et al.*, 2015). Dessa forma, a curva de *melting* está relacionada à especificidade da amplificação carregada pelos *primers* (FRAGA *et al.*, 2014). No entanto, *primers* que proporcionam ampliações inespecíficas ou a formação de dímeros de *primers*, mesmo depois de ajustes da sua concentração nos ensaios de qPCR, devem ser redesenhados ou descartados (BUSTIN; HUGGETT, 2017).

A avaliação numérica da população de rizóbios no solo é realizada por muitos trabalhos a partir da técnica Número Mais Provável (NMP) (HUNGRIA *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 1972; MASSA *et al.*, 2020). Porém, em um processo demorado e que para amostras ambientais, não pode dar informação quanto a estirpe ou até mesmo espécie e/ou gênero (BRITO *et al.*, 2015). Entretanto, a técnica de qPCR vem ganhando cada vez mais espaço

para quantificação da população de rizóbios no solo (BOONEN *et al.*, 2010; FURSETH *et al.*, 2010; MACDONALD *et al.*, 2011; TRABELSI *et al.*, 2009; YUDISTIRA *et al.*, 2021). São muitos os trabalhos que mostram a robustez e rapidez da qPCR para a quantificação de bactérias diazotróficas endofíticas associadas às culturas de interesse agrícola (FALEIRO *et al.*, 2013; PAULO *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2021; STETS *et al.*, 2015). Inclusive, as quantificações por qPCR e NMP já foram experimentalmente correlacionadas para criação de um modelo matemático representativo do número de *Bradyrhizobium* sp. em determinado solo capazes de nodular a soja [*Glycine max* (L.) Merr.] (FURSETH *et al.*, 2010). Tal feito pode ser vantajoso tendo em vista economizar com ensaios de qPCR. Entretanto, os autores Boonen *et al.* (2010) mostraram em seu trabalho, que a técnica de qPCR pode quantificar em até 30 vezes mais a população de rizóbios no solo do que a técnica NMP. Isso provavelmente porque na qPCR são quantificados fragmentos de DNA isolados tanto de células cultiváveis quanto não cultiváveis. A ocupação nodular também pode ser evidenciada por meio da qPCR, uma vez que, um maior número de fragmentos de DNA alvo pode ser quantificado a partir dos extratos de nódulos oriundos de plantas anteriormente inoculadas (OSEI *et al.*, 2017). *Primers* desenhados para qPCR podem também ser utilizados no controle de qualidade de inoculantes, como por exemplo, a contagem do número de células das bactérias *B. elkanii* SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5079 em amostras de inoculantes para a soja com até 3,5 anos de vencimento (GOULART *et al.*, 2015).

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, A. C. S. *et al.* Sistemas de Produção Agrícola: as principais lavouras. *In*: ABBOUD, A. C. S. **Introdução à Agronomia**. 1. ed. cap. 5. 377-394:644 p.: il. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.
- ABOU-SHANAB, R. A. I. *et al.* Response of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to inoculation with indigenous and commercial *Rhizobium* strains under organic farming systems in Minnesota. **Symbiosis**, v. 78, n. 2, p. 125–134, 2 jun. 2019.
- AKIMOVA, E. S. *et al.* Genetic markers for search of rhizobia based on symbiotic genes. **Microbiology**, v. 86, n. 5, p. 640–646, 23 set. 2017.
- ANDRAUS, M.P.; CARDOSO, A. A.; FERREIRA, E. P. B. Differences in Nodulation and Grain Yield on Common Bean Cultivars with Different Growth Cycles. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 47, n. 9, p. 1148–1161, 14 maio 2016.
- ANDREWS, M.; ANDREWS, M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 705, 26 mar. 2017.
- ARGAW, A.; MULETA, D. Effect of genotypes-Rhizobium-environment interaction on nodulation and productivity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in eastern Ethiopia. **Environmental Systems Research**, v. 6, n. 1, p. 14, 8 jan. 2018.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. **Embrapa**, p. 247, 2012.
- BARROS, R. L. N. *et al.* Interação entre inoculação com rizóbio e adubação nitrogenada de plantio na produtividade do feijoeiro nas épocas da seca e das águas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1443–1450, 2013.
- BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C. **Fijación biológica del nitrógeno atmosférico**. 1. ed. Tucumán: el autor. 223 p.; 24x16 cm. 2006.
- BOMFIM, C. A. *et al.* Brief history of biofertilizers in Brazil: from conventional approaches to new biotechnological solutions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2215–2232, 30 dez. 2021.
- BOONEN, M. *et al.* Quantitative PCR assays to enumerate *Rhizobium leguminosarum* strains in soil also target non viable cells and overestimate those detected by the plant infection method. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2342–2344, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº13, de 24 de março de 2011**. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos microorganismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Seção 1, p. 3-7. 25 mar. 2011.

- BRITO, L. F. *et al.* Resposta do feijoeiro comum à inoculação com rizóbio e suplementação com nitrogênio mineral em dois biomas Brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, p. 981–992, 2015.
- BROCKWELL, J. Accuracy of a Plant-Infection Technique for Counting Populations of *Rhizobium trifolii*. **Applied Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 377–383, set. 1963.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J.; THIES, J. E. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and Solo fertility: A critical assessment. **Plant and Solo**, v. 174, n. 1–2, p. 143–180, jul. 1995.
- BROUGHTON, W J; HERN; AACUTE; NDEZ, G; BLAIR, M; BEEBE, S; GEPTS, P; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant and Solo**, v. 252, n. 1, p. 55–128, 2003.
- BUSTIN, S.; HUGGETT, J. qPCR primer design revisited. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 14, n. March, p. 19-28, 2017.
- BUTTERY, B. R.; PARK, S. J.; FINDLAY, W. I. Fertilizer and to Inoculation with *Rhizobium*. **Canada Journal Plant Science**, v. 432, p. 425–432, 1987.
- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Solo fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. **Symbiosis**, v. 26, n. 2, p. 111–121, 1999.
- COUILLEROT, O. *et al.* Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298–2305, 2010.
- CONAB. Companhia Nacional De Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 9, safra 2021/22, n. 4 quarto levantamento, janeiro. 2022.
- DALL'AGNOL, R. F. *et al.* *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART 11, p. 4167–4173, 2013.
- DE OLIVEIRA, V. M. *et al.* 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**, v. 28, n. 2, p. 137–141, 1999.
- DE SOUSA, M. A. *et al.* Productivity and Economics of Inoculated Common Bean as Affected by Nitrogen Application at Different Phenological Phases. **Journal of Solo Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 4, p. 1848–1858, 2020.
- DE SOUZA GODOI, P. A. *et al.* qPCR for the detection of foodborne *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology International**, v. 66, n. 5, p. 563–566, 2017.
- DEAKER, R.; ROUGHLEY, R.; KENNEDY, I. Legume seed inoculation technology - a review. **Solo Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 1275-1288, 2004.

DOWLING, D. N.; BROUGHTON, W. J. Competition for Nodulation of Legumes. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 131–157, out. 1986.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados conjunturais da produção de feijão comum (Phaseolus vulgaris L.) e caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2020):** área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2021. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em: 28 jan. 2022.

FALEIRO, A. C. *et al.* Real time PCR detection targeting nifA gene of plant growth promoting bacteria Azospirillum brasilense strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, v. 61, n. 3, p. 125–133, 2013.

FARID, M. *et al.* Response to selection for improved nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, v. 213, n. 4, p. 1–13, 2017.

FARINELLI, R. *et al.* Adubação nitrogenada de cobertura no feijoeiro, em plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 307–312, fev. 2006.

FERREIRA, C.; FIGURAEIREDO, R.; ALBERNAZ LUZ, T. Arroz e feijão: intervenção multi-institucional em prol do Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v. 27, n. 1, p. 96, 2018.

FERREIRA, D. C. *et al.* Desempenho agrônômico e tecnológico de feijão sob adubação nitrogenada em duas épocas de semeadura. **Agrarian**, v. 14, n. 52, p. 185–193, 21 jul. 2021.

FERREIRA, E. P. de B.; DA SILVA, O. F.; WANDER, A. E. Economics of rhizobia and azospirilla co-inoculation in irrigated common bean in commercial and family farming. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, 2020.

FIGUEIREDO, M. A. de *et al.* Adubações nitrogenada e molíbdica e inoculação com *Rhizobium* spp. No feijoeiro-comum em dois latossolos. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 38, n. 1, p. 85–92, 1 jan. 2016.

FILIPINI, L. D. *et al.* Application of Azospirillum on seeds and leaves, associated with Rhizobium inoculation, increases growth and yield of common bean. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 3, p. 1033–1038, 2021.

FONSECA, G. G. *et al.* Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 6, p. 1778–1787, 2013.

FRAGA, D.; MEULIA, T.; FENSTER, S. Real-Time PCR. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 8, n. 1, p. 10.3.1-10.3.40, 11 fev. 2014.

FREIRE, J. R. J.; VERNETTI, F. J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 5, p. 117-126, 1999.

FURSETH, B. J.; CONLEY, S. P.; ANÉ, J.-M. Enumeration of Soybean-Associated Rhizobia with Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2591–2596, nov. 2010.

GARCÍA-BLASQUEZ MOROTE, C.; SATO PALOMINO, M. Técnicas de aislamiento, identificación, selección de cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum* y producción de inoculantes. **Investigación**, v. 27, n. 1, 1 jan. 2019.

GOULART, K. C. S. *et al.* Detection and Enumeration of Bradyrhizobia Cells by Real-Time PCR Quantification. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, v. 4, n. 1, p. 148–154, 2015.

GRANGE, L. *et al.* New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Solo Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 867–876, abr. 2007.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2019, n. 6, p. pdb.top095109, 3 jun. 2019.

HARTWIG, U. A. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 1, n. 1, p. 92–120, jan. 1998.

HIGUCHI, R. *et al.* Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. **Bio/Technology**, v. 10, n. 4, p. 413–417, abr. 1992.

HOLLAND, P. M. *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7276–7280, 15 ago. 1991.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2965–2982, 1996.

HUNGRIA M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. Fixação Biológica do Nitrogênio em Soja. *In*: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Eds.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. 1a. ed. Brasília, DF, Brasil: EMBRAPA-CNPAF, p. 9–90, 1994.

HUNGRIA, M. *et al.* Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Solo Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11–12, p. 1515–1528, out. 2000.

HUNGRIA, M. *et al.* Isolation and growth of rhizobia. *In*: DILWORTH, J. G.; HOWIESON, M. J. (Eds.). **Working with rhizobia**. 1. ed. Canberra, Australia.: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), 2016. p. 39–60.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Eds.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. 1. ed. Brasília, DF, Brasil: EMBRAPA-CNPAF, 1994.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Solos**, v. 39, n. 2, p. 88–93, 1 dez. 2003.

HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Partitioning of nitrogen from biological fixation and fertilizer in *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v. 69, n. 1, p. 55–63, jan. 1987.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2–3, p. 151–164, mar. 2000.

ILHA, E. C. *et al.* Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 597–606, 2016.

KEYSER, H. H.; SOMASEGARAN, P.; BOHLOOL, B. B. Rhizobial ecology and technology. METTING JR., F. B. (Ed). *In: Solo Microbial Ecology*. Applications in Agricultural and Environmental Management. 1992.

KEYSER, H. H.; LI, F. Potential for increasing biological nitrogen fixation in soybean. **Plant and Soil** 141, 119-135, 1992.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–9, 2017.

LARUE, T. A.; PATTERSON, T. G. How much nitrogen do legumes fix? **Advances in Agronomy**, v. 34, n. C, p. 15–38, 1981.

LIFE TECHNOLOGIES. Real-time PCR handbook. **Life Technologies™**, v. 1, p. 68, 2014.

LINDSTRÖM, K.; MOUSAVI, S. A. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 1314–1335, 4 set. 2020.

LISBOA, B. B. *et al.* Indigenous rhizobial strains SEMIA 4108 and SEMIA 4107 for common bean inoculation: A biotechnological tool for cleaner and more sustainable agriculture. **Experimental Agriculture**, v. 57, n. 1, p. 57–67, 16 fev. 2021.

LOPES, A. D. S. *et al.* Manejo De Irrigação E Teores De Nitrogênio, Fósforo E Boro Na Cultura Do Feijão. **Cultura Agrônômica: Revista de Ciências Agrônômicas**, v. 26, n. 1, p. 21–32, 2017.

LOPES, E. S. *et al.* Número mais provável e eficiência de *Rhizobium* autóctone para soja perene e siratro em quatro Grandes Grupos de solos do estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 31, n. único, p. 235–248, 1972.

MACDONALD, C. A. *et al.* Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Rhizobium leguminosarum* bacteria and discrimination between different biovars in zinc-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4626–4633, 2011.

MARTINEZ-ROMERO, E. *et al.* *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 417–426, 1991.

- MASSA, N. *et al.* Selected autochthonous rhizobia , applied in combination with AM fungi , improve seed quality of common bean cultivated in reduced fertilization condition. **Applied Soil Ecology**, v. 148, n. March 2019, p. 103507, 2020.
- MEKONNENTETO, A. Characterization of symbiotic effectiveness of rhizobia nodulating field pea (*Pisum Sativum*). **International Research Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 305–312, dez. 2020.
- MENDES, I. *et al.* Eficiência fixadora de estirpes de rizóbio em duas cultivares de feijoeiro. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 18, n. 3, p. 421–425, 1994.
- MENDOZA-SUÁREZ, M. A. *et al.* Optimizing Rhizobium- legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N₂ fixation in nodules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 18, p. 9822–9831, 5 maio 2020.
- MENDOZA-SUÁREZ, M. *et al.* Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the Rhizobium-Legume Symbioses. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. August, 19 ago. 2021.
- MERCANTE, F. M. *et al.* A inoculação do feijoeiro comum com rizóbio. EMBRAPA-CNPBS. **Comunicado Técnico**, v. 10, p. 1–8, 1992.
- MERCANTE, F. M.; OTSUBO, A. A.; BRITO, O. R. New native rhizobia strains for inoculation of common bean in the Brazilian savanna. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 41, p. 1–11, 2017.
- MERCANTE, F. M.; RUMJANEK, N. G.; FRANCO, A. A. Aplicação de genes marcadores em estudos de ecologia microbiana com ênfase no sistema GUS. **Ciência Rural**, v. 30, n. 3, p. 533–539, 2000.
- MICHIELS, J. *et al.* Phaseolus vulgaris is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, n. 3, p. 193–205, ago. 1998.
- MOREIRA, L. P.; OLIVEIRA, A. P. S.; FERREIRA, E. P. DE B. Nodulation, contribution of biological N₂ fixation, and productivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculated with rhizobia isolates. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 6, p. 644–651, 20 jun. 2017.
- MORENO CONN, L. M. *et al.* Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno utilizadas en la elaboración de inoculantes biológicos para arveja (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max*). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 16, n. 2, p. 45–56, 1 dez. 2014.
- MOSTASSO, L. *et al.* Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 2–3, p. 121–132, jan. 2002.
- MUÑOZ-AZCARATE, O.; M GONZÁLEZ, A.; SANTALLA, M. Natural rhizobial diversity helps to reveal genes and QTLs associated with biological nitrogen fixation in common bean. **AIMS Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 435–466, 2017.

MWENDA, G. M. *et al.* Genetic diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia in Kenya. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 291–299, 2018.

NASEER, I. *et al.* **Rhizobial Inoculants for Sustainable Agriculture: Prospects and Applications**. In: [s.l.: s.n.]. p. 245–283.

NAVARRO, E. *et al.* Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231–250, 2015.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. *Rhizobium* sp. SEMIA 4088 Sequenciamento e montagem do genoma. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/13837?genome_assembly_id=490606>. Acesso em: 14 maio 2022.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661–1669, 1999.

OLIVEIRA, D. P. *et al.* *Rhizobium* strains selected from the Amazon region increase the yield of snap bean genotypes in protected cultivation. **Bragantia**, v. 77, n. 2, p. 292–298, 2018.

OLIVEIRA, D. P. *et al.* Liquid inoculation with rhizobia in the planting furrow of common bean under no-till is feasible under different soil and climatic conditions. **Crop Science**, v. 59, n. 5, p. 2178–2184, 2019.

ORMEÑO-ORRILLO, E. *et al.* Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2012.

OSEI, O. *et al.* PCR assay for direct specific detection of *Bradyrhizobium* elite strain BR 3262 in root nodule extracts of soil-grown cowpea. **Plant and Soil**, v. 417, n. 1–2, p. 535–548, 15 ago. 2017.

OTSUBO, A. A.; BRITO, O. R.; MERCANTE, F. M. Productivity and nodulation of promising lineages of the Carioca bean group inoculated with *Rhizobium tropici* or supplemented with nitrogen fertilizer. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2763–2776, 2013.

PAULO, M. F. B. S. *et al.* Development of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane grown under field conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 31, p. 2937–2946, 30 jul. 2014.

PAULO, M. F. B. S. *et al.* Development of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane grown under field conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 31, p. 2937–2946, 30 jul. 2014.

- PEIX, A. *et al.* Bacterial Associations with Legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. November 2014, p. 17–42, 2015.
- PELEGRIN, R. de *et al.* Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 219–226, fev. 2009.
- PERES, J. R. R. *et al.* Efeito da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada em sete cultivares de feijão em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 18, n. March, p. 415–420, 1994.
- POHAN, S. D.; SILABAN, L. M.; PUSPITASARI, W. D. The Induction of Root Nodule and Increasing of Nitrogen Content of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Using Rhizobium Plus Fertilizer. The 3rd SATREPS Conference. **Anais [...]**, 2019.
- REIS JUNIOR, F. B. *et al.* Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. (Eds.). . **Biotechnologia: estado da arte e aplicacoes na agropecuaria**. 1. ed. Planaltina, DF, Brasil: Embrapa Cerrados, 2011. p. 247–319.
- RENGEL, Z. Breeding for better symbiosis. **Plant and Solo**, v. 245, n. 1, p. 147–162, 2002.
- REVELLIN, C. *et al.* Long-term exposure of agricultural soil to veterinary antibiotics changes the population structure of symbiotic nitrogen-fixing rhizobacteria occupying nodules of soybeans (*Glycine max*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 9, 2018.
- RICHARDSON, A. E. *et al.* Differentiation of Rhizobium strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4–5, p. 515–524, 1995.
- ROBERTSON, J. M.; WALSH-WELLER, J. An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 98, n. 12, p. 121–154, 1998.
- ROGEL, M. A.; ORMENO-ORRILLO, E.; MARTINEZ ROMERO, E. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. **About the journal Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 96-104, 2011.
- ROSOLEM, C. A.; MARUBAYASHI, O. M. Nutrição e adubação do feijoeiro. **Informações Agronômicas**, n. 68, p. 1–16, 1994.
- ROY, S. *et al.* Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant cell**, v. 32, n. 1, p. 15–41, 2020.
- SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Mechanism of mo-dependent nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 701–722, 2009.
- SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Composition and Nutritive Value of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **World review of nutrition and dietetics**. [*S. l.: s. n.*], 1989. v. 60, p. 132–198.

SHAMSELDIN, A.; VELÁZQUEZ, E. The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 1–12, 2020.

SIGMA-ALDRICH. A Technical Guide PRC TECHNOLOGIES: PRC, RT-PCR, qPCR, TR-qPCR, dPCR. **Sigma-Aldrich**TM. World Headquarters 3050 Spruce St.; St. Louis, MO 63103: [s.n.].

SILVA, O. F.; WANDER, A. E. O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro. Santo Antônio de Goiás, GO, Brasil: **Embrapa Arroz e Feijão**, 2013. v. 287.

SILVEIRA, M. A. *et al.* Produção de Feijão nos Sistemas de Plantio Direto e Convencional no Município de Água Fria de Goiás (GO). **Conjuntura Econômica Goiana**, n. 32, p. 64–76, 2015.

SOARES, A. L. de L. *et al.* Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG): II - feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 5, p. 803–811, 2006.

SOARES, I. C. *et al.* Real-time PCR method to quantify Sp245 strain of *Azospirillum baldaniorum* on *Brachiaria* grasses under field conditions. **Plant and Soil**, 2021.

STEINER, F. *et al.* Co-Inoculation of Common Bean with *Rhizobium* and *Azospirillum* Enhance the Drought Tolerance. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 67, n. 5, p. 923–932, 30 set. 2020.

STETS, M. I. *et al.* Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 bacteria in wheat roots by strain-specific quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6700–6709, 2015.

SVENNING, M. M. *et al.* Competition for Nodule Occupancy Between Introduced Strains of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *trifolii* and its Influence on Plant Production. **Annals of Botany**, v. 88, n. 4, p. 781–787, out. 2001.

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**, v. 57, n. 1, p. 19–28, 1991.

THOMPSON, J. A.; VINCENT, J. M. Methods of detection and estimation of rhizobia in soil. **Plant and Soil**, v. 26, n. 1, p. 72–84, 1967.

TORABIAN, S.; FARHANGI-ABRIZ, S.; DENTON, M. D. Do tillage systems influence nitrogen fixation in legumes? A review. **Solo and Tillage Research**, v. 185, p. 113–121, January 2018.

TRABELSI, D. *et al.* Development of real-time PCR assay for detection and quantification of *Sinorhizobium meliloti* in soil and plant tissue. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 355–361, 2009.

URREA-VALENCIA, S. *et al.* Detection of *Azospirillum brasilense* by qPCR throughout a maize field trial. **Applied Soil Ecology**, v. 160, n. December 2020, 2021.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two cerrados Solos. **Biology and Fertility of Solos**, v. 32, n. 3, p. 228–233, 3 nov. 2000.

VASCONCELOS, L. D. E.; FERREIRA, M.; CARVALHO, F. D. E. **Co-inoculation of selected nodule endophytic rhizobacterial strains with *Rhizobium tropici* promotes plant growth and controls damping off in common bean.** v. 30, n. 1, p. 98–108, 2020.

VENTURI, V.; KEEL, C. Signaling in the Rhizosphere. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 3, p. 187–198, mar. 2016.

WANG, Q.; LIU, J.; ZHU, H. Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. March, p. 1–8, 9 mar. 2018.

WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating Burkholderia species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 35–43, 2010.

YUDISTIRA, H. *et al.* qPCR assay targeting *Bradyrhizobium japonicum* shows that row spacing and soybean density affects *Bradyrhizobium* population. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 529–536, jul. 2021.

ZAMBUDIO, S.; FERREIRA, N. L. Fixação Biológica de Nitrogênio. *In: XXI Ciência para a vida: revolução no solo: conheça o trabalho das bactérias que protegem o planeta.* Brasília, DF, n. 1, jun. 2012.

CAPÍTULO 2 *PRIMERS* ESPECÍFICOS PARA DETECÇÃO RÁPIDA POR PCR DAS BACTÉRIAS *RHIZOBIUM TROPICI* ESTIRPES CIAT 899 E CPAC H12 E *RHIZOBIUM FREIREI* ESTIRPE PRF 81

RESUMO

O sucesso da simbiose entre a planta do feijoeiro e rizóbios inoculados pode estar atrelado a diversos fatores, dentre eles, a competitividade das estirpes inoculantes frente à microbiota natural existente. A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode ser utilizada para o monitoramento de microrganismos associados às plantas, necessitando, para isso, do emprego de *primers* específicos para o organismo alvo. Nesse contexto, foram desenhados e testados *primers* específicos para amplificação do DNA alvo no genoma de cada uma das bactérias *Rhizobium tropici* estirpes CIAT 899 e CPAC H12 e *R. freirei* estirpe PRF 81, competentes para nodular raízes da planta de feijoeiro. A especificidade dos *primers* foi atestada em ensaios de PCR de forma exclusiva para as estirpes alvo, utilizando 45 amostras de DNA pertencentes a outras bactérias da família Rhizobiaceae. No total, foram selecionados sete e onze pares de *primers* específicos para as estirpes PRF 81 e CIAT 899, respectivamente. Observou-se que as estirpes CIAT 899 e CPAC H12 possuem uma alta proximidade genética, uma vez que todos os *primers* selecionados para a estirpe CIAT 899 amplificam também, fragmentos de DNA alvo no genoma da estirpe CPAC H12. Baseado nessa informação, esse estudo limitou-se a ensaios experimentais utilizando somente as bactérias CIAT 899 e PRF 81. No ensaio experimental para avaliação da ocupação nodular, os *primers* desenhados detectaram majoritariamente as bactérias CIAT 899 e PRF 81 nos tratamentos inoculados, separadamente, com cada uma delas. A taxa de ocupação nodular em plantas de feijoeiro inoculado foi superior a 87% por parte das estirpes alvo desse estudo. Portanto, tais *primers* se mostraram ferramentas moleculares práticas e confiáveis para a detecção das estirpes bacterianas CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81.

Palavras chave: *Phaseolus vulgaris*. *Rhizobium* sp. *Primers* PCR. CIAT 899. PRF 81. CPAC H12.

ABSTRACT

The success of the rhizobium-common bean symbiosis may be linked to several factors, among them the competitiveness of the inoculant strains against the existing natural microbiota. The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique can be used to monitor microorganisms associated with plants, requiring the use of specific primers for the target organism. In this context, specific primers were designed and tested for amplifying the target DNA of *Rhizobium tropici* strains CIAT 899 and CPAC H12 and *R. freirei* strain PRF 81, able to nodulate the common bean. The specificity of the primers was attested in PCR assays with the target strains and 45 other bacteria of the Rhizobiaceae family. Seven and eleven specific primer pairs were selected for strains PRF 81 and CIAT 899, respectively. It was observed that strains CIAT 899 and CPAC H12 have high genetic proximity since all primers selected for strain CIAT 899 also amplify target DNA fragments in the genome of strain CPAC H12. Based on this information, this study was limited to experimental assays using CIAT 899 and PRF 81. In the experimental assay to evaluate the nodular occupation, the designed primers detected mostly CIAT 899 and PRF 81 in the treatments where they were inoculated separately. The nodular occupancy rate was higher than 87%. Therefore, such primers proved practical and reliable molecular tools for detecting the Rhizobium strains CIAT 899, CPAC H12, and PRF 81.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. *Rhizobium* sp. PCR primers. CIAT 899. PRF 81. CPAC H12.

1 INTRODUÇÃO

As estirpes CIAT 899 (SEMIA 4077) e CPAC H12 (SEMIA 4088) de *Rhizobium tropici* e PRF 81 (SEMIA 4080) de *R. freirei* são as três oficialmente recomendadas e comercializadas no Brasil como inoculantes para cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) (BRASIL, 2011). Essas bactérias foram isoladas de nódulos de feijoeiro cultivado em solos colombiano e brasileiro (HUNGRIA *et al.*, 2000) e têm se mostrado competentes para a nodulação eficiente dessa espécie (HUNGRIA *et al.*, 2003). Esses bons resultados fizeram com que essas estirpes se tornassem modelos para o estudo da simbiose de rizóbios com a cultura do feijoeiro (MERCANTE *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018; TORRES *et al.*, 2020).

Apesar dos bons resultados e recomendações, as taxas de ocupação nodular por CIAT 899, CPACH12 e/ou PRF 81 são negligenciadas por muitos trabalhos ou, quando realizadas, isso é feito por meio de técnicas laboriosas (HUNGRIA *et al.*, 2000; HUNGRIA *et al.*, 2003; MOSTASSO *et al.*, 2002). Além disso, a planta do feijoeiro é nodulada por diversas espécies de rizóbio existentes no solo e que competem com as inoculadas pelos sítios de infecção radicular (MICHIELS, 1998). Assim sendo, a avaliação da ocupação nodular pelas estirpes inoculadas permite avaliar a aptidão e/ou desempenho dessas estirpes em distintas condições de cultivo.

Diversas técnicas tais como a sorológica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (VU *et al.*, 2017), resistência a antibióticos (NAAMALA *et al.*, 2016), técnicas derivadas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como por exemplo, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight* (MALDITOF) *mass spectrometry* (MS) (NDUNGU *et al.*, 2018) são empregadas para o monitoramento de rizóbios inoculados em plantas da família Leguminosae. No entanto, tendo em vista a diversidade microbiana associada às plantas (KANDEL *et al.*, 2017), algumas dessas técnicas citadas podem apresentar limitação relacionada a sua especificidade. Sendo assim, é recomendada a associação de duas ou mais das técnicas citadas para a correta identificação da estirpe alvo (SCHLOTTER *et al.*, 1995; VÁSQUEZ-ARROYO *et al.*, 1998). Muito delas são melhor empregadas para a caracterização microbiana (SWARNALAKSHMI *et al.*, 2020). A PCR ou PCR convencional (PCR) é uma técnica precisa e sensível que pode ser utilizada para detecção direta de determinado organismo alvo (HILL; STEWART, 1992). A especificidade dessa técnica está

diretamente relacionada ao emprego de *primers* específicos (HILL; STEWART, 1992). Este é o ponto chave da técnica, possibilitando a amplificação *in vitro* de determinado gene ou fragmento de DNA a partir de uma quantidade ínfima de DNA do organismo alvo (HILL; STEWART, 1992).

A PCR já foi utilizada para detectar *Rhizobium* sp., inclusive para bactérias da espécie *Rhizobium tropici* (AGUILAR *et al.*, 1998; DE OLIVEIRA *et al.*, 1999; DOTY *et al.*, 2005). O trabalho de Richardson *et al.* (1995) é um dos pioneiros a empregar *primers* para diferenciação de espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Rhizobium*. No seu estudo, esses autores conseguiram por meio do perfil de bandas polimórficas obtidas por PCR, utilizando os *primers* RPO1 (WATSON; SCHOFIELD, 1985) RPO4 e RPO5, detectar diferentes estirpes dentro das espécies *Rhizobium meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e *R. leguminosarum* bv. *viciae*. De Oliveira *et al.* (1999) desenharam os *primers* rhizo1f, rhizo2f e rhizo3r, os quais, em determinadas combinações, separam as espécies *R. tropici* e *R. leguminosarum*. No entanto, para tal, deve ser realizada uma *nested* PCR, utilizando como molde para a próxima reação o produto de 1,5 Kb referente à região intergênica 16S–23S rRNA amplificada na primeira PCR por meio dos *primers* pHr (MASSOL-DEYA *et al.*, 1995) e p23Suni322anti (HONEYCUTT *et al.*, 1995). Além disso, De Oliveira *et al.* (1999) relataram que a análise por DGGE do produto da *nested* PCR, utilizando os *primers* rhizo2f e rhizo3r, torna possível separar as estirpes CCT 4160^T e CCT 4164 da espécie *R. tropici*. Segundo os autores, a utilização deste par de *primers* gera um polimorfismo de bandas suficiente para a utilização da técnica de DGGE com sucesso. Outros *primers* universais desenhados a partir da região 23S rRNA e do gene *nifH* também foram utilizados para diferenciar a estirpe CIAT 899 da espécie *R. tropici* de outros isolados próximos (DOTY *et al.*, 2005). Entretanto, os produtos formados por eles na PCR necessitam do sequenciamento para então se fazer a comparação de proximidade (DOTY *et al.*, 2005). Em outro trabalho, Oliveira *et al.* (2006) reforçaram a especificidade dos *primers* rhizo1f, rhizo2f e rhizo3r (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999) e os empregaram de forma prática para o monitoramento das espécies *R. tropici* e *R. leguminosarum* a partir de amostras de solo coletadas em áreas agrícolas sob condições de manejo distintas. Entretanto, apesar do número de *primers* citados na literatura para o monitoramento de bactérias do gênero *Rhizobium* sp., inclusive para a espécie *R. tropici*, os resultados a partir deles ainda são dependentes da associação conjunta e/ou do emprego da técnica DGGE e/ou demandam análise de sequenciamento pós PCR.

Até então, foram descritas 48 espécies de *Rhizobium* (IYER; RAJKUMAR, 2018). E os *primers* descritos na literatura para o monitoramento de bactérias desse gênero não foram desenhados para separar as estirpes alvo desse estudo. Além do mais, a estirpe PRF 81 até pouco tempo era classificada como pertencente à espécie *R. tropici*. A diferença entre essa estirpe e a CIAT 899 começou a ser elucidada por meio do sequenciamento dos seus genomas, que mostram diferenças consideráveis entre si, porém, com alta similaridade de seus plasmídeos simbióticos (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2012). Além disso, análises moleculares e fenotípicas envolvendo 11 estirpes tipo de espécies, filogeneticamente relacionadas ao grupo *R. tropici*, consolidou a diferença existente entre as duas estirpes, classificando a estirpe PRF 81 como uma nova espécie chamada *R. freirei* (DALL'AGNOL *et al.*, 2013).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi desenhar *primers* estirpe específicos para detectar por PCR convencional as bactérias *Rhizobium tropici* estirpes CIAT 899, CPAC H12 e *R. freirei* estirpe PRF 81, a partir de diversas matrizes como por exemplo, diretamente do extrato de nódulos contendo a bactéria alvo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenho dos *primers*

Para desenhar os *primers*, os genomas das estirpes CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81 foram comparados entre si e com genomas de estirpes intimamente relacionadas (BR 219, BR 249, BR 250, BR 314, BR 315, BR 317, BR 318 e BR 362) conforme definido por Ribeiro (2017) e com genomas da base de dados *RefSoil* (DUNIVIN *et al.*, 2019). Decidiu-se trabalhar apenas com regiões codificantes presentes nos cromossomos, as quais foram alinhadas entre os diferentes genomas. No total, 25 genes únicos para a estirpe CIAT 899 e 20 para a estirpe PRF 81 foram selecionados para o desenho dos *primers*, utilizando-se como critério a ausência, ou menor similaridade com outros genes dos genomas depositados no banco de dados GenBank disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (APÊNDICES A e B). Não foi possível selecionar regiões genômicas que diferenciavam as estirpes CIAT 899 e CPAC H12, pois seus genomas apresentaram uma identidade média de nucleotídeos de 99,99% conforme determinado pelo fastANI (JAIN *et al.*, 2018) na plataforma KBase (ARKIN *et al.*, 2018). Além disso, a proximidade entre essas estirpes CIAT 899 e CPAC H12 também foi averiguada por meio do perfil de bandas para cada um dos *primers* randômicos BOX A1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (VERSALOVIC *et al.*, 1994) e RPO1 5'-AATTTTCAAGCGTCGTGCCA-3' (RICHARDSON *et al.*, 1995) e por meio de suas proteínas utilizando a técnica SM MALDI TOF. Portanto, para o desenho dos *primers* foram utilizadas regiões codificantes presentes apenas nos genomas das estirpes CIAT 899 e PRF 81 (APÊNDICES A e B). Os *primers* foram desenhados utilizando o programa *Oligo explore* v.1.2, conforme os seguintes critérios: i- tamanhos de 18 a 21 nucleotídeos; ii- conteúdo CG entre 45 e 55%; iii- últimas cinco bases da extremidade 3'-OH contendo de duas a três bases nitrogenadas (C e/ou G); iv- temperatura de anelamento de 59 ± 2 °C; v- temperatura de *melting* de ~ 60 °C sendo entre os *primers* ($\Delta T_m < 2$ °C); e vi- amplicons de 75 a 150 pb (GREEN; SAMBROOK, 2019).

2.2 Análise utilizando SM MALDI TOF

Para a comparação do perfil protéico dos rizóbios alvo desse estudo, estirpes CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81, também foram utilizados outros rizóbios, a saber: *Agrobacterium tumefaciens* estirpe BR 313, *Agrobacterium* sp. estirpe BR 272, *Rhizobium jaguaris* estirpe BR 219, *R. leguminosarum* estirpe BR 268, *R. leucaenae* estirpes BR 367 e BR 920, *R. mesoamericanum* estirpe BR 364, *R. miluonense* estirpe BR 315, *R. phaseoli* estirpe BR 222, *Rhizobium* sp. estirpes BR 224, BR 232, BR 240, BR 249, BR 252, BR 256, BR 275, BR 276, BR 278, BR 284, BR 312, BR 314, BR 327, BR 342, BR 357, BR 362 e BR 373 e *Sinorhizobium americanum* estirpe BR 922. Essas bactérias foram crescidas no meio 79 sólido em placas de Petri a 28 °C entre 24-36 h. Após o crescimento, uma alça cheia (~10 µL) da colônia de cada uma das bactérias foi coletada e adicionada em microtubos de 1,5 mL contendo 300 µL de água deionizada estéril. Em seguida, a massa bacteriana foi desmanchada por pipetagem e homogeneizada, com agitador do tipo vórtex por 30 s. Depois, foram adicionados 900 µL de álcool absoluto e novamente a suspensão foi homogeneizada em agitador do tipo vórtex por 30 s. A suspensão etanólica de células foi então centrifugada por 13.000 rpm por 2 min e ao final o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, sendo o restante de sobrenadante no fundo do microtubo coletado com auxílio de pipeta e descartado. Adicionou-se 50 µL de ácido fórmico 70% ao pellet, o qual foi desmanchando por pipetagem e a amostra foi homogeneizada em agitador do tipo vórtex por 5 s. Depois, foi adicionado 50 µL de acetonitrila, e novamente a amostra foi homogeneizada em agitador tipo vórtex por 5 s e centrifugada a 13.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos de 1,5 mL estéril e armazenado a -20 °C no freezer. Minutos antes da análise, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas em agitador tipo vórtex por 5 s. Posteriormente, 1,0 µL de cada amostra em triplicata foram adicionadas em célula de placa metálica com capacidade para 96 depósitos. Após isso, as amostras na placa foram deixadas para secarem em bancada. Em seguida adicionou-se 1,0 µL de matriz a células contendo as amostras secas 'mancha'. Para a análise das amostras a placa foi acoplada no equipamento de espectrometria de massa SM MALDI TOF Microflex LT® (Bruker Daltonics/BD) do departamento de alimentos da Universidade Federal de Lavras-UFLA, MG. A partir dos espectros de proteína formados foi montando um dendograma utilizando o programa BioTyper PCA *Clustering Standard Method*, com os seguintes parâmetros Método

hierárquico com medida de distância euclidiana, algoritmo de ligação médio, e agrupamento de custer máximo igual a 4.

2.3 Extração de DNA

Para a extração do DNA de raiz, nódulos e bactérias (TABELA 1) foi utilizado o tampão CTAB conforme adaptação feita por Silva (2017).

Para a extração do DNA das raízes, elas foram desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 1% (v:v) por 5 min e enxaguadas por cinco vezes em água destilada estéril. Em seguida foram maceradas com pistilo e nitrogênio líquido (-172 °C) em gral e adicionou-se 100 mg do tecido macerado em microtubos de 2,0 mL estéreis. Os nódulos também foram previamente desinfestados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 0,5% (v:v) por 5 min, enxaguados por cinco vezes com água destilada estéril e individualmente macerados em microtubos de 1,5 mL estéreis.

Para a extração do DNA bacteriano, as bactérias foram crescidas em meio 79 líquido (FRED; WAKSMAN, 1928) sob agitação de 240 rpm a 29 °C por 48 h. Adicionou-se o volume de 1,0 mL da suspensão bacteriana em microtubo de 2,0 mL estéril, centrifugou-se a 10.000xg por 10 min, descartou-se o sobrenadante e o pellet formado foi utilizado para extração de DNA. Aos preparados foram adicionados 850 µL do tampão CTAB pré-aquecido a 65 °C, seguido de homogeneização em agitador tipo vórtex por 5 s. Depois as amostras foram incubadas em banho-maria e intermitentemente homogeneizadas por três vezes em agitador tipo vórtex dentro do período de 15 min. Posteriormente, as amostras foram deixadas em bancada até atingirem temperatura ambiente e adicionou-se 3,0 µL de RNase [20 mg mL⁻¹] e 3,0 µL de Proteinase K [1 mg mL⁻¹] seguido por incubação a 37 °C por 30 min. Após esse período, adicionou-se 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 (CIA), a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 10.000xg por 10 min. O sobrenadante foi coletado e novamente adicionou-se 500 µL de CIA, e a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 10.000xg por 10 min. Depois coletou-se o sobrenadante, adicionando 0,7 volume de isopropanol, correspondente ao volume recuperado. Após isso, as amostras foram invertidas suavemente por 10 vezes, acomodadas no gelo por 15 min e depois centrifugadas a 10.000xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao pellet formado foram adicionados 500 µL de etanol 70% (v:v) com posterior centrifugação a 10.000 xg por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi posto para secar por 1 h em capela de exaustão com fluxo de ar ligado. O pellet foi reidratado com 100 µL de TE [10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0]. O

rendimento ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) e pureza A_{260}/A_{280}^{-1} nm das amostras de DNA isoladas foram avaliados por absorvância utilizando o equipamento NanoDrop[®]. A integridade e a presença de possíveis contaminantes nas amostras de DNA foram avaliadas em gel de agarose 1% (m:v) submetido a eletroforese ($70 \text{ V } 90 \text{ min}^{-1}$) em tampão TAE 1x, corado com solução de brometo de etídeo 0,01% (m:v), descorado em água destilada por 30 min e registrado utilizando o programa KODAK[®].

2.4 Condições de PCR

Todos os *primers* desenhados foram inicialmente testados por PCR utilizando o mix com 0,3 μL de cada *primer* 10 nM, 3,0 μL de buffer 5x, 1,0 μL de MgCl_2 25 mM, 0,3 μL de dNTP 10 mM, 0,1 μL de Taq Polimerase 5 U, 1,0 μL da amostra de DNA alvo $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e água ultrapura para o volume final de 15,0 μL . As condições da reação inicialmente utilizadas foram de $95 \text{ }^\circ\text{C } 5 \text{ min}^{-1}$ ($95 \text{ }^\circ\text{C } 15 \text{ s}^{-1}$; $60\text{-}63 \text{ }^\circ\text{C } 45 \text{ s}^{-1}$; $72 \text{ }^\circ\text{C } 30 \text{ s}^{-1}$) x 30-40 ciclos e $72 \text{ }^\circ\text{C } 5 \text{ min}^{-1}$. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 2% (m:v) e submetidos a eletroforese ($90 \text{ V } 90 \text{ min}^{-1}$) em tampão TAE 1x. O gel foi corado com solução de brometo de etídeo 0,01% (m:v), descorado em água destilada, visualizado por exposição a luz ultra violeta e fotodocumentado. Os registros foram utilizados para verificar a especificidade dos *primers* para com a estirpe alvo e avaliar se o produto amplificado em pares de bases (pb) estava em conformidade com a altura esperada, tendo como referência o marcador molecular (Ladder 100 pb, Ludwig Biotec, BRA).

2.5 Especificidade dos *primers*

A seleção dos *primers* específicos para as bactérias alvo desse estudo foi realizada de maneira exclusiva, utilizando amostras do DNA de bactérias intimamente relacionadas às estirpes alvo, conforme recomendação da AOAC (2012). Para tal, foram empregadas amostras do DNA de 23 bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, com distanciamento filogenético próximo às bactérias alvo, conforme Ribeiro (2017). Além dessas, utilizou-se o DNA de mais 22 espécies de bactérias nodulantes, porém, com distanciamento filogenético maior das bactérias alvo (TABELA 1). Os produtos de PCR dos *primers* que se mostraram estirpe-específicos foram submetidos ao sequenciamento pela metodologia Sanger no sequenciador ABI3500 (*Applied Biosystems*) do Laboratório de Genoma da Embrapa

Agrobiologia, Seropédica, RJ, BRA. Com isso, foi possível confirmar se os *primers* estavam realmente se anelando ao gene alvo, conforme determinado inicialmente *in silico*. As sequências foram analisadas com o programa ChromasPro e alinhadas com o software ClustalW no Bioedit.

Os *primers* específicos para as estirpes CIAT 899 e PRF 81 foram testados em mais quatro etapas com amostras de DNA de diferentes matrizes classificadas nos seguintes grupos:

DNA das estirpes alvo de três bancos diferentes do Brasil, a saber: Embrapa Agrobiologia, RJ (Ea) Embrapa Soja, PR (Es) e Fepagro, RS (F):

- i. DNA isolado dos nódulos de feijoeiro, que foi inoculado individualmente com cada uma das estirpes alvo e cultivado em casa de vegetação em garrafa tipo long neck contendo 300 mL da solução nutritiva Norris estéril [1 mL K_2HPO_4 10%, 1 mL KCl 10%, 1 mL $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10%, 0,344 g $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, 0,5 mL solução de micronutrientes e 0,5 mL de solução de ferro] 1000 mL^{-1} (NORRIS; DATE, 1976);
- ii. suspensão bacteriana derivada de colônia das bactérias alvo crescidas em placa de Petri contendo meio 79 ágar. Para isso, coletou-se a colônia bacteriana com uma alça de platina de 10 μL cheia, diluindo-a em 90 μL de água ultrapura;
- iii. extrato de nódulo preparado utilizando nódulo de aproximadamente 2 mm, desinfestado superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 0,5 % (v:v) por 5 min enxaguados com água destilada por cinco vezes e macerados em microtubo de 0,5 mL contendo 90 μL de água ultrapura.

Foram empregadas nos ensaios de PCR 10 ng de DNA de cada um dos preparados referentes aos grupos 1 e 2. Para as amostras dos grupos 3 e 4, utilizou-se 1 e 2 μL , respectivamente, para o volume final de 15 μL nos ensaios de PCR.

Tabela 1 - Bactérias utilizadas nesse estudo para avaliar a especificidade dos *primers* desenhados para as estirpes CIAT 899 (= SEMIA 4077 = BR 322) e PRF 81 (= SEMIA 4080 = BR520). (continua)

| Espécie | Id estirpe | Origem | Hospedeiro |
|--|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| <i>Rhizobium tropici</i> | BR 322=CIAT 899=SEMIA 4077=ATCC 49672 | Carmen de Viboral, ANT, COL | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium tropici</i> | BR 534=SEMIA 4088 | Planaltina, GO, BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium freirei</i> | BR 520=PRF 81=SEMIA 4080 | Irati, PR, BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium etli</i> <i>bv.</i> <i>phaseoli</i> | BR 212 | IRQ | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium loessense</i> | BR 225 | Seropédica, RJ, BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium jaguaris</i> | BR 219 | Seropédica, RJ, BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium mesoamericanum</i> | BR 364=UW 1-3F | Uninformed | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium miluonense</i> | BR 315=IAPAR 69=UMR 1173 | Uninformed | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium paranaense</i> | BR 318 | BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium phaseoli</i> | BR 222=SEMIA 442 | Seropédica, RJ, BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 295 | Piracicaba, SP, BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 367 | Aruanã, GO, BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium. leucaenae</i> | BR 326 | Goiás, BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 920 | Canarana, BA, BRA | <i>Leucaena L. leucocephala</i> |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 939 | Linhares, ES, BRA | <i>Leucaena L. leucocephala</i> |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 230=CIAT 144 | ANT, COL | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 249=SEMIA 495=CIAT 45 | Alegre, ES, BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 312=IAPAR 89 | BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 314=IAPAR 70=UMR 1226 | Uninformed | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 317=SEMIA 4047 | Uninformed | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 327=USDA 2680 | Kimberly, ID, USA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 362 | Uninformed | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Agrobacterium</i> sp. | BR 272 | Planaltina, DF, BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Agrobacterium</i> sp. | BR 298 | Uninformed | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | BR 313=IAPAR 94 | BRA | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| <i>Azorhizobium doebereineriae</i> | BR 5401=DSM 18977 | Seropédica, RJ, BRA | <i>Sesbania virgata</i> |
| <i>Azorhizobium caulinodans</i> | BR 5410=ATCC 43989 = DSM 5975 | SEN | <i>Sesbania rostrata</i> |

Tabela 1 – Bactérias utilizadas nesse estudo para avaliar a especificidade dos *primers* desenhados para as estirpes CIAT 899 (= SEMIA 4077 = BR 322) e PRF 81 (= SEMIA 4080 = BR520). (conclusão)

| Espécie | Id estirpe | Origem | Hospedeiro |
|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------|------------------------------|
| <i>Blastobacter denitrificans</i> | BR 10327 = ATCC 43295 = DSM 1113 | DEU | <i>Uninformed</i> |
| <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> | BR 116=NBRC 14792=USDA 110 | Florida, USA | <i>Glycine max</i> |
| <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> | BR 85=SEMIA 5080 | Planaltina, DF, BRA | <i>Glycine max</i> |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | BR 29=SEMIA 5019 | Piraí, RJ, BRA | <i>Glycine max</i> |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | BR 111=ATCC 10324 = DSM 30131 | JPN | <i>Glycine max</i> |
| <i>Bradyrhizobium macuxiense</i> | BR 10303=HAMBI 3602 | Bonfim, RR, BRA | <i>Centrolobium paraense</i> |
| <i>Bradyrhizobium sp.</i> | BR 6204 | Seropédica, RJ, BRA | <i>Albizia saman</i> |
| <i>Burkholderia sabiae</i> | BR 3407 | Uninformed | Uninformed |
| <i>Burkholderia phymatum</i> | BR 3486=DSM 17167 = LMG 21445 | GUY | <i>Machaerium lunatum</i> |
| <i>Cupriavidus taiwanensis</i> | BR 3471=DSM 17343 = LMG 19424 | TAI, CHN | <i>Mimosa pudica</i> |
| <i>Devosia neptuniae</i> | BR 10334=LMG 21357 = CIP 108397 | IND | <i>Neptunia natans</i> |
| <i>Ensifer fredii</i> | BR 112=LMG 6217 = USDA 205 | Honan, CHN | <i>Glycine max</i> |
| <i>Ensifer meliloti</i> | BR 4007=SEMIA 6162 | Fortaleza, CE, BRA | <i>Prosopis juliflora</i> |
| <i>Mesorhizobium ciceri</i> | BR 521=ATCC 51585 = DSM 11540 | ESP | <i>Cicer arietinum</i> |
| <i>Mesorhizobium loti</i> | BR 7801=ATCC 700743 = DSM 2626 | NZL | <i>Lotus corniculatus</i> |
| <i>Microvirga vignae</i> | BR 3299=HAMBI 3457 | Laranjeiras, SE, BRA | <i>Vigna unguiculata</i> |
| <i>Phyllobacterium trifolii</i> | BR 7608=CECT 7015 = DSM 17315 | Salamanca, ESP | <i>Trifolium pratense</i> |

BR: Centro Nacional de Pesquisa Embrapa Agrobiologia CNPAB; **CIAT:** Centro Internacional de Agricultura Tropical; **IAPAR** ou **PR F:** Instituto Agrônômico do Paraná; **ATCC:** American Type Culture Collection; **DSM:** Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen Und Zellkulturen; **NBRC:** National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center; **USDA:** United States Department Of Agriculture; **SEMIA:** Coleção De Culturas De Rhizobium Da Fepagro; **HAMBI:** HAMBI Culture Collection; **LMG:** Laboratorium Voor Microbiology Culture Collection; **CIP:** Instituto Pasteur; **CECT:** Colección Española de Cultivos Tipo; **UW:** University Of Wisconsin; **UMR:** University of Minnesota Rochester. Link acesso: <http://alelomicro.cenargen.embrapa.br/InterMicro/Passaporte/bancoInstituicao.xjs>

Fonte: Do autor (2022).

2.6 Sensibilidade dos *primers*

A sensibilidade dos *primers* foi avaliada em triplicatas técnicas utilizando amostras do DNA das estirpes CIAT 899 e PRF 81, em concentrações que variaram de 10 fg a 10 ng de DNA nos ensaios de PCR. Alíquotas de 10 μL dos produtos da PCR foram aplicadas em gel de agarose 2% (m:v). O gel foi submetido à eletroforese (90 V 90 min^{-1}), corado com solução de brometo de etídeo 0,01% (m:v), descorado com água destilada e submetido à exposição em luz UV e registrado para posterior análise.

2.7 Aplicabilidade dos *primers* para avaliação de ocupação nodular

Um experimento em vasos com solo não estéril foi montado para avaliar a utilidade dos *primers* na determinação da ocupação nodular. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (4 x 4), com três repetições por tratamento. Os tratamentos corresponderam às combinações entre quatro tipos de solo e quatro tipos de inoculação, a saber: inoculação com a estirpe CIAT 899, inoculação com a estirpe PRF 81; inoculação com as estirpes CIAT 899 e PRF 81 (Mix) e controle absoluto, sem inoculação. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com feijão-comum tipo Carioca variedade Pérola, semeado em vasos de volume igual a 3,7 litros, preenchidos separadamente, com 4 tipos de solos diferentes (TABELA 2). Além da análise química, foi realizada para cada um dos solos utilizados, a contagem das populações nativas de rizóbios por meio da técnica NMP (Número Mais Provável), conforme Andrade e Hamakawa (1994) (TABELA 2). Foram semeadas cinco sementes por vaso, deixando apenas as três plântulas mais vigorosas, cinco dias após a germinação. Para a inoculação, as sementes foram previamente enxaguadas em água corrente por cinco vezes, acomodadas em água destilada por 15 min e, em seguida, imersas por 30 min em inoculante líquido (10^9 UFC mL^{-1}). As plantas foram coletadas após 25 dias para a avaliação da ocupação nodular, do número de nódulos e da massa seca de parte aérea. Para a análise de ocupação nodular utilizou-se 30 nódulos por tratamento, sendo destacados 10 nódulos da coroa radicular por planta, dentre as três avaliadas. Os nódulos foram superficialmente desinfestados com solução de hipoclorito de sódio 0,5 % (v:v) enxaguados com água filtrada estéril, secos superficialmente com papel toalha e estocados em freezer -4 °C para posterior análise. Para as análises por PCR, cada nódulo foi esmagado com auxílio de pinça estéril dentro de microtubo de 0,5 mL contendo 90 μL de água deionizada, sendo o bagaço descartado (FIGURA 1). Nos ensaios de PCR,

utilizou-se 2,0 µL do extrato do nódulo. Além disso, especificamente para esse tipo de análise, visando otimizar o ensaio o mix para PCR foi preparado com 0,13% de Tween[®] 20 (v:v). Para detecção na PCR da estirpe CIAT 899 utilizou-se os *primers* Ciat899G139, Ciat899G1624II e Ciat899G3718 (APÊNDICE A), enquanto que, para a estirpe PRF 81, foram utilizados os *primers* Prf81G19, Prf81G530 e Prf81G546I (APÊNDICE B). A ocupação nodular das plantas avaliadas foi confirmada com base nos resultados de ampliações positivas na PCR, observadas para os três *primers*, para cada uma das bactérias alvo.

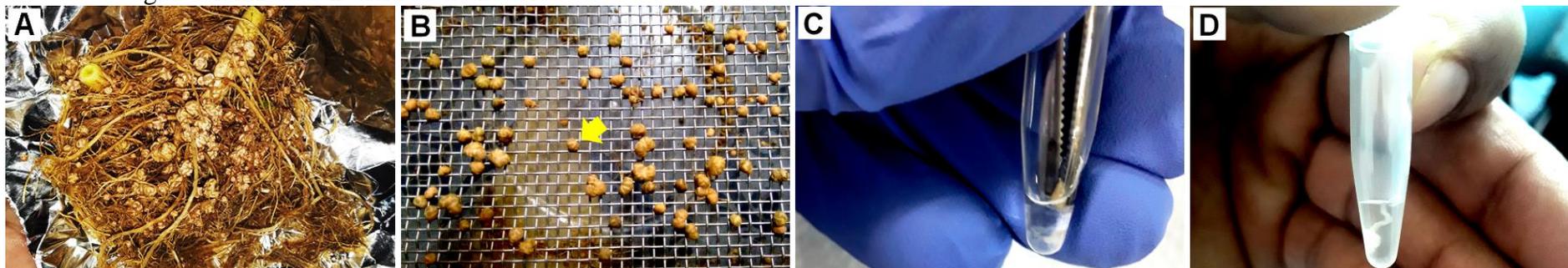
Tabela 2 – Resultado da análise química e microbiológica dos solos utilizados no experimento desse trabalho.

| Solo | pH und | Al cmol _c dm ⁻¹ | H+Al | Ca+Mg | K mg L ⁻¹ | P | C % | N | SB ¹ | CEC ² | BS ³ % | Células rizóbios nativos (UFC g ⁻¹ Solo) ⁴ |
|------|--------|--|------|-------|-------------------------------------|--------|--------------------|------|-----------------|------------------|----------------------|---|
| 1 | 5,65 | 0,00 | 4,26 | 5,62 | 278,13 | 136,18 | 1,43 | 0,14 | 6,33 | 10,59 | 59,78 | 9,04 x 10 ⁵ |
| 2 | 5,48 | 0,05 | 4,46 | 3,42 | 34,61 | 3,5 | 0,97 | 0,11 | 3,51 | 7,97 | 44,03 | 6,01 x 10 ² |
| 3 | 5,60 | 0,00 | 2,31 | 1,48 | 73,78 | 19,36 | 0,26 | 0,04 | 1,67 | 3,98 | 41,94 | 1,55 x 10 ⁵ |
| 4 | 5,60 | 0,00 | 3,60 | 5,61 | 107,49 | 23,26 | 0,86 | 0,11 | 5,89 | 9,49 | 62,04 | 1,51 x 10 ³ |

¹ Soma de Bases; ² Capacidade de troca de cátions; ³ Saturação por Bases = ((K+Ca+Mg)/Tcec)×100, onde Tcec = K+Ca+Mg+ acidez total em pH 7,0 (H+Al); ⁴ Estimado pelo método Número Mais Provável (MPN) (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994) usando como planta isca feijão comum (*n* = 3).

Fonte: Do autor (2022).

Figura 1 – Procedimento utilizado no presente estudo para obtenção do extrato de nódulo destacados do feijoeiro: **A**- Raízes contendo vários nódulos; **B** - seleção de nódulos maiores ou iguais a 2 mm; **C**- esmagamento de nódulo com ~2 mm em microtubo contendo 90 µL de água deionizada e **D**- extrato de nódulo.



Na Figura 1B a seta em amarelo indica o tamanho ideal de nódulo (~2 mm) para elaboração do extrato.

Fonte: Do autor (2022).

2.8 Estatística

A normalidade e homogeneidade de variâncias foram avaliadas com os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Os dados de massa seca da parte aérea (MSPA) atenderam aos pressupostos da análise de variância. Quanto aos dados para número de nódulos (NN) tiveram que ser transformados com a transformação de Box-Cox. O parâmetro de transformação utilizado foi igual a 0,215. A análise de variância e o teste de médias Duncan foram utilizados em nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com os pacotes car (FOX; WEISBERG) e easyanova (ARNHOLD, 2013) e no software R (R CORE TEAM, 2021).

3 RESULTADOS

3.1 Condição de amplificação dos *primers*

Todos os *primers* desenhados para as estirpes CIAT 899 e PRF 81 foram testados inicialmente nos ensaios de PCR com temperatura de anelamento igual a 60 °C. No entanto, observou-se amplificação inespecífica nas condições inicialmente testadas. Portanto, para atingir a especificidade para as estirpes CIAT 899 e PRF 81 foram adotadas estratégias como o aumento da temperatura de anelamento, concentração de MgCl₂ e redução no número de ciclos da PCR conforme sugerido por Green e Sambrook (2019), chegando às condições ideais para especificidade, conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentrações de reagentes e condições ideais na PCR dos *primers* desenhados para as estirpes bacterianas CIAT 899 e PRF 81.

| Bactéria alvo | Reagentes | | | Condições de PCR |
|--|-----------------------|--------------|--|--|
| | Nome do <i>primer</i> | Primer nM | MgCl ₂ mM | Desnaturação (Desnaturação_Anelamento_Extensão) x N° de ciclos |
| <i>R. tropici</i> CIAT 899 ou CPAC H12 | Ciat899G139 F/R | 150 | 1,7 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 62°C por 30s; 72°C por 30s) x 32; 72°C por 5min |
| | Ciat899G144 F/R | 150 | 1,4 | |
| | Ciat899G166 F/R | 120 | 1,7 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 62°C por 30s; 72°C por 30s) x 30; 72°C por 5min |
| | Ciat899G882 F/R | 133 | 1,7 | |
| | Ciat899G1624 F/R | 140 | 1,7 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 63°C por 30s; 72°C por 30s) x 35; 72°C por 5min |
| | Ciat899G1624I F/R | 150 | 1,7 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 63°C por 30s; 72°C por 30s) x 35; 72°C por 5min |
| | Ciat899G1624II F/R | 168 | 1,7 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 62°C por 30s; 72°C por 30s) x 35; 72°C por 5min |
| | Ciat899G1624III F/R | 140 | 1,7 | |
| | Ciat899G3723 F/R | 150 | 1,7 | |
| | Ciat899G3718 F/R | 150 | 1,7 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 62°C por 30s; 72°C por 30s) x 35; 72°C por 5min |
| Ciat899G3722 F/R | 150 | 1,7 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 62°C por 30s; 72°C por 30s) x 35; 72°C por 5min | |
| <i>R. freirei</i> (PRF 81) | Prf81G19 F/R | 167 | 1,2 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 62°C por 30s; 72°C por 30s) x 32; 72°C por 5min |
| | Prf81G222II F/R | 133 | 1,0 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 62°C por 30s; 72°C por 30s) x 35; 72°C por 5min |
| | Prf81G529 F/R | 133 | 1,7 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 62°C por 30s; 72°C por 30s) x 35; 72°C por 5min |
| | Prf81G530II F/R | 167 | 1,7 | |
| | Prf81G546 F/R | 150 | 1,7 | |
| | Prf81G546I F/R | 133 | 2,5 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 61°C por 30s; 72°C por 30s) x 40; 72°C por 5min |
| | Prf81G561 F/R | 167 | 2,1 | |
| | Prf81G530 F/R | 167 | 1,7 | |
| | Prf81G534 F/R | 175 | 2,0 | 95°C por 5min (95°C por 15s; 63°C por 30s; 72°C por 30s) x 35; 72°C por 5min |
| Prf81G534I F/R | 133 | 1,7 | | |

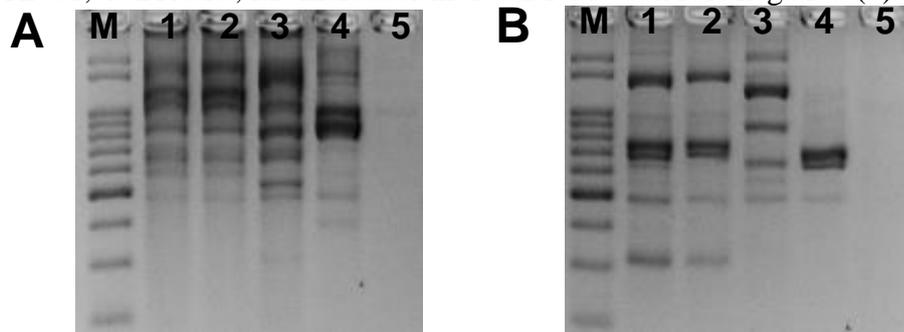
Informações sobre o gene, sequência, tamanho, temperatura de *melting* e anelamento e amplicom dos *primers* dessa tabela podem ser consultadas nos APÊNDICES A e B para as estirpes CIAT 899 e PRF 81, respectivamente.

Fonte: Do autor (2022).

3.2 Especificidade e sensibilidade dos *primers*

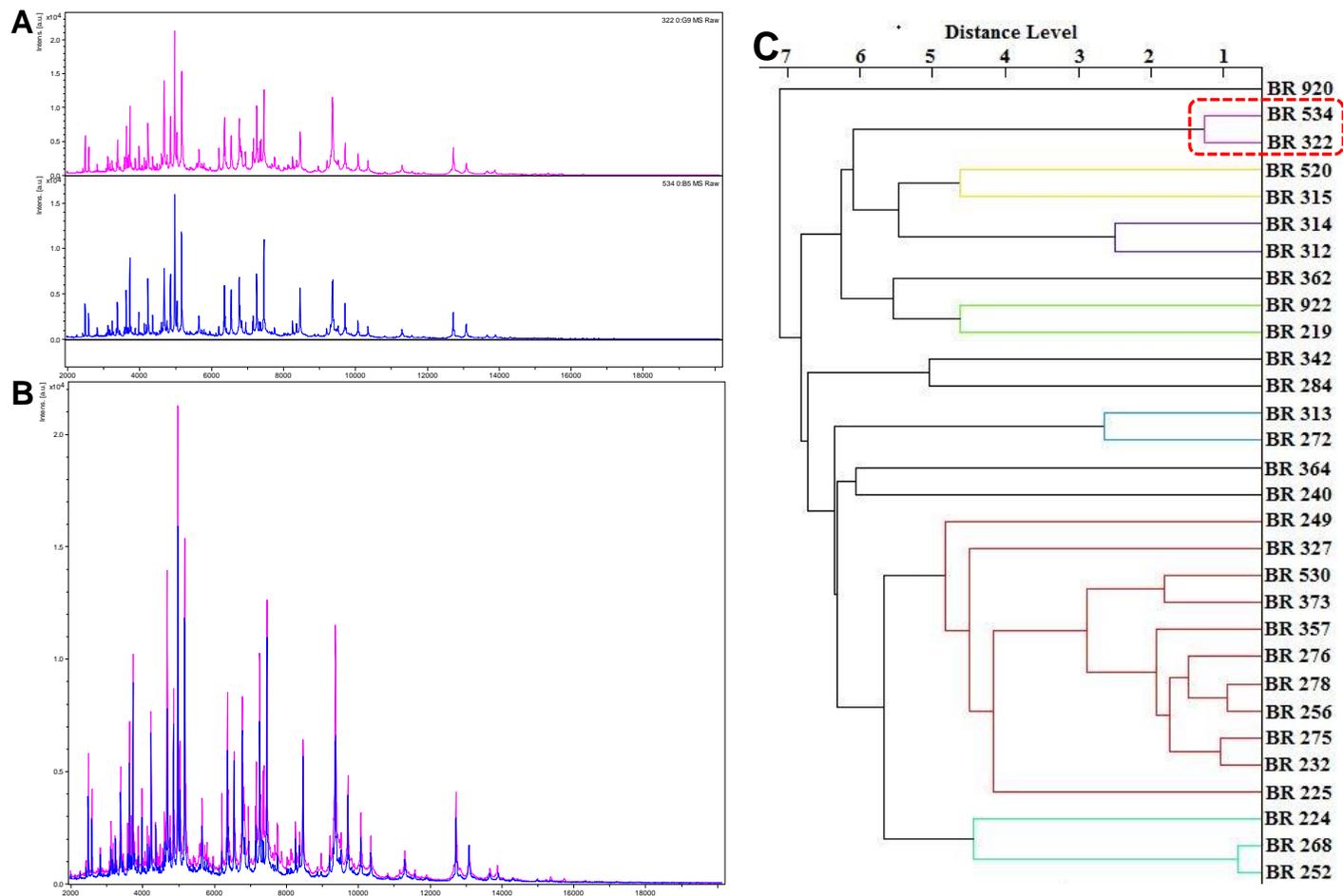
No total, 34 *primers* foram desenhados para *R. tropici* CIAT 899 (APÊNDICE A). Entretanto, no teste de especificidade utilizando temperatura de anelamento a 62 °C na PCR, apenas 11 deles se mostraram mais específicos, porém, amplificando também o DNA da estirpe CPAC H12 da espécie *R. tropici*, conforme mostra o gabarito da Tabela 4, transcrito das figuras do Apêndice C. No presente estudo, observou-se que os genomas das estirpes CIAT 899 e CPAC H12 apresentaram pelo critério ANI 99,99% de similaridade. Além disso, o perfil de bandas dos *primers* randômicos BOX A1R e PRO1 (FIGURA 2AB) e os espectros de proteína formados no SM MALDI TOF são iguais para as estirpes CIAT 899 e CPAC H12 (FIGURA 3A), sobrepondo-se perfeitamente (FIGURA 3B). No agrupamento realizado com base no espectro proteico de 30 estirpes do gênero *Rhizobium* sp., as bactérias CIAT 899 e CPAC H12 formaram um grupo isolado (FIGURA 3C). Tudo isso indica que, provavelmente, a estirpe CPAC H12 é uma variante da estirpe CIAT 899. Por isso, os *primers* desenhados para a estirpe CIAT 899 também amplificam fragmentos de DNA alvo a partir do DNA genômico da estirpe CPAC H12.

Figura 2 – Perfis de bandas formados na PCR a partir dos *primers* randômicos: **A**- BOX A1R e **B**- PRO1 para as amostras de DNA das estirpes: **1**- CIAT 899, **2**- CPAC H12, **3**- PRF 81, **4**- BR 315; **M**- marcador molecular e **5**- controle negativo (-).



Fonte: Do autor (2022).

Figura 3 – Espectros dos perfis proteicos SM MALDI TOF: **A-** de cada uma das estirpes CIAT 899 (azul) e CPAC H12 (lilás); **B-** Sobreposição dos espectros das estirpes CIAT 899 (azul) e CPAC H12 (lilás) e **C-** Dendograma gerado a partir dos perfis proteicos das estirpes alvo desse trabalho e outras relacionadas.



O retângulo pontilhado em vermelho na Figura 3C destaca o agrupamento das estirpes CPAC H12 (BR 534) e CIAT 899 (BR 322) no dendograma montado com base em 30 perfis proteicos de bactérias do gênero *Rhizobium* sp.

Fonte: Do autor (2022).

Quanto aos *primers* para a estirpe PRF 81, 32 pares foram desenhados (APÊNDICE B) dos quais, na PCR com temperatura de anelamento a 62 °C, apenas sete foram específicos. Outros três *primers* a saber, (F/R) Prf81G530, Prf81G534I e Prf81G546I, além de amplificarem o DNA da PRF 81, amplificam também o da estirpe BR 315 conforme mostra o gabarito da Tabela 5 transcrito nas figuras do Apêndice D. Entretanto, diferentemente das estirpes CIAT 899 e CPAC H12, os perfis de banda dos *primers* randômicos BOX AIR e PRO1 (FIGURA 2AB) e os espectros de massa proteica das estirpes PRF 81 e BR 315 são diferentes.

Os *primers* Ciat899G1614 e Ciat899G1624II para a estirpe CIAT 899 ou CPAC H12 e Prf81G534I para a estirpe PRF 81 mostraram ser mais específicos à temperatura de 63 °C (APÊNDICE E). Cabe ressaltar que outros *primers*, a saber: Ciat899G22, Ciat899G164, Ciat899G1070 e Ciat899G3722I desenhados para a estirpe CIAT 899 (APÊNDICE A) e os Prf81G39, Prf81G62 para a estirpe PRF 81 (APÊNDICE B), não selecionados, amplificaram na PCR conforme as condições iniciais testadas (**Subitem 3.3**) o fragmento de DNA alvo das estirpes para os quais eles foram desenhados, mas também o de outras estirpes próximas do gênero *Rhizobium* sp. o que os tornam passíveis de uso em trabalhos futuros.

Os *primers* selecionados no presente trabalho separam de maneira específica as estirpes bacterianas alvo CIAT 899 ou CPAC H12 da estirpe PRF 81 ou vice-versa. Reforçando sua especificidade, as análises pós-sequenciamento realizadas para os produtos de PCR demonstram que eles amplificaram o gene alvo para o qual foram desenhados. Além de serem específicos, os *primers* detectaram as estirpes alvo até sua origem, nos nódulos, conforme recomendado pela AOAC (2012), tendo em vista que, houve a amplificação na PCR de fragmentos de DNA específicos a partir do extrato de nódulos retirados de plantas inoculadas com as estirpes alvo (APÊNDICE F).

Os ensaios de PCR mostraram que os *primers* selecionados detectaram as bactérias alvo adquiridas de três coleções distintas (Grupo de 1 a 3, APÊNDICE F). Além disso, a partir desses ensaios, observou-se que eles detectam as bactérias alvo a partir de amostras do DNA isolado dos nódulos (Grupo de 4 a 6, APÊNDICE F) bem como de amostras brutas, como por exemplo, suspensão bacteriana (Grupo de 7 a 9, APÊNDICE F) ou do extrato de nódulos (Grupo de 10 a 12, APÊNDICE F). Sendo que utilizando os *primers* na PCR há amplificação de fragmentos do DNA alvo sem haver inibição utilizando-se 2,0 µL do extrato de nódulos (APÊNDICE F).

A partir dos ensaios de PCR independentes para cada par de *primer*, verificou-se nas três repetições técnicas que todos eles amplificam o fragmento de DNA alvo a partir de 0,1 ng de

DNA genômico *in vitro*. Alguns pares de *primers* têm maior sensibilidade, com capacidade de amplificação a partir de até 100 fg de DNA alvo genômico *in vitro* (APÊNDICE G).

Tabela 4 – Especificidade dos *primers* desenhados para a bactéria *Rhizobium tropici* (CIAT 899 = BR322) avaliada por exclusão em análise pós PCR testando diversas bactérias da família Rhizobiaceae. (continua)

| Espécie | Id estirpe | Primers Ciat899G_(F/R) | | | | | | | | | | | |
|---|------------|------------------------|-----|-----|-----|------|-------|--------|---------|------|------|------|---|
| | | 139 | 144 | 166 | 882 | 1624 | 1624I | 1624II | 1624III | 3718 | 3722 | 3723 | |
| <i>Rhizobium tropici</i> | BR 322 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Rhizobium tropici</i> | BR 534 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Rhizobium freirei</i> | BR 520 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>phaseoli</i> | BR 212 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium gallicum</i> | BR 225 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium jaguaris</i> | BR 219 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium mesoamericanum</i> | BR 364 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium miluonense</i> | BR 315 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium paranaense</i> | BR 318 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium phaseoli</i> | BR 222 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 295 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 367 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 326 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 920 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 939 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 230 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 249 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 312 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 314 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 317 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 327 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 362 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Agrobacterium</i> sp. | BR 272 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Agrobacterium</i> sp. | BR 298 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | BR 313 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tabela 4 – Especificidade dos *primers* desenhados para a bactéria *Rhizobium tropici* (CIAT 899 = BR322) avaliada por exclusão em análise pós PCR testando diversas bactérias da família Rhizobiaceae. (conclusão)

| Espécie | Id estirpe | Primers Ciat899G_(F/R) | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|------------|------------------------|-----|-----|-----|------|-------|--------|---------|------|------|------|
| | | 139 | 144 | 166 | 882 | 1624 | 1624I | 1624II | 1624III | 3718 | 3722 | 3723 |
| <i>Azorhizobium doebereineriae</i> | BR 5401 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Azorhizobium caulinodans</i> | BR 5410 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Blastobacter denitrificans</i> | BR 10327 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> | BR 116 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> | BR 85 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | BR 29 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | BR 111 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium macuxiense</i> | BR 10303 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium sp.</i> | BR 6204 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Burkholderia sabiae</i> | BR 3407 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Burkholderia phymatum</i> | BR 3486 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cuprividus taiwanensis</i> | BR 3471 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Devosia neptuniae</i> | BR 10334 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ensifer fredii</i> | BR 112 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ensifer meliloti</i> | BR 4007 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Mesorhizobium ciceri</i> | BR 521 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Mesorhizobium loti</i> | BR 7801 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Microvirga vignae</i> | BR 3299 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Phyllobacterium trifolii</i> | BR 7608 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

+: amplificado na PCR; -: não amplificado na PCR.

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 5 – Especificidade dos *primers* desenhados para a bactéria *Rhizobium freirei* (PRF 81 = BR 520) avaliada por exclusão em análise pós PCR testando diversas bactérias da família Rhizobiaceae. (continua)

| Espécie | Id estirpe | <i>Primers Prf81G_(F/R)</i> | | | | | | | | | |
|---|---------------|-----------------------------|--------|-----|-----|--------|-----|-------|-----|-------|-----|
| | | 19 | 222 II | 529 | 530 | 530 II | 534 | 534 I | 546 | 546 I | 561 |
| <i>Rhizobium freirei</i> | BR 520 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Rhizobium tropici</i> | BR 322 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium tropici</i> | BR 534 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium etli</i> bv. <i>phaseoli</i> | BR 212 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium gallicum</i> | BR 225 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium jaguaris</i> | BR 219 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium mesoamericanum</i> | BR 364 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium miluonense</i> | BR 315 | - | - | - | + | - | - | + | - | + | - |
| <i>Rhizobium paranaense</i> | BR 318 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium phaseoli</i> | BR 222 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 295 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 367 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 326 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 920 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium leucaenae</i> | BR 939 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 230 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 249 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 312 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 314 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 317 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 327 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Rhizobium</i> sp. | BR 362 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Agrobacterium</i> sp. | BR 272 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Agrobacterium</i> sp. | BR 298 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tabela 5 – Especificidade dos *primers* desenhados para a bactéria *Rhizobium freirei* (PRF 81 = BR 520) avaliada por exclusão na análise pós PCR testando diversas bactérias da família Rhizobiaceae. (conclusão)

| Espécie | Id estirpe | <i>Primers Prf81G_(F/R)</i> | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|------------|-----------------------------|--------|-----|-----|--------|-----|-------|-----|-------|-----|
| | | 19 | 222 II | 529 | 530 | 530 II | 534 | 534 I | 546 | 546 I | 561 |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | BR 313 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Azorhizobium doebereineriae</i> | BR 5401 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Azorhizobium caulinodans</i> | BR 5410 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Blastobacter denitrificans</i> | BR 10327 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> | BR 116 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> | BR 85 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | BR 29 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | BR 111 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium macuxiense</i> | BR 10303 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bradyrhizobium sp.</i> | BR 6204 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Burkholderia sabiae</i> | BR 3407 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Burkholderia phymatum</i> | BR 3486 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cuprividus taiwanensis</i> | BR 3471 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Devosia neptuniae</i> | BR 10334 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ensifer fredii</i> | BR 112 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ensifer meliloti</i> | BR 4007 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Mesorhizobium ciceri</i> | BR 521 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Mesorhizobium loti</i> | BR 7801 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Microvirga vignae</i> | BR 3299 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Phyllobacterium trifolii</i> | BR 7608 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

+: amplificado na PCR; -: não amplificado na PCR.

Fonte: Do autor (2022).

3.3 Validação dos *primers* para ocupação nodular

Individualmente, os tratamentos inoculados apresentaram efeitos equiparáveis nos solos 1 e 3 onde se observou plantas noduladas (TABELA 6). No entanto, a inoculação promoveu um aumento do número de nódulos e MSPA significativamente maiores apenas para as plantas cultivadas no solo 1 (TABELA 6). No que diz respeito à comparação entre os solos dentro de cada tratamento, observou-se que as plantas do solo 3 apresentaram um maior número de nódulos independente do tratamento (TABELA 6). As plantas do solo 4 foram as que acumularam a menor MSPA (TABELA 6). No caso do mix das estirpes CIAT 899 e PRF 81, o maior acúmulo de MSPA foi observado para plantas cultivadas no solo 1 (TABELA 6).

Tabela 6 – Número de nódulos (NN) e massa seca da parte aérea (MSPA) do feijoeiro cultivado em quatro solos diferentes em casa de vegetação sob os tratamentos inoculados com as estirpes CIAT 899, PRF 81, Mix e sem inoculação após 25 dias da semeadura.

| Tratamento | solo 1 | | solo 2 | | solo 3 | | solo 4 | |
|-------------------------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
| | NN | MSPA (mg) |
| CIAT 899 | 12 | 372 | 333 | 48 | 302 | 237 | | |
| | ± Ba | ± Aa | nn | ± Aa | ± Aa | ± ABa | nn | ± Ba |
| | 05 | 47 | 68 | 12 | 40 | 21 | | |
| PRF 81 | 10 | 336 | 318 | 40 | 310 | 214 | | |
| | ± Bab | ± Aa | nn | ± Aa | ± Aa | nn | ± Ba | |
| | 03 | 41 | 23 | 08 | 58 | 46 | | |
| Mix (CIAT 899 e PRF 81) | 13 | 376 | 324 | 46 | 290 | 229 | | |
| | ± Ba | ± Aab | nn | ± ABa | ± Aa | ± BCa | nn | ± Ca |
| | 04 | 54 | 69 | 05 | 13 | 19 | | |
| Não inoculado | 08 | 293 | 326 | 40 | 277 | 193 | | |
| | ± Bb | ± Ab | nn | ± Aa | ± Aa | nn | ± Ba | |
| | 03 | 14 | 34 | 07 | 21 | 24 | | |

Os dados são médias de 3 repetições ($n = 3$); nn: não nodulado. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as médias nas colunas e linhas, respectivamente, pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2022).

Embora os *primers* tenham se mostrado altamente específicos para as estirpes alvo, considerando a alta diversidade de rizóbios existente no ambiente, não se pode excluir a possibilidade de eles amplificarem o DNA de uma estirpe não alvo. Desse modo, três *primers* de cada estirpe foram selecionados para a avaliação da ocupação nodular e a presença da estirpe foi considerada como positiva apenas quando se obteve amplificação com os três *primers* (APÊNDICE H). As médias gerais de ocupação nodular para as três plantas dentro de cada tratamento, avaliadas pela trinca de *primers* Ciat899G139, 1624II e 3718 mostraram que as taxas de ocupação nodular das plantas inoculadas apenas com a CIAT 899 foram de 100 e 87% nos solos 1 e 3, respectivamente (TABELA 7). Para as plantas submetidas ao tratamento Mix (CIAT 899 e PRF 81), as taxas da ocupação nodular pela estirpe CIAT 899 foram de 57 e 50% para os solos 1 e 3, respectivamente (TABELA 7). Observou-se uma baixa detecção por parte do par de *primer* Ciat899G1624II no tratamento sem inoculação (APÊNDICE H). No entanto, considerou-se que as detecções observadas não se tratavam da estirpe CIAT 899, uma vez que não houve amplificação com os demais *primers*.

Quanto as avaliações utilizando a trinca de *primers* Prf81G19, 530 e 546I para detecção da estirpe PRF 81, a ocupação nodular no tratamento inoculado com essa estirpe foi de 87 e 90% nos solos 1 e 3, respectivamente (TABELA 7). Para as plantas submetidas ao tratamento Mix (CIAT 899 e PRF 81), as taxas de ocupação nodular pela estirpe PRF 81

foram de 57 e 27 % nos solos 1 e 3, respectivamente (TABELA 7). A estirpe PRF 81 não foi detectada em nenhum dos nódulos das plantas cultivadas nos solos 1 e 3 para o tratamento sem inoculação (TABELA 7).

Embora as plantas não tenham nodulado nos solos 2 e 4, os *primers* permitiram detectar a presença das bactérias CIAT 899 e PRF 81 nas raízes (APÊNDICE I), demonstrando a sobrevivência das bactérias na endosfera e indicando que um fator desconhecido impediu a nodulação das plantas.

Tabela 7 — Taxa de ocupação nodular e detecção radicular em plantas de feijoeiro cultivadas em quatro solos diferentes e analisadas por PCR utilizando primers específicos para as estirpes CIAT.

| Tratamento | solo 1 | solo 2 | solo 3 | solo 4 |
|-------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| | Ocupação nodular por CIAT 899 % | Presença/Ausência CIAT 899 | Ocupação nodular por CIAT 899 % | Presença/Ausência CIAT 899 |
| CIAT 899 | 100 ± 00 | + | 87 ± 06 | + |
| Mix | 57 ± 25 | + | 50 ± 26 | + |
| Não inoculado | 00 ± 00 | nd | 00 ± 00 | nd |
| Tratamento | solo 1 | solo 2 | solo 3 | solo 4 |
| | Ocupação nodular por PRF 81% | Presença/Ausência PRF 81 | Ocupação nodular por PRF 81% | Presença/Ausência PRF 81 |
| PRF 81 | 87 ± 06 | + | 90 ± 10 | + |
| Mix | 57 ± 15 | + | 27 ± 21 | + |
| Não inoculado | 00 ± 00 | nd | 00 ± 00 | nd |

+: detecção da bactéria alvo a partir do DNA isolado das raízes; nd: não detectado; os dados de ocupação nodular são médias de 30 nódulos destacados em proporções iguais de 3 plantas por tratamento.899 e PRF 81.

Fonte: Do autor (2022).

4 DISCUSSÃO

Os ensaios de PCR convencional para validação dos *primers* foram realizados com 45 bactérias pertencentes à família Rhizobiaceae, 14 a mais do que o recomendado pela AOAC (2012). Essa quantidade de bactérias analisadas por meio dos seus DNA genômicos justificou-se devido ao alto número de estirpes documentadas como isolados da planta de feijoeiro (SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020). Nos ensaios de PCR para avaliar a especificidade dos *primers*, o ideal é que não haja amplificação de falsos positivos (KRALIK; RICCHI, 2017). Tendo em vista isto, no total de 11 e 7 pares de *primer* foram considerados específicos para a CIAT 899 e PRF 81, respectivamente. Cabe ressaltar que os 11 pares de *primer* selecionados para a CIAT 899 também proporcionaram a amplificação do DNA de *R. tropici* CPAC H12 (TABELA 4). A proximidade entre as estirpes CIAT 899 e CPAC H12 também já havia sido apontada em outros estudos (BINDE *et al.*, 2009; MOSTASSO *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2007; RAPOSEIRAS *et al.*, 2006). Considerando que as estirpes CIAT 899 e CPAC H12 se tratam da mesma bactéria, é válido afirmar que os 11 pares de *primers* são estirpe-específicos.

Quanto aos dez pares de *primers* selecionados para a estirpe PRF 81, três deles Prf81G530, Prf81G534I e Prf81G546I, amplificaram também fragmentos de DNA específico no genoma da estirpe BR 315 da espécie *R. miluonense*, que infecta as raízes de feijoeiro, porém, formando nódulos ineficazes (GU *et al.*, 2008). Esses *primers* foram desenhados a partir dos genes que também deram origem aos *primers* Prf81G530I, Prf81G534 e Prf81G546, respectivamente, que se mostraram estirpe-específicos para a estirpe PRF 81 da espécie *R. freirei* (TABELA 5). As análises *in silico* mostraram que alguns genes da estirpe PRF 81 formam alinhamento com genes da estirpe BR 315, porém, alguns genes dessa bactéria possuem regiões com um elevado número de sequências desconhecidas (*Scaffolds*). Ou seja, quando os *primers* são desenhados a partir de um mesmo gene, porém em regiões diferentes, como é o caso dos citados anteriormente, pode ocorrer duas situações: de eles serem inespecíficos uma vez que amplifica na PCR a região do gene comum às duas estirpes (PRF 81 e BR 315) como é o caso do Prf81G530, ou específicos, se desenhado numa região do gene exclusiva para a estirpe PRF 81 como é o caso do par de *primer* Prf81G530I (F/R).

A diversificação de matrizes contendo o DNA, bactéria ou o bacteroide alvo também foi adotada por Richardson *et al.* (1995) para validação de *primers* randômicos desenhados para o estudo de ecologia de rizóbios. Como reforçado por esses autores, a possibilidade de análise direta utilizando o extrato de nódulo traz muitas vantagens se comparada às técnicas

tradicionais, como por exemplo, não ser necessário o cultivo, extração e purificação do DNA, utilizado rotineiramente para identificação de rizóbios. No presente estudo, os ensaios de PCR utilizando o extrato de nódulo permitiram maior praticidade para avaliar a ocupação nodular. Além disso, ensaios do tipo possibilitam economizar tempo e reagentes necessários para o isolamento de DNA (MARTIN; LINACRE, 2020) e apresentam vantagens sobre diversas técnicas utilizadas para avaliação da ocupação nodular (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2021). Os autores Wong-Villarreal e Caballero-Mellado (2010) realizaram com sucesso ensaios de PCR a partir do extrato de nódulos de feijoeiro para a detecção rápida das espécies *Burkholderia phymatum*, *B. tuberum*, *B. mimosarum* and *B. nodosa*. Com o mesmo objetivo, Osei *et al.* (2017) utilizaram o extrato de nódulos do feijão caupi (*Vigna unguiculata*) na PCR para detecção da bactéria *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262. Entretanto, no presente estudo observou-se que o extrato de nódulo deve ser preparado numa concentração na qual alguns compostos secundários e/ou debris celulares não inibam a PCR. Tais agentes podem atuar inibindo a enzima Taq Polimerase na PCR e/ou formar ligações com o Mg^{2+} (SIDSTEDT *et al.*, 2020). Porém, a presença de um otimizador na PCR pode melhorar a atividade da enzima Taq Polimerase (KUSLICH *et al.*, 2019). Portanto, neste estudo, a adição de Tween[®] 20, um detergente comumente utilizado para otimizar os ensaios de PCR direto (HILL; STEWART, 1992) foi determinante para amplificação do fragmento de DNA alvo das bactérias presentes no extrato de nódulos.

O limite mínimo de detecção da maioria das técnicas utilizadas para o monitoramento de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV) está na ordem de 10^3 por g ou mL da matriz analisada (RILLING *et al.*, 2019). Alguns dos *primers* desenhados nesse trabalho mostraram sensibilidade para amplificar na PCR amostra com massa de DNA correspondente à ordem de até 10^1 e 10^2 células bacterianas das estirpes CIAT 899 e PRF 81, respectivamente (APÊNDICE G). A técnica de PCR convencional já vem sendo aplicada para avaliação da ocupação nodular em plantas leguminosas, por meio de diferentes estratégias de análise. Uma das estratégias requer primeiro o isolamento dos rizóbios a partir dos nódulos, cultivando-os e extraíndo o DNA para a PCR e posterior análise em gel de agarose (NAROŽNA *et al.*, 2015) ou por sequenciamento de determinado gene conservado amplificado na PCR (ZHANG *et al.*, 2014; JI *et al.*, 2017). Todavia, se a finalidade do estudo envolver um grande número de amostras, as estratégias utilizadas por Zhang *et al.* (2014) e Ji *et al.* (2017) pode tornar o trabalho inviável. Entretanto, a avaliação da ocupação nodular utilizando a PCR diretamente, pode ter maior praticidade se o marcador molecular for específico para determinado gene encontrado no genoma da espécie alvo (OSEI *et al.*, 2017; WONG-VILLARREAL;

CABALLERO-MELLADO, 2010). No presente trabalho utilizou-se essa estratégia para a análise de ocupação nodular a partir dos *primers* em destaque nos Apêndices A e B para as estirpes CIAT 899 e PRF 81, respectivamente. Além disso, para tornar a avaliação mais robusta utilizou-se três pares de *primer* para cada estirpe alvo, considerando como positivo a amostra com amplificação bem-sucedida para os três *primers*. Isso tem suas desvantagens, pois uma ausência de amplificação pode ser consequência de problemas na PCR como, por exemplo, a presença de inibidores (SCHRADER *et al.*, 2012). Além disso, várias reações precisam ser feitas para a mesma amostra. Contudo, esse critério mais rigoroso garante maior confiabilidade à análise ao reduzir a chance de falsos positivos. Como o solo é um ambiente de alta biodiversidade, existe alguma probabilidade de a sequência alvo ser encontrada em outras estirpes. Isso é importante, principalmente para ensaios experimentais que utilizam solo não estéril como, por exemplo, experimentos conduzidos em campo, onde a população natural de rizóbios pode chegar à ordem de 10^7 UFC g^{-1} de solo (BROCKWELL *et al.*, 1995).

Quanto ao experimento de inoculação em solo montado para avaliar a aplicabilidade dos *primers* para estimar a ocupação nodular, os resultados demonstram que ambas as estirpes foram capazes de infectar as raízes e formar nódulos no feijoeiro. Porém, esse efeito foi dependente do tipo de solo, que influenciou o desempenho da nodulação e o crescimento das plantas de forma significativa. As plantas cultivadas em dois dos quatro solos não nodularam, demonstrando que um fator não determinado pode estar envolvido. Os *primers* utilizados neste trabalho, para avaliar a taxa de ocupação nodular dos feijoeiros cultivados, permitiram a detecção das bactérias alvo na maior parte dos nódulos coletados de plantas submetidas a tratamentos inoculados, sobretudo naqueles que receberam individualmente as estirpes CIAT 899 e PRF 81, independente do tipo de solo (TABELA 7). Quanto a ocupação nodular das plantas submetidas ao tratamento Mix (CIAT 899 e PRF 81), sugere-se que houve coinfeção de um mesmo nódulo por parte das estirpes testadas. Tendo em vista que individualmente, a maioria dos extratos de nódulos oriundos de plantas submetidas ao tratamento Mix apresentou mais de 50% de amplificação na PCR quando utilizados *primers* específicos para cada uma das bactérias alvo (TABELA 7). Isso é provável, haja vista que Mendoza-Suárez *et al.* (2020), em estudo sobre a ocupação nodular das raízes de ervilhas, mostraram que de um total 769 nódulos, em aproximadamente 20% foi observado a coinfeção mista, em alguns casos, por até seis estirpes diferentes de *R. leguminosarum*.

As bactérias alvo deste estudo foram também detectadas nas raízes do feijoeiro que não nodularam, apesar de terem sido inoculadas (APÊNDICE I). Além disso, houve diferença significativa em termos do número de nódulos (NN) e massa seca de parte aérea (MSPA)

apenas para plantas submetidas a tratamentos inoculados e avaliadas no solo 1 (TABELA 6). Esses resultados mostram um forte efeito do tipo de solo sobre o resultado da inoculação. Como é mostrado no trabalho de Irisarri *et al.* (2019) a porcentagem de ocupação nodular por uma mesma estirpe pode variar conforme o tipo de solo. Abou-Shanab *et al.* (2019) também observaram que a ocupação nodular pela estirpe CIAT 899 variou de 20 a 80%, conforme a cultivar de feijoeiro, o solo e época de condução dos experimentos em campo. Além disso, a fixação do nitrogênio atmosférico (N₂) está atrelada a diversos efeitos ambientais, tais como temperatura ambiente, fertilidade do solo, disponibilidade de água, dentre outros, os quais podem influenciar na formação e no número de nódulos (HARTWIG, 1998). Cabe ressaltar que nenhum dos solos foi adubado, mas que as plantas dependeram diretamente de sua fertilidade original. De acordo com os resultados da análise de solo (TABELA 2), o solo 2 possuía menor teor de potássio (K) e fósforo (P), o que segundo Hartwing (1998) pode ser limitante para formação de nódulos. Porém, o solo 4, no qual as plantas também não nodularam, apresentou o segundo maior teor de K e P (TABELA 2). Portanto, a hipótese de que a falta de K e P poderia ser um fator limitante para a nodulação das plantas cultivadas no solo 2 e 4, torna-se contestável. O teor de cálcio (Ca), outro macronutriente importante para o processo de nodulação em leguminosas (VAZ MARTINS; LIVINA, 2019), assim como o pH do solo (TORABIAN *et al.*, 2019) mostraram-se favoráveis à nodulação do feijoeiro para os quatro tipos de solo. Inclusive, dentre os quatro solos estudados, o solo 3 onde as plantas de feijoeiro apresentaram maior número de nódulos, possuía menor teor de Ca e nitrogênio (N) na sua composição química (TABELA 2). É sabido também que a alta disponibilidade de N no solo pode ser um fator limitante para a formação de nódulos em leguminosas (CHAULAGAIN; FRUGOLI, 2021). Segundo os autores Torabian *et al.* (2019) o manejo que é dado ao solo pode resultar em inúmeros efeitos positivos ou negativos para proliferação e/ou nodulação por rizóbios. Entretanto, o fato de não ter havido nodulação das plantas de feijoeiro cultivadas nos solos 2 e 4 pode estar relacionado também ao fator biológico. Haja vista que tais solos foram os que apresentaram menor número de rizóbios nativos pela técnica NMP (TABELA 2).

Como foi demonstrado, os *primers* selecionados no presente estudo são ferramentas úteis para a detecção das bactérias *Rhizobium tropici* estirpes CIAT 899 ou CPAC H12 e *R. freirei* estirpe PRF 81 com maior precisão e mais rapidez, utilizando a técnica de PCR convencional. Além disso, o tamanho do amplicon que cada um deles flanqueia, em destaque nos Apêndices A e B, e as condições de reação da PCR com que eles operam (TABELA 4) possibilitam sua utilização em estudos envolvendo PCR quantitativa (qPCR). Estudos

envolvendo essa técnica têm sido comumente empregados para a quantificação de diversas bactérias que nodulam plantas leguminosas (FURSETH *et al.*, 2010; GOULART *et al.*, 2015; MACDONALD *et al.*, 2011; YUDISTIRA *et al.*, 2021) bem como outras bactérias promotoras do crescimento vegetal (SOARES *et al.*, 2021).

5 CONCLUSÕES

Os *primers* desenhados no presente estudo são específicos para detecção das bactérias *Rhizobium tropici* estirpes CIAT 899 ou CPAC H12, separadamente, e *R. freirei* estirpe PRF 81 utilizando a técnica de PCR convencional.

Os *primers* são efetivos para análises de diferentes tipos de amostras o que inclui DNA isolado de bactérias e material vegetal.

REFERÊNCIAS

- ABOU-SHANAB, R. A. I. *et al.* Response of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to inoculation with indigenous and commercial Rhizobium strains under organic farming systems in Minnesota. **Symbiosis**, v. 78, n. 2, p. 125–134, 2 jun. 2019.
- AGUILAR, O. M. *et al.* Rapid identification of bean Rhizobium isolates by a nifH gene-PCR assay. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 13, p. 1655–1661, nov. 1998.
- AOAC. Association of Official Agricultural Chemists. Appendix J: Methods Committee Guide lines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. *In: Official Methods of Analysis*. 19th ed. Appendix J, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, 2012.
- ARGAW, A.; MULETA, D. Effect of genotypes-Rhizobium-environment interaction on nodulation and productivity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in eastern Ethiopia. **Environmental Systems Research**, v. 6, n. 1, p. 14, 8 jan. 2018.
- ARKIN, A. P. *et al.* KBase: The United States department of energy systems biology knowledgebase. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 566–569, 2018.
- ARNHOLD, E. Pacote em ambiente R para análise de variância e análises complementares. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 6, p. 488, 9 dez. 2013.
- BINDE, D. R. *et al.* rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 897–908, 01 jul. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 13 de 24 de março de 2011**. Normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, Brasília, DF, 2011.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J.; THIES, J. E. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. **Plant and Soil**, v. 174, n. 1–2, p. 143–180, jul. 1995.
- CHAULAGAIN, D.; FRUGOLI, J. The Regulation of Nodule Number in Legumes Is a Balance of Three Signal Transduction Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1117, 23 jan. 2021.
- DALL'AGNOL, R. F. *et al.* Rhizobium freirei sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART 11, p. 4167–4173, 2013.
- DE LA CRUZ, M.; RAMIREZ, F.; HERNANDEZ, H. DNA Isolation and Amplification from Cacti. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 15, n. 4, p. 319–325, 1997.

- DE OLIVEIRA, V. M. *et al.* 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**, v. 28, n. 2, p. 137–141, 1999.
- DOTY, S. L. *et al.* Identification of an endophytic *Rhizobium* in stems of *Populus*. **Symbiosis**, n. 03334–5114, p. 27–35, 2005.
- DUNIVIN, T. K. *et al.* RefSoil+: a Reference Database for Genes and Traits of Soil Plasmids. **mSystems**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2019.
- EL ATTAR, I. *et al.* Screening of stress tolerant bacterial strains possessing interesting multi-plant growth promoting traits isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, n. December 2018, p. 101225, jul. 2019.
- FRED, E.B., Waksman, S.A. Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganism of the soil. New York; Mc-Graw-Hill, 1928.145 p.
- FERREIRA, L. DE V. M. *et al.* Growth promotion of common bean and genetic diversity of bacteria from Amazon pastureland. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 6, p. 461–469, dez. 2018.
- FRANCISCO, M.; SOUZA, M. D. E. Competitividade de Estirpes Pertencentes a Diferentes Espécies de Rizóbio para Ocupação Nodular em Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agronomia**, v. 37, n1, p.59 - 63, 200p. 59–63, 2003.
- FURSETH, B. J.; CONLEY, S. P.; ANÉ, J.-M. Enumeration of Soybean-Associated Rhizobia with Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2591–2596, nov. 2010.
- GOULART, K. C. S. *et al.* Detection and Enumeration of Bradyrhizobia Cells by Real-Time PCR Quantification. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, v. 4, n. 1, p. 148–154, 2015.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2019, n. 6, 3 jun. 2019.
- GU, C. T. *et al.* *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1364–1368, 2008.
- HARTWIG, U. A. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 1, n. 1, p. 92–120, jan. 1998.
- HILL, P. J.; STEWART, G. S. A. B. The polymerase chain reaction in molecular and microbiology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 10, n. 1, p. 343–377, 1992.
- HONEYCUTT, R. J.; SOBRAL, B. W. S.; MCCLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, v. 141, n. 12, p. 3229–3239, 1 dez. 1995.

HUNGRIA, M. *et al.* Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11–12, p. 1515–1528, out. 2000.

HUNGRIA, M. *et al.* Isolation and growth of rhizobia. *In*: DILWORTH, J. G.; HOWIESON, M. J. (Eds.). . **Working with rhizobia**. 1. ed. Canberra, Australia.: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), 2016. p. 39–60.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 2, p. 88–93, 1 dez. 2003.

IRISARRI, P. *et al.* Selection of Competitive and Efficient Rhizobia Strains for White Clover. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. April, p. 1–11, 23 abr. 2019.

IYER, B.; RAJKUMAR, S. Rhizobia. *In*: **Reference Module in Life Sciences**. [s.l.]: Elsevier, 2018. p. 125–146.

JAIN, C. *et al.* High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2018.

JI, Z. J. *et al.* Competition between rhizobia under different environmental conditions affects the nodulation of a legume. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 114–119, mar. 2017.

JOHN, F.; SANFORD, W. **An {R} Companion to Applied Regression**. Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage. 2019.

KANDEL, S.; JOUBERT, P.; DOTY, S. Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 77, 25 nov. 2017.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–9, 2017.

KUSLICH, C. D.; CHUI, B.; YAMASHIRO, C. T. Overview of PCR. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 18, n. 1, p. 1–34, 23 jun. 2019.

MACDONALD, C. A. *et al.* Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Rhizobium leguminosarum* bacteria and discrimination between different biovars in zinc-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4626–4633, 2011.

MARTIN, B.; LINACRE, A. Direct PCR: A review of use and limitations. **Science and Justice**, v. 60, n. 4, p. 303–310, 2020.

MARTINEZ-ROMERO, E. *et al.* *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 417–426, 1991.

MARTYNIUK, S.; ORÓN, J. Survival of rhizobia in two soils as influenced by storage conditions. **Polish Journal of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 257–60, 2008.

MASSOL-DEYA, A. A. *et al.* Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16–23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis(ARDRA). *In: Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1995. p. 289–296.

MENDOZA-SUÁREZ, M. *et al.* Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the Rhizobium-Legume Symbioses. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. August, 19 ago. 2021.

MENDOZA-SUÁREZ, M. A. *et al.* Optimizing Rhizobium-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N₂ fixation in nodules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 18, p. 9822–9831, 2020.

MERCANTE, F. M.; OTSUBO, A. A.; BRITO, O. R. New Native Rhizobia Strains for Inoculation of Common Bean in the Brazilian Savanna. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, p. 1–11, 2017.

MICHIELS, J. Phaseolus vulgaris is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, n. 3, p. 193–205, ago. 1998.

MOREIRA, L. P.; OLIVEIRA, A. P. S.; FERREIRA, E. P. DE B. Nodulation, contribution of biological N₂ fixation, and productivity of the common bean (Phaseolus vulgaris L.) inoculated with rhizobia isolates. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 6, p. 644–651, 20 jun. 2017.

MOSTASSO, L. *et al.* Selection of bean (Phaseolus vulgaris L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 2–3, p. 121–132, jan. 2002.

NAAMALA, J.; JAISWAL, S. K.; DAKORA, F. D. Antibiotics Resistance in Rhizobium: Type, Process, Mechanism and Benefit for Agriculture. **Current Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 804–816, 2016.

NAROŻNA, D. *et al.* Survival and Competitiveness of Bradyrhizobium japonicum Strains 20 Years after Introduction into Field Locations in Poland. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5552–5559, 15 ago. 2015.

NDUNGU, S. M. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the competitiveness analysis of selected indigenous cowpea (Vigna unguiculata L. Walp.) Bradyrhizobium strains from Kenya. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 12, p. 5265–5278, 2018.

NORRIS, D.O.; DATE, R.A. Legume bacteriology. *In.*: SHAW, N.H.; BRYAN, W. W. (Ed.) **Tropical pasture research: principles and methods**. Brisbane: CAB Publisher. p. 134-173, 1976.

OLIVEIRA, D. P. *et al.* Rhizobium strains selected from the Amazon region increase the yield of snap bean genotypes in protected cultivation. **Bragantia**, v. 77, n. 2, p. 292–298, 2018.

OLIVEIRA, V. M. *et al.* A ribosomal RNA gene intergenic spacer based PCR and DGGE fingerprinting method for the analysis of specific rhizobial communities in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 3, p. 366–379, 2006.

ORMEÑO-ORRILLO, E. *et al.* Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2012.

OSEI, O. *et al.* PCR assay for direct specific detection of *Bradyrhizobium* elite strain BR 3262 in root nodule extracts of soil-grown cowpea. **Plant and Soil**, v. 417, n. 1–2, p. 535–548, 15 ago. 2017.

OTSUBO, A. A.; BRITO, O. R.; MERCANTE, F. M. Productivity and nodulation of promising lineages of the Carioca bean group inoculated with *Rhizobium tropici* or supplemented with nitrogen fertilizer. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2763–2776, 2013.

PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MARTINS MERCANTE, F. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1851–1864, 2007.

HILL, P. J.; STEWART, G.S.A.B. The Polymerase Chain Reaction in Molecular and Microbiology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 10, n. 1, 343-378, 1992.

RAPOSEIRAS, R. *et al.* Rhizobium strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 439–447, 2006.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021..

RIBEIRO, T.G. Filogenia de rizóbios do feijoeiro com base no sequenciamento do gene 16s rRNA e na análise de sequenciamento multilocus. 2017. 76 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Rio de Janeiro, 2017.

RICHARDSON, A. E. *et al.* Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4–5, p. 515–524, 1995.

RILLING, J. I. *et al.* Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 130, n. November 2018, p. 205–219, mar. 2019.

SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. the Use of Immunological Methods To Detect and. **Biotech. Adv.**, v. 13, n. 1, p. 75–90, 1995.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014–1026, 2012.

SHAMSELDIN, A.; VELÁZQUEZ, E. The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Springer Netherlands, 2020.

SIDSTEDT, M.; RÅDSTRÖM, P.; HEDMAN, J. **PCR inhibition in qPCR , dPCR and MPS — mechanisms and solutions**. p. 2009–2023, 2020.

SILVA, C.G.N. Uso da Técnica de PCR em Tempo Real para Quantificação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Tecidos de Cana-de-açúcar. 98 p. 2017. Dissertação(Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

SOARES, I. C. *et al.* Real-time PCR method to quantify Sp245 strain of *Azospirillum baldaniorum* on *Brachiaria* grasses under field conditions. **Plant and Soil**, n. 0123456789, 2021.

SWARNALAKSHMI, K. *et al.* Significance of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Grain Legumes: Growth Promotion and Crop Production. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1596, 17 nov. 2020.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. BEN. Influence of the Size of Indigenous Rhizobial Populations on Establishment and Symbiotic Performance of Introduced Rhizobia on Field-Grown Legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 19–28, jan. 1991.

TORABIAN, S.; FARHANGI-ABRIZ, S.; DENTON, M. D. Do tillage systems influence nitrogen fixation in legumes? A review. **Soil and Tillage Research**, v. 185, n. January 2018, p. 113–121, jan. 2019.

TORRES, A. R. *et al.* Hydrogen-uptake genes improve symbiotic efficiency in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 687–696, 2020.

VÁSQUEZ-ARROYO, J. *et al.* Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v. 204, n. 1, p. 147–154, 1998.

VAZ MARTINS, T.; LIVINA, V. N. What Drives Symbiotic Calcium Signalling in Legumes? Insights and Challenges of Imaging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2245, 7 maio 2019.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**. 5, 25-40, 1994.

VINCENT, J.M. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. **Blackwell Scientific Publ.**, 45. 1970.

VU, N. X. *et al.* Generation of a rabbit single-chain fragment variable (scFv) antibody for specific detection of *Bradyrhizobium* sp. DOA9 in both free-living and bacteroid forms. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–21, 2017.

WATSON, J. M.; SCHOFIELD, P. R. Species-specific, symbiotic plasmid-located repeated DNA sequences in *Rhizobium trifolii*. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 199, n. 2, p. 279–289, 1985.

WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 35–43, 2010.

ZHANG, J. J. *et al.* Genotypic alteration and competitive nodulation of *Mesorhizobium muleiense* against exotic chickpea rhizobia in alkaline soils. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 520–524, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Informações sobre os *primers* desenhados nesse trabalho para amplificação de fragmentos de DNA alvo no genoma da estirpe CIAT 899. (continua)

| ID e descrição de gene CIAT 899 GenBank: CP004015.1 | Nome do <i>primer</i> | Sequência (5'-3') | Nº | %CG | Tm | pb |
|--|-----------------------|------------------------|----|------|------|-----|
| RTCIAT899_CH00110 (oxidoreductase) | Ciat899G22 F | GATGCTGGTCTGTGATGTCACG | 22 | 54,5 | 62,0 | 101 |
| | Ciat899G22 R | CCGCATTGTTGACGAGCAGATC | 22 | 54,5 | 62,2 | |
| RTCIAT899_CH00130 (tryptophan synthase subunit alpha) | Ciat899G26 F | CTTCGCCGCTTTGAAGACTG | 20 | 55,0 | 59,5 | 136 |
| | Ciat899G26 R | CATGCCAAGCTCGATGACG | 19 | 57,9 | 59,3 | |
| RTCIAT899_RS00360 (MFS transporter) | Ciat899G72 F | AGAGCCTTGGAACGATAGC | 20 | 50,0 | 59,6 | 101 |
| | Ciat899G72 R | CTCTTCATTGCAGCATCGGC | 20 | 55,0 | 60,4 | |
| RTCIAT899_RS00440 (TIM barrel protein) | Ciat899G88 F | TCGACCGCATCGTCCATCTC | 20 | 60,0 | 62,7 | 85 |
| | Ciat899G88 R | AGCCGTTCCGCCAGATCG | 18 | 66,7 | 64,1 | |
| RTCIAT899_RS00550 (GNAT family N-acetyltransferase) | Ciat899G110 F | CTCCGAAGATGGGGATACTCTG | 22 | 54,5 | 62,7 | 127 |
| | Ciat899G110 R | GTTGGAGGTATAGCCGAGC | 19 | 57,9 | 61,6 | |
| RTCIAT899_CH00555 (acyltransferase) | Ciat899G111 F | TCCTACAGCCTCTACCTCAC | 20 | 55,0 | 62,5 | 82 |
| | Ciat899G111 R | ACAGCCCTGAAGATTGTCC | 20 | 55,0 | 62,5 | |
| RTCIAT899_RS00590 (hypothetical protein) | Ciat899G118 F | TAATAGCAAGCTCGGCTTCG | 20 | 50,0 | 59,2 | 147 |
| | Ciat899G118 R | AAGTCCAGAACGAGGTGG | 18 | 55,6 | 58,2 | |
| RTCIAT899_RS00590 (hypothetical protein) | Ciat899G118I F | GCGGAGGCAGGAATATAGG | 19 | 57,9 | 61,7 | 112 |
| | Ciat899G118I R | CGACGGATACCAGGATCTGG | 20 | 60,0 | 62,4 | |
| RTCIAT899_RS00590 (hypothetical protein) | Ciat899G118II F | GAGGTGGCATGGTTCCTC | 18 | 55,6 | 58,0 | 114 |
| | Ciat899G118II R | GATGGAAGGCGATAGTCC | 18 | 55,6 | 58,0 | |
| RTCIAT899_RS06935 (DUF1467 family protein) | Ciat899G139 F | CAGATCATCGCCAGTTTCGC | 20 | 55,0 | 59,6 | 111 |
| | Ciat899G139 R | ACCTAGAATCACATGCTCGTC | 21 | 47,6 | 58,9 | |
| RTCIAT899_RS00715 (quaternary ammonium transporter) | Ciat899G144 F | CGTCAGCACTGCGAAGATGC | 20 | 60,0 | 62,3 | 143 |
| | Ciat899G144 R | CGGCAGGACATGGAAACATCG | 21 | 57,1 | 62,4 | |
| RTCIAT899_RS00810 (HAMP domain-containing protein) | Ciat899G164 F | CGCATTTCTCAGCACAAAGCC | 20 | 55,0 | 60,5 | 142 |
| | Ciat899G164 R | CATCTGCTCAATCTTGGCAGTG | 22 | 50,0 | 60,3 | |

APÊNDICE A – Informações sobre os *primers* desenhados nesse trabalho para amplificação de fragmentos de DNA alvo no genoma da estirpe CIAT 899. (continua)

| ID e descrição de gene CIAT 899 GenBank: CP004015.1 | Nome do <i>primer</i> | Sequência (5'-3') | Nº | %CG | Tm | pb |
|---|-----------------------|--------------------------------|-----------|-------------|-------------|------------|
| RTCIAT899_RS08285 (ATP-binding protein) | Ciat899G166 F | CCTTCACTTGCAGATCAAGC | 20 | 50,0 | 57,7 | 148 |
| | Ciat899G166 R | CAACGTCATAATGTTCCATCGG | 22 | 45,7 | 57,0 | |
| RTCIAT899_RS00905 (hypothetical protein) | Ciat899G183 F | GCCGCTGAATTTGCACAGGATG | 22 | 54,5 | 63,4 | 94 |
| | Ciat899G183 R | AGTGGAGAAGGCATCGGTTCG | 20 | 60,0 | 63,8 | |
| RTCIAT899_RS09175 (hypothetical protein) | Ciat899G184 F | TCCATGCAAGCAGTATTCGC | 20 | 50,0 | 59,5 | 101 |
| | Ciat899G184 R | CAGCGGGCAATTCGTGAC | 18 | 61,0 | 59,9 | |
| RTCIAT899_RS11990 (phage tail tape measure protein) | Ciat899G241 F | GCGAAGTCTTAGATACTCTCGG | 22 | 50,0 | 60,0 | 135 |
| | Ciat899G241 R | GCATCAGGTTCGCTAATGTTCG | 20 | 55,0 | 60,0 | |
| | Ciat899G241I F | GCGCAATCTGCGATGGATAG | 20 | 55,0 | 60,7 | 137 |
| | Ciat899G241I R | TCAGCAATGGATGACGCATCG | 21 | 52,4 | 60,4 | |
| RTCIAT899_RS12105 (antitermination protein) | Ciat899G243 F | GCTGATGCAAGATGTGATGC | 20 | 50,0 | 58,0 | 152 |
| | Ciat899G243 R | CCTGATCGGATACACGATGC | 20 | 55,0 | 59,8 | |
| RTCIAT899_CH12950 (hypothetical protein) | Ciat899G2573 F | ACATCGTCGTATCGGAATCC | 20 | 50,0 | 58,0 | 121 |
| | Ciat899G2573 R | AGAAGGACAATCACCAAGCC | 20 | 50,0 | 59,6 | |
| RTCIAT899_CH17610 (hypothetical protein) | Ciat899G3504 F | AGCATATGGATGGCGTGATC | 20 | 50,0 | 59,5 | 135 |
| | Ciat899G3504 R | GACGCTTTGATCTCCTCCAG | 20 | 55,0 | 59,8 | |
| RTCIAT899_RS04385 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase) | Ciat899G882 F | GAAGGTGAAGCCGAATGCG | 19 | 57,0 | 59,9 | 91 |
| | Ciat899G882 R | GATGCCGACGATTTTGTTCATCG | 22 | 50,0 | 59,1 | |
| | Ciat899G882I F | CTGCTCTCCTTCGGTACG | 18 | 61,0 | 59,4 | |
| RTCIAT899_RS04565 (4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase) | Ciat899G918 F | CGATCTCTTCATCGTCGTCG | 20 | 55,0 | 57,3 | 128 |
| | Ciat899G918 R | TACTGTCCAGTCGATCTC | 19 | 52,0 | 58,1 | |
| RTCIAT899_RS05330 (monovalent cation/H(+) antiporter subunit G) | Ciat899G1070 F | CTTCTACTTTTCGGGTGCGTTG | 21 | 52,4 | 60,0 | 153 |
| | Ciat899G1070 R | CATGTCCTGCGAGTGGATG | 19 | 57,9 | 59,5 | |
| RTCIAT899_RS08085 (putative phage terminase. large subunit) | Ciat899G1624 F | AGACGAGTTCTTCGACGAGTAG | 22 | 50,0 | 59,9 | 110 |
| | Ciat899G1624 R | GTTGATGACCTTCTCGGCG | 19 | 57,9 | 59,4 | |

APÊNDICE A – Informações sobre os *primers* desenhados nesse trabalho para amplificação de fragmentos de DNA alvo no genoma da estirpe CIAT 899. (conclusão)

| ID e descrição de gene CIAT 899 GenBank: CP004015.1 | Nome do <i>primer</i> | Sequência (5'-3') | Nº | %CG | Tm | pb |
|---|--------------------------|--------------------------------|-----------|-------------|-------------|------------|
| RTCIAT899_RS08085 (putative phage terminase. large subunit) | Ciat899G1624I F | CGCACATCTCGCAACAGTTC | 20 | 55,0 | 59,3 | 87 |
| | Ciat899G1624I R | GTCGAAAGCGTTCGCAGGA | 18 | 61,1 | 60,4 | |
| | Ciat899G1624II F | CGATGCTGTTGCGATGTACG | 20 | 55,0 | 59,1 | 97 |
| | Ciat899G1624II R | CCGCTTGAGGTAAGACAGG | 19 | 57,9 | 60,4 | |
| | Ciat899G1624III F | CTTTGGATCGAGGCATGGAC | 20 | 55,0 | 60,2 | 100 |
| | Ciat899G1624III R | TTCCTGTGTGGAACGTCTCA | 20 | 50,0 | 59,2 | |
| RTCIAT899_RS09905 (DUF922 domain-containing protein) | Ciat899G1991 F | CAGCTTTCCGTGATCTGGGATAC | 23 | 52,2 | 63,0 | 130 |
| | Ciat899G1991 R | AATTGCTGGCGGATGGCAGAG | 21 | 57,1 | 65,0 | |
| RTCIAT899_RS18555 (lipoprotein) | Ciat899G3718 F | CCTCTTGTCTGCATGTCAGG | 20 | 55,0 | 60,0 | 81 |
| | Ciat899G3718 R | GAGAAGGAAACTTCCGACAGC | 21 | 52,4 | 60,1 | |
| RTCIAT899_RS18575 (16S rRNA (guanine(527)-N(7))-methyltransferase rsmG) | Ciat899G3722 F | CCCAATGATCGGTTACAGGATGC | 23 | 52,2 | 63,4 | 96 |
| | Ciat899G3722 R | ATCTTGTCGCACCGTCCACG | 20 | 60,0 | 63,2 | |
| | Ciat899G3722I F | ACCCAATGATCGGTTACAGG | 20 | 50,0 | 59,3 | 100 |
| | Ciat899G3722I R | TCAATCTTGTCGCACCGTCC | 20 | 55,0 | 60,8 | |
| | Ciat899G3722II F | TGGACGGTGCACCAAGATTG | 20 | 55,0 | 60,7 | 136 |
| | Ciat899G3722II R | ACAATGCAAGGTTAGAGAGTCC | 22 | 45,5 | 59,8 | |
| RTCIAT899_RS18580 (tRNA uridine-5-carboxymethylaminomethyl(34) synthesis enzyme mnmG) | Ciat899G3723 F | TGTCCCTGGAAGTGGAGAAG | 20 | 55,0 | 61,5 | 175 |
| | Ciat899G3723 R | ATCACCCCAATATAGGATTCCG | 22 | 45,5 | 60,1 | |

Os *primers* destacados em negrito nessa tabela foram os selecionados por este trabalho para detectar na PCR a bactéria CIAT 899 ou CPAC H12.

Fonte: Do autor (2022)

APÊNDICE B – Informações sobre os *primers* desenhados nesse trabalho para amplificação de fragmentos de DNA alvo no genoma da estirpe PRF 81. (continua)

| ID e descrição de gene estirpe PRF 81 (NCBI) | Nome do <i>primer</i> | Sequência (5'-3') | Nº | %CG | Tm | pb |
|--|-----------------------|--------------------------------|-----------|-------------|-------------|-----------|
| ENN84927.1 (3-oxoadipate enol-lactonase) | Prf81G19 F | AGGATATGGCAAAGGCAACACAG | 23 | 47,8 | 62,9 | 76 |
| | Prf81G19 R | GCCGTCAGGTTGACCATGTG | 20 | 60,0 | 62,9 | |
| | Prf81G19I F | TCGATGAACTGGAGCTTGGC | 20 | 55,0 | 61,5 | 142 |
| | Prf81G19I R | GCTTCGGTTGTTTCGCTTGTAG | 21 | 52,4 | 60,3 | |
| ENN84940.1 (transcriptional regulator. LysR Family) | Prf81G39 F | GTCATGCCCAAGTCAGTCCTTG | 22 | 54,5 | 63,1 | 92 |
| | Prf81G39 R | CGATAGACGAGGATCGTATCGAC | 23 | 52,2 | 61,2 | |
| | Prf81G39I F | CATGCCCAAGTCAGTCCTTG | 20 | 55,0 | 60,5 | 165 |
| | Prf81G39I R | AAGCGCAAATCCCTGCC | 17 | 58,8 | 59,9 | |
| ENN84942.1 (hypothetical protein) | Prf81G42 F | ACAGAGGGCGACGGTGTG | 18 | 66,7 | 64,0 | 83 |
| | Prf81G42 R | GGAGCCGCCTTCAGCTTG | 18 | 66,7 | 63,9 | |
| ENN84943.1 (beta-lactamase) | Prf81G44 F | GGATCGGCGGCTATGACATC | 20 | 60,0 | 63,3 | 83 |
| | Prf81G44 R | CCGCTCGGAGGCAATATGC | 19 | 63,2 | 63,8 | |
| | Prf81G44I F | GCCTGTTGGCGGAACTGATC | 20 | 60,0 | 63,4 | 151 |
| | Prf81G44I R | TTGCCCTCATAGCCGATGAC | 20 | 55,0 | 62,2 | |
| WP_004124305.1 (pilus assembly protein) | Prf81G62 F | ATGCGAACCAGTTTACCGTC | 20 | 50,0 | 58,9 | 115 |
| | Prf81G62 R | ATCCTGATCGTGGAATAGCG | 20 | 50,0 | 58,5 | |
| WP_051074136.1 (DUF535 domain-containing protein) | Prf81G76 F | ATGTCTTATCGCACTTGCCG | 20 | 50,0 | 58,7 | 150 |
| | Prf81G76 R | ACGACGAATGTATAGCAGCC | 20 | 50,0 | 59,3 | |
| ENN85000.1 (putative transcriptional regulatory protein y4xI) | Prf81G101 I F | TATGACAACGCTTGCCGATG | 20 | 50,0 | 58,5 | 109 |
| | Prf81G101 I R | CTTGGGAATGAGCGAGAGG | 19 | 57,9 | 59,9 | |
| ENN85002.1 (Putative alkaline phosphatase protein) | Prf81G106 F | TCTCTGGAATACGCCATATCTG | 22 | 45,5 | 59,1 | 110 |
| | Prf81G106 R | AGAGGATAAGCCAGTACGATG | 21 | 47,6 | 59,4 | |
| ENN85098.1 (hypothetical protein) | Prf81G210 F | ATCCTGAAGACCGCCGTG | 18 | 61,0 | 61,1 | 172 |
| | Prf81G210 R | AGCACGCATTCCACGAGC | 18 | 61,1 | 61,6 | |
| WP_037154253.1 (LysR family transcriptional regulator) | Prf81G222I F | GCGTCCGACCTGATGTTGAC | 20 | 60,0 | 62,3 | 122 |
| | Prf81G222I R | GGGCTCCAATCCTCCAATACG | 21 | 57,1 | 63,8 | |

APÊNDICE B – Informações sobre os *primers* desenhados nesse trabalho para amplificação de fragmentos de DNA alvo no genoma da estirpe PRF 81. (continua)

| ID e descrição de gene estirpe PRF 81 (NCBI) | Nome do <i>primer</i> | Sequência (5'-3') | Nº | %CG | Tm | pb |
|---|-----------------------|-----------------------------|-----------|-------------|-------------|------------|
| WP_037154253.1 (LysR family transcriptional regulator) | Prf81G222II F | AGCTCGGTATGTCCTCATCG | 20 | 55,0 | 61,1 | 113 |
| | Prf81G222II R | ACCCGCATCCGACAGTGT | 18 | 61,1 | 62,9 | |
| ENN85252.1 (nitrate reductase delta subunit protein) | Prf81G392 F | CGCTTCGTCCGCTTCTTAACG | 20 | 55,0 | 59,7 | 118 |
| | Prf81G392 R | TGCACATGCTCAAAGAGATGCAG | 23 | 47,8 | 61,9 | |
| WP_051074149.1 (peptidylprolyl isomerase) | Prf81G395 F | GCCTGGGCATCCTCATCGA | 19 | 63,2 | 64,6 | 100 |
| | Prf81G395 R | GTCTGCACTTCCCCTCGA | 19 | 63,2 | 63,7 | |
| WP_004125354.1 (type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin) | Prf81G492 F | AGCCGTCACCTATATTTCG | 18 | 50,0 | 55,5 | 147 |
| | Prf81G492 R | ACATAATGATGCTCGTACCG | 20 | 45,0 | 55,8 | |
| ENN85368.1 (Transcriptional regulator. LysR Family) | Prf81G509 F | ATCTACGGCACCATAGGTTC | 20 | 50,0 | 60,0 | 100 |
| | Prf81G509 R | GAAGCGTTGATCGGAACACG | 20 | 55,0 | 59,0 | |
| ENN85390.1 (acyl-CoA dehydrogenase) | Prf81G529 F | CGGAGGAACAAAAGCAGCG | 19 | 57,9 | 59,8 | 110 |
| | Prf81G529 R | GGTCTTAAGGTTGAGGCG | 19 | 57,9 | 60,2 | |
| | Prf81G529I F | GCTGTTTGCTTCGGAAATGG | 20 | 55,0 | 60,8 | |
| WP_004125482.1 (acyl-CoA dehydrogenase) | Prf81G530 F | CCCAGTTGAAGGAGGAAGG | 19 | 58,0 | 60,6 | 102 |
| | Prf81G530 R | TCTGGATCGCATCGGAGC | 18 | 61,0 | 60,9 | |
| | Prf81G530I F | AGTTGAAGGAGGAAGGGC | 18 | 55,6 | 59,7 | |
| WP_004125482.1 (acyl-CoA dehydrogenase) | Prf81G530II F | CCTTGCTCGACCATCATG | 18 | 61,1 | 62,0 | 93 |
| | Prf81G530II R | CGGCAGGAAACGCTGCTT | 18 | 55,6 | 56,5 | |
| | Prf81G533 F | GACAATGTCGTCTTCGG | 20 | 55,0 | 58,4 | |
| ENN85392.1 (2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit) | Prf81G533 R | CAGGATGCCGGATTTCGTTG | 19 | 58,0 | 59,6 | 129 |
| | Prf81G533I F | GCAAGACCCGCTGTTTCG | 18 | 61,1 | 59,9 | 107 |
| | Prf81G533I R | GGCAAACCTGGATTTTCGACGC | 20 | 55,0 | 60,3 | |
| | Prf81G533II F | CGTATCCGCTACCGTTCC | 18 | 61,1 | 60,1 | 153 |
| | Prf81G533II R | ATTGGAAGGCACGATCACC | 19 | 52,6 | 59,0 | |

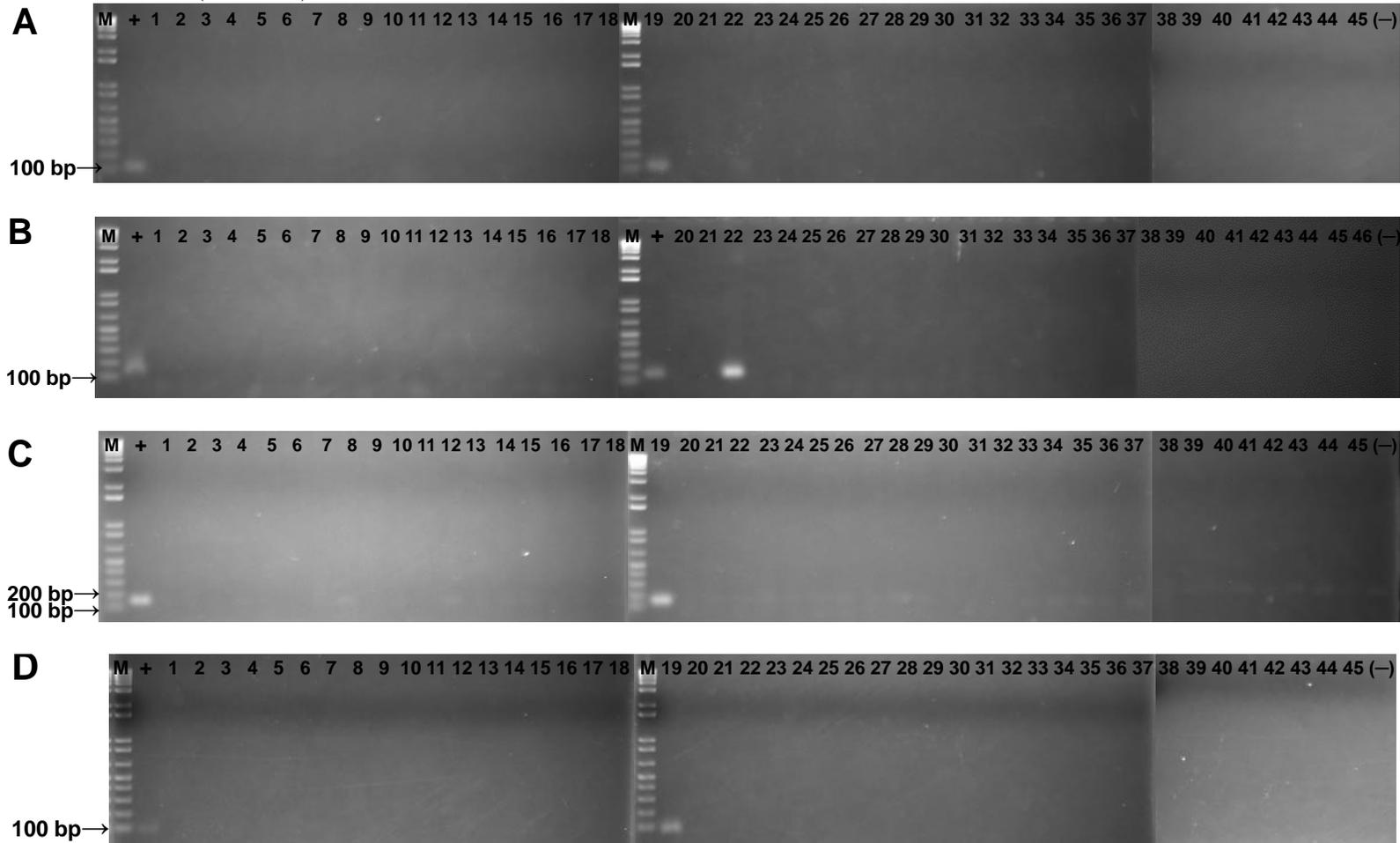
APÊNDICE B – Informações sobre os *primers* desenhados nesse trabalho para amplificação de fragmentos de DNA alvo no genoma da estirpe PRF 81. (conclusão)

| ID e descrição de gene estirpe PRF 81 (NCBI) | Nome do <i>primer</i> | Sequência (5'-3') | Nº | %CG | Tm | pb |
|---|-----------------------|------------------------------|-----------|-------------|-------------|------------|
| WP_004125485.1 (alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta) | Prf81G534 F | TCGATACCATCGTCCAATCGG | 21 | 52,4 | 60,5 | 105 |
| | Prf81G534 R | CCTGAACCAGCGAAGCGA | 18 | 61,0 | 61,0 | |
| | Prf81G534I F | ACAATGTCGTCGTCTTCGGTG | 21 | 52,4 | 59,9 | 98 |
| | Prf81G534I R | GAAACAGCGGGTCTTGCC | 18 | 61,1 | 60,9 | |
| ENN85405.1 (hypothetical protein) | Prf81G546 F | CTCAGGCTCTCCTTCTACG | 19 | 58,0 | 60,0 | 148 |
| | Prf81G546 R | CGATGAAGGTCACAGGTTTCG | 20 | 55,0 | 59,0 | |
| | Prf81G546I F | TTGATGAGCTTCGGACTTGC | 20 | 50,0 | 58,6 | 97 |
| | Prf81G546I R | GTCCCAGAAGCATCAAGAGG | 20 | 55,0 | 60,5 | |
| | Prf81G546II F | CTCGGCTATGTCTTGCGTC | 19 | 57,9 | 59,9 | 150 |
| | Prf81G546II R | CGATAGGCTATGGTGCTCTC | 20 | 55,0 | 60,9 | |
| WP_004125559.1 (hypothetical protein) | Prf81G561 F | GAGGTGGATCTTCTGATCG | 19 | 52,6 | 56,4 | 92 |
| | Prf81G561 R | CTCGGGTAAGTCTCGTATC | 19 | 52,6 | 56,7 | |

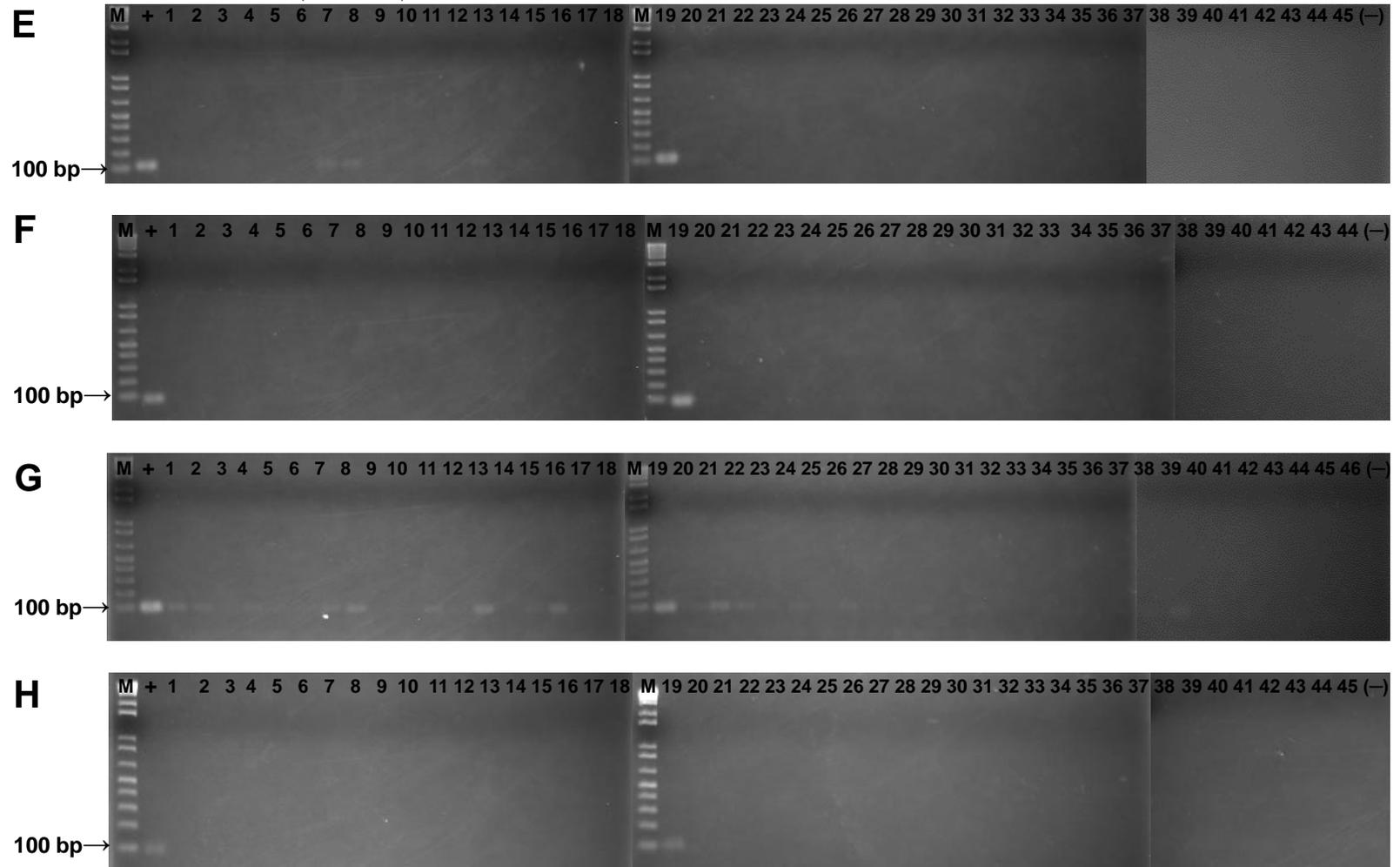
Os *primers* destacados em negrito nessa tabela foram os selecionados por este trabalho para detectar na PCR a bactéria PRF 81.

Fonte: Do autor (2022).

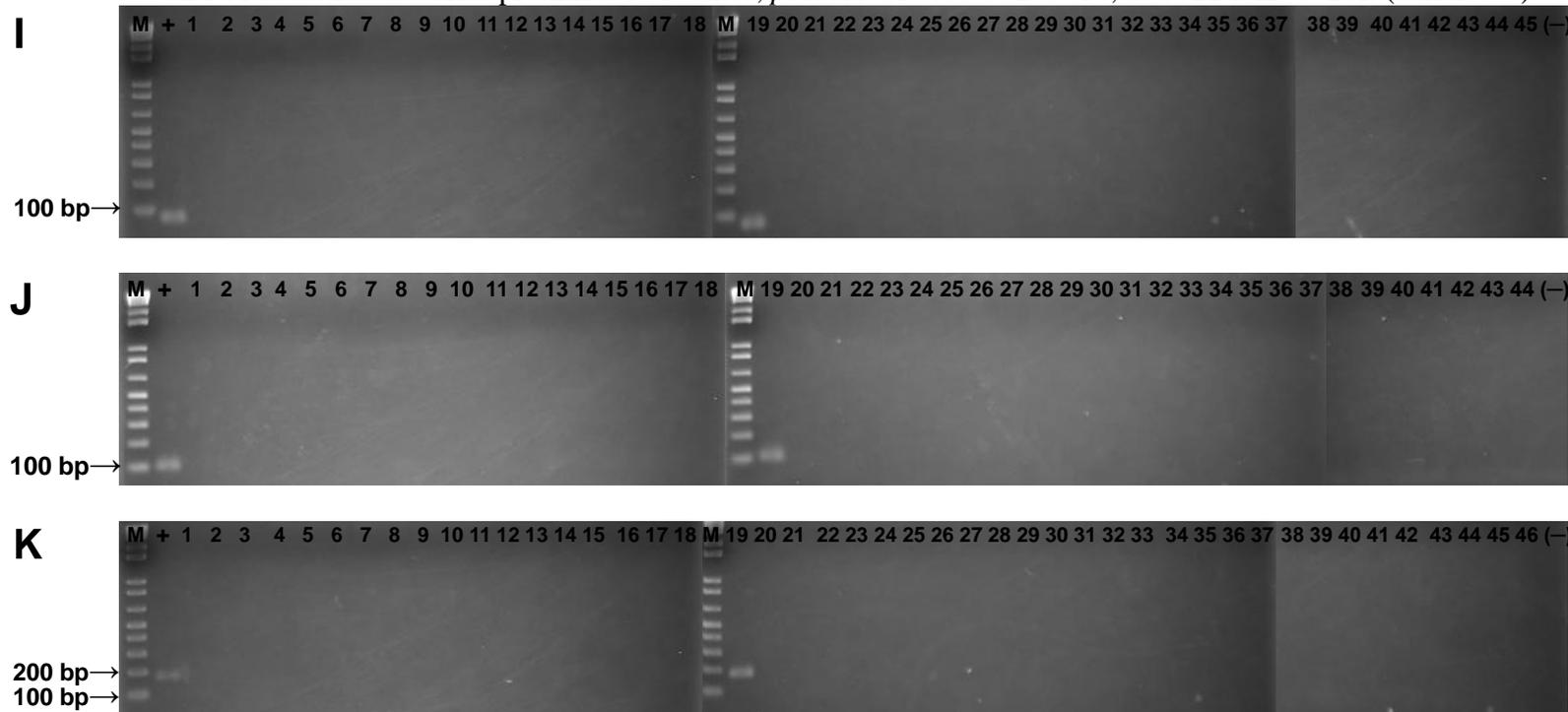
APÊNDICE C – Resultado de ampliações por PCR para os *primers* desenhados para a estirpe CIAT 899 com amostras do DNA de outras bactérias próximas e distantes, *primers* Ciat899G: **A-** 139; **B-** 144; **C-** 166 e **D-** 882. (continua)



APÊNDICE C – Resultado de ampliações por PCR para os *primers* desenhados para a estirpe CIAT 899 com amostras do DNA de outras bactérias próximas e distantes, *primers* Ciat899G: **E-** 1624; **F-** 1624I; **G-** 1624II e **H-** 1624III. (continua)



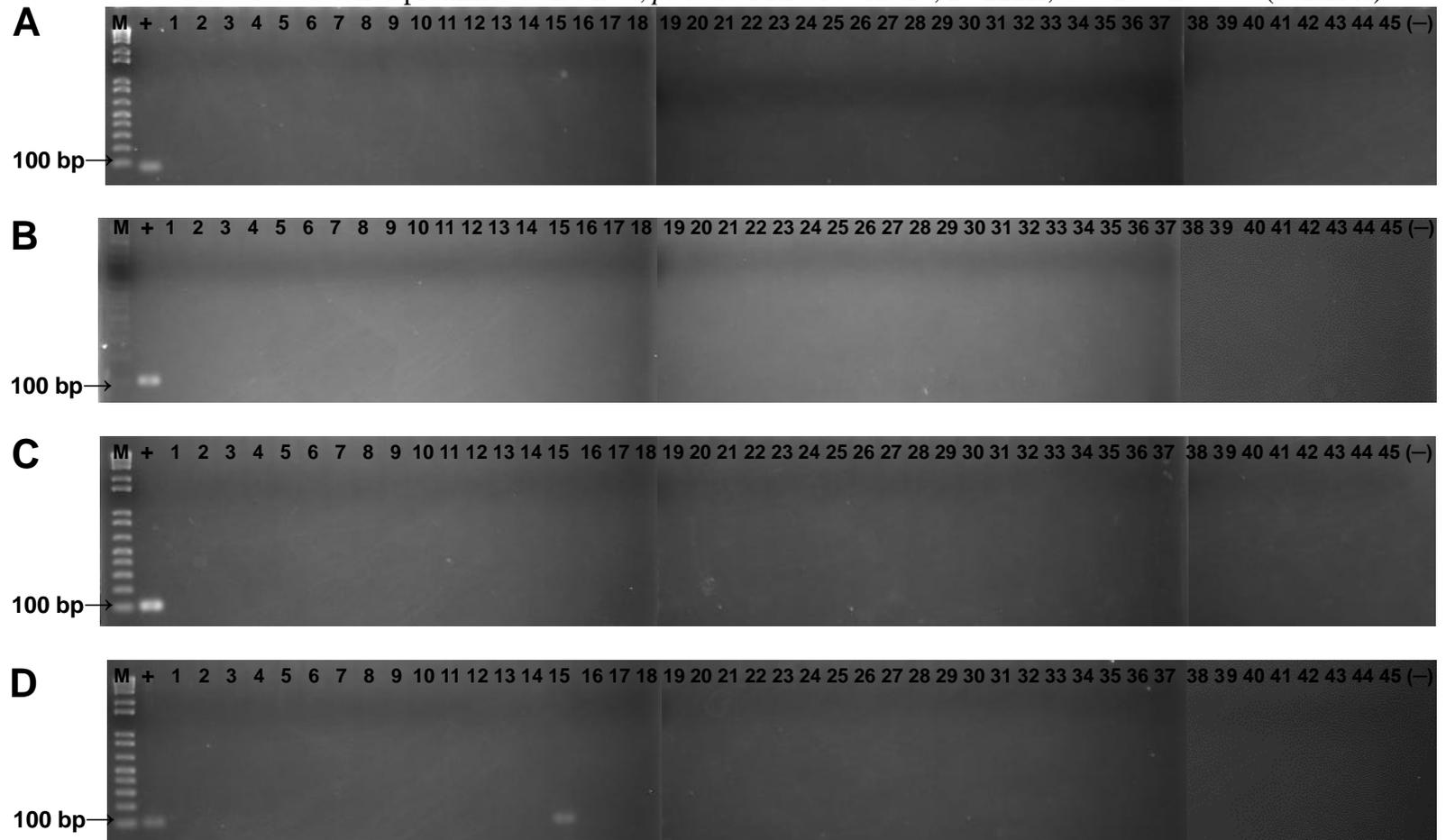
APÊNDICE C – Resultado de ampliações por PCR para os *primers* desenhados para a estirpe CIAT 899 com amostras do DNA de outras bactérias próximas e distantes, *primers* Ciat899G: **I-** 3718; **J-** 3722 e **K-** 3723I. (conclusão)



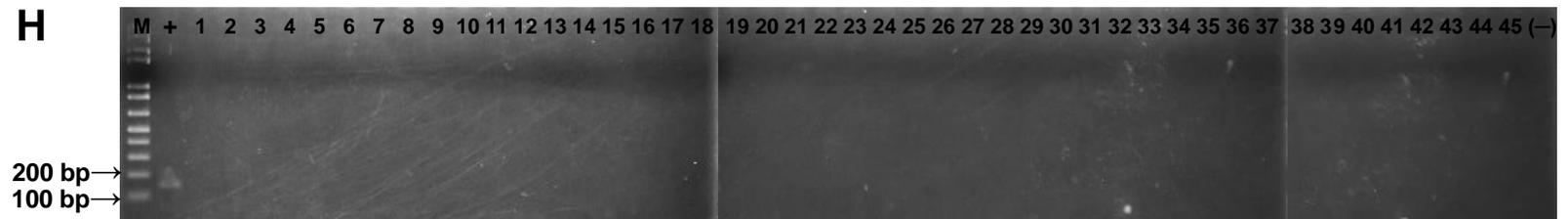
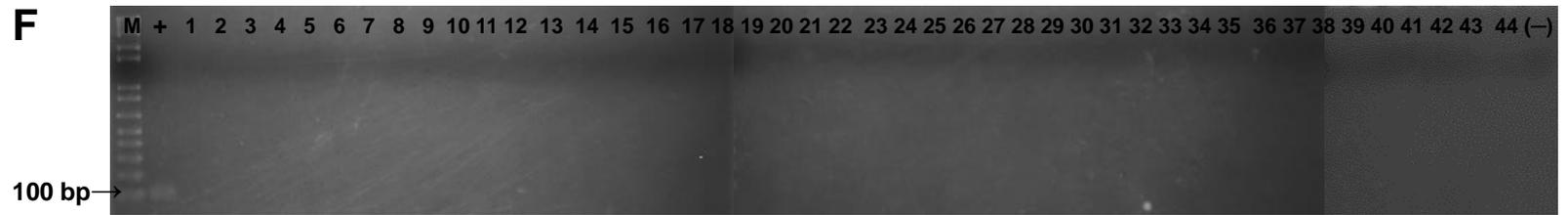
Amostras: (+) BR322; 1-BR219; 2-BR225; 3- BR230; 4-BR249; 5- BR252; 6- BR256; 7- BR272; 8- BR275; 9- BR312; 10- BR313; 11- BR314; 12- BR315; 13-BR317; 14- BR318; 15- BR317; 16- BR362; 17- BR364; 18- BR367; 19- BR534; 20- BR295; 21- BR298; 22- BR920; 23-BR939; 24- BR29; 25- BR85; 26- BR111; 27- BR112; 28- BR116; 29-BR212; 30- BR222; 31- BR521; 32- BR3299; 33- BR3407; 34- BR3471; 35-BR3480; 36- BR4007; 37-BR5401; 38-BR5410; 39- BR6204; 40- BR7608; 41- BR 7801; 42- BR10303; 43- BR10327; 44- BR10334; 45- BR520 e 46- (-).

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE D – Resultados de ampliações por PCR para os *primers* desenhados para a estirpe PRF 81 com amostras do DNA de outras bactérias próximas e distantes, *primers* PRF81G: **A-** 19; **B-** 222II; **C-** 529 e **D-** 530. (continua)



APÊNDICE D – Resultados de amplificações por PCR para os *primers* desenhados para a estirpe PRF 81 com amostras do DNA de outras bactérias próximas e distantes, *primers* PRF81G: **E**- 530II; **F**- 534; **G**- 534I e **H**- 546. (continua)



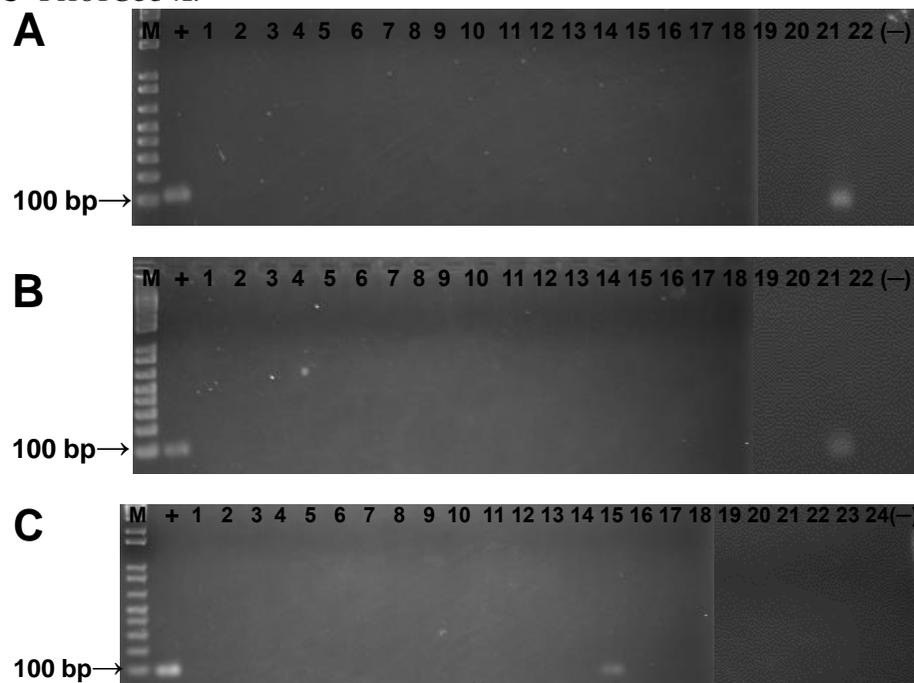
APÊNDICE D – Resultados de ampliações por PCR para os *primers* desenhados para a estirpe PRF 81 com amostras do DNA de outras bactérias próximas e distantes, *primers* PRF81G: **I-** 546I e **J-** 561. (conclusão)



Amostras: (+) BR520; **1-** BR322; **2-**BR219; **3-**BR225; **4-** BR230; **5-**BR249; **6-** BR252; **7-** BR256; **8-** BR272; **9-** BR275; **10-** BR295; **11-** BR298; **12-** BR312; **13-** BR313; **14-** BR314; **15-** BR315; **16-**BR317; **17-** BR318; **18-** BR317; **19-** BR362; **20-** BR364; **21-** BR367; **22-** BR534; **23-** BR920; **24-**BR939; **25-** BR29; **26-** BR85; **27-** BR111; **28-** BR112; **29-** BR116; **30-**BR212; **31-** BR222; **32-** BR521; **33-** BR3299; **34-** BR3407; **35-** BR3471; **36-**BR3480; **37-** BR4007; **38-**BR5401; **39-**BR5410; **40-** BR6204; **41-** BR7608; **42-** BR10303; **43-** BR10327; **44-** BR10334; **45-** (-).

Fonte: Do autor (2022).

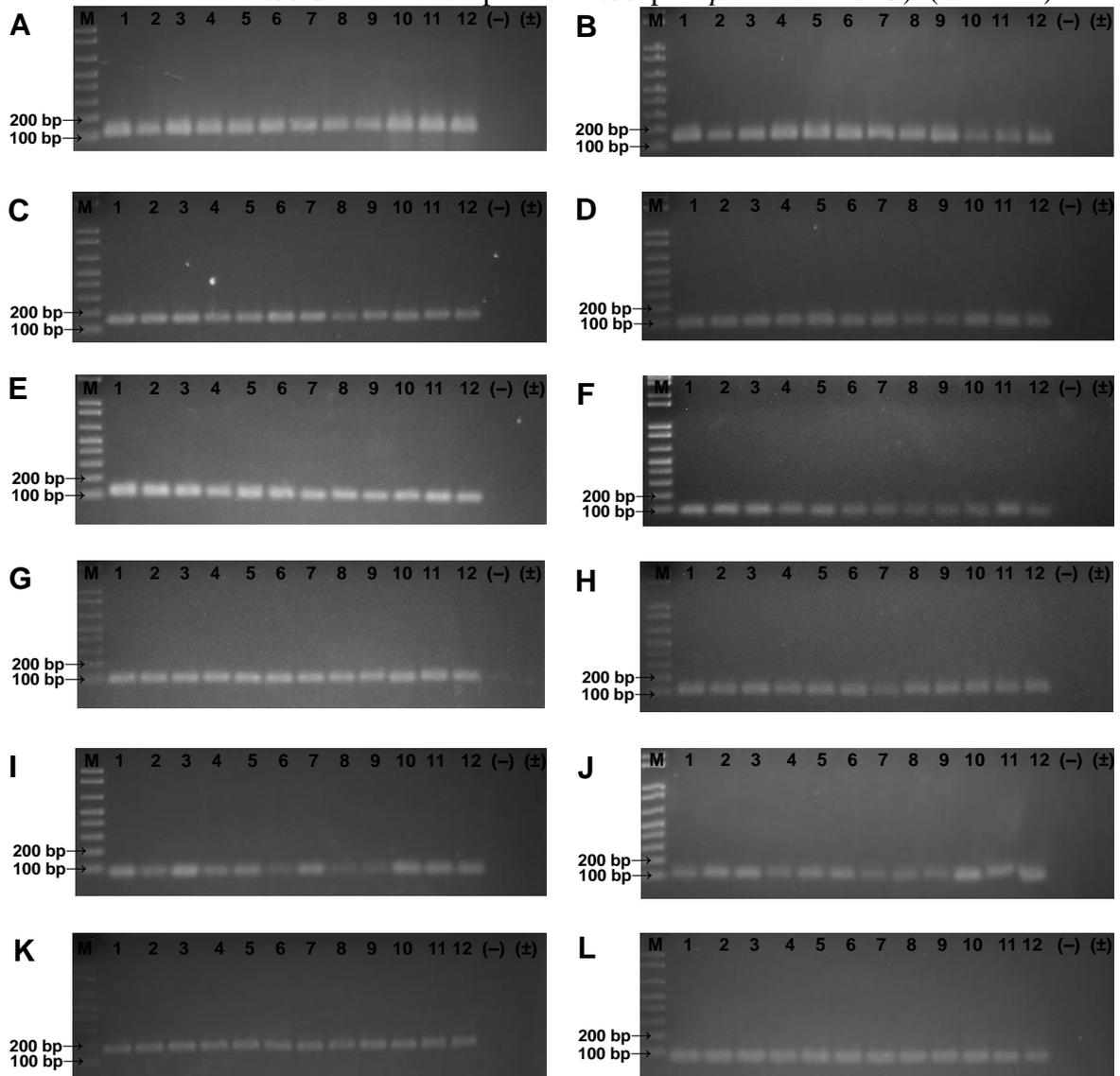
APÊNDICE E — Resultado da amplificação por PCR dos *primers* desenhados para a estirpes CIAT 899 e PRF 81 com amostras do DNA de outras bactérias próximas e distantes com temperatura de anelamento igual a 63 °C, *primers*: **A**- Ciat899G1624, **B**- Ciat899G1624II e **C**- Prf81G534I.



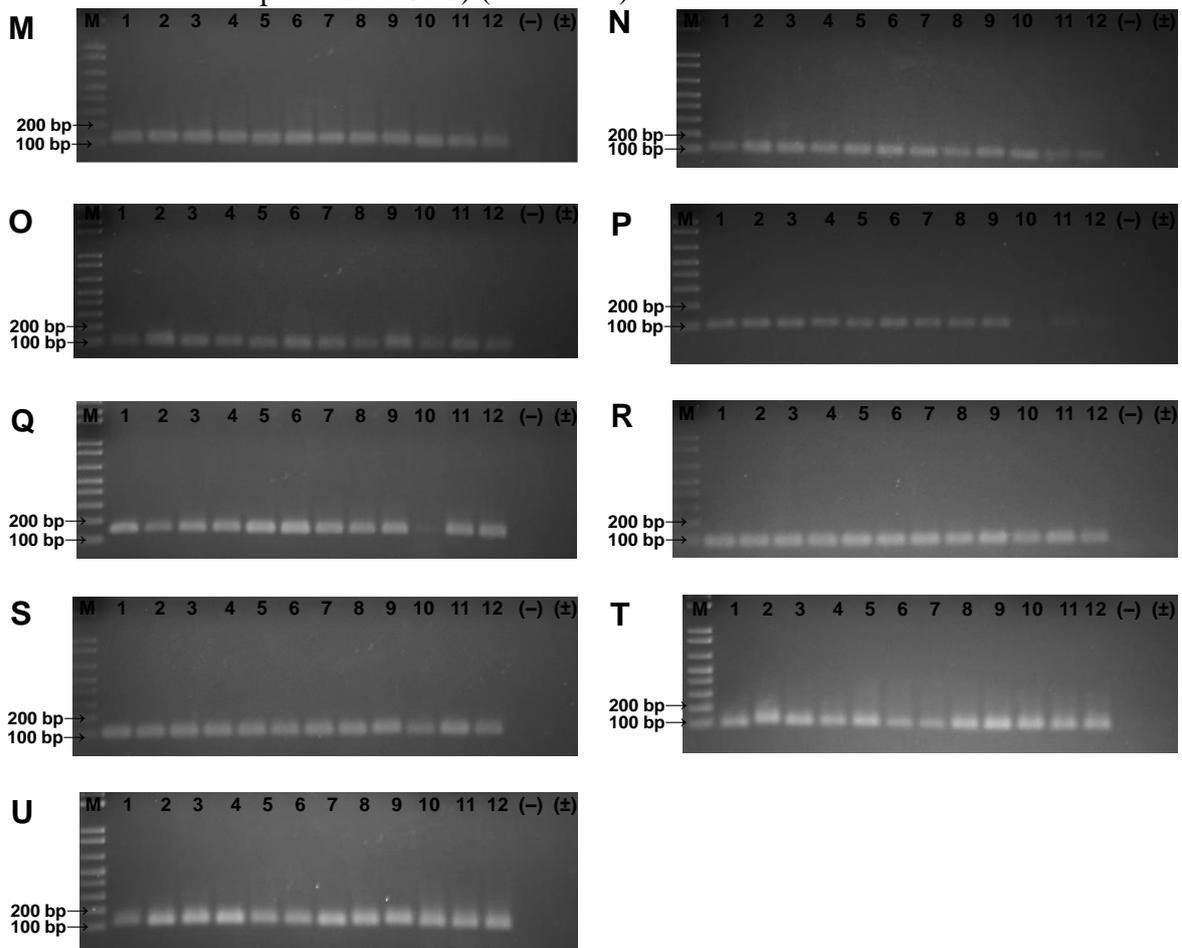
Amostras em **A** e **B**: (+) BR322; 1-BR219; 2-BR225; 3- BR230; 4-BR249; 5- BR252; 6- BR256; 7- BR272; 8- BR275; 9- BR312; 10- BR313; 11- BR314; 12- BR315; 13-BR317; 14- BR318; 15- BR317; 16- BR362; 17- BR364; 18- BR367; 19- BR534; 20- BR295; 21- BR298; 22- BR920; 23- (-); Amostras em **C**: (+) BR520; 1- BR 322; 2- BR219; 3-BR225; 4- BR230; 5-BR249; 6- BR252; 7- BR256; 8- BR272; 9- BR275; 10- BR312; 11- BR313; 12- BR314; 13- BR315; 14-BR317; 15- BR318; 16- BR317; 17- BR362; 18- BR364; 19- BR367; 20- BR534; 21- BR295; 22- BR298; 23- BR920; 24-BR939; 25- (-).

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE F – Produtos dos ensaios de PCR utilizando os *primers*: **A-** Ciat899G139, **B-** Ciat899G144, **C-** Ciat899G166, **D-** Ciat899G882, **E-** Ciat899G1624, **F-** Ciat899G1624I, **G-** Ciat899G1624II, **H-** Ciat899G1624III, **I-** Ciat899G3718, **J-** Ciat899G3722, **K-** Ciat899G3723 e **L-** Prf81G19 com as amostras, Grupo de 1 a 3: amostras de DNA da bactéria alvo adquiridas de três bancos diferentes (1: Embrapa Agrobiologia; 2: Embrapa soja; e 3: FEPAGRO); Grupo de 4 a 6: amostras de DNA isoladas de nodulos contendo a bactéria alvo; Grupo de 7 a 9: triplicatas suspensão colônia bacteriana alvo; e Grupo de 10 a 12: triplicatas extratos nódulos contendo bactérias alvo. M: Marcador molecular 1Kb plus. (-) Controle negativo. (±) Falso positivo (DNA estirpe PRF 81 para *primers* Ciat899G e DNA estirpe CIAT 899 para *primers* Prf81G). (continua)



APÊNDICE F – Produtos dos ensaios de PCR utilizando primers: **M-** Prf81G222II, **N-** Prf81G529, **O-** Prf81G530, **P-** Prf81G530I, **Q-** Prf81G534, **R-** Prf81G534I, **S-** Prf81G546, **T-** Prf81G546I, **U-** Prf81G561 com as amostras, Grupo de 1 a 3: amostras de DNA da bactéria alvo adquiridas de três bancos diferentes (1: Embrapa Agrobiologia; 2: Embrapa soja; e 3: FEPAGRO); Grupo de 4 a 6: amostras de DNA isoladas de nodulos contendo a bactéria alvo; Grupo de 7 a 9: triplicatas suspensão colônia bacteriana alvo; e Grupo de 10 a 12: triplicatas extratos nódulos contendo bactérias alvo. M: Marcador molecular 1Kb plus. (–) Controle negativo. (±) Falso positivo (DNA estirpe PRF 81 para primers Ciat899G e DNA estirpe CIAT 899 para primers Prf81G).(conclusão)



Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE G - Sensibilidade de amplificação na PCR para cada um dos primers Ciat899 e Prf81 utilizando amostras de DNA alvo diluído em serie na proporção de 10 vezes.

| Primer/Estirpe | Massa de DNA alvo (ng) = Número de células detectadas ¹ | | | | | | |
|---------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | 10 ¹ = 10 ⁶ | 10 ⁰ = 10 ⁵ | 10 ⁻¹ = 10 ⁴ | 10 ⁻² = 10 ³ | 10 ⁻³ = 10 ² | 10 ⁻⁴ = 10 ¹ | 10 ⁻⁵ = 10 ⁰ |
| CIAT 899 | | | | | | | |
| Ciat899G1624II F/R | + | + | + | + | + | + | nd |
| Ciat899G3718 F/R | + | + | + | + | + | + | nd |
| Ciat899G3722 F/R | + | + | + | + | + | + | nd |
| Ciat899G3723 F/R | + | + | + | + | + | + | nd |
| Ciat899G1624III F/R | + | + | + | + | + | nd | nd |
| Ciat899G144 F/R | + | + | + | + | + | nd | nd |
| Ciat899G882 F/R | + | + | + | + | + | nd | nd |
| Ciat899G139 F/R | + | + | + | + | nd | nd | nd |
| Ciat899G166 F/R | + | + | + | + | nd | nd | nd |
| Ciat899G1624 F/R | + | + | + | + | nd | nd | nd |
| Ciat899G1624I F/R | + | + | + | nd | nd | nd | nd |
| PRF 81 | | | | | | | |
| Prf81G19 F/R | + | + | + | + | + | nd | nd |
| Prf81G222II F/R | + | + | + | + | + | nd | nd |
| Prf81G546I F/R | + | + | + | + | + | nd | nd |
| Prf81G561 F/R | + | + | + | + | + | nd | nd |
| Prf81G534I F/R | + | + | + | + | + | nd | nd |
| Prf81G529 F/R | + | + | + | + | nd | nd | nd |
| Prf81G530II F/R | + | + | + | + | nd | nd | nd |
| Prf81G546 F/R | + | + | + | + | nd | nd | nd |
| Prf81G530 F/R | + | + | + | nd | nd | nd | nd |
| Prf81G534 F/R | + | + | + | nd | nd | nd | nd |

¹ = [(Massa do DNA alvo (ng) x 6,0221x10²³)/(Tamanho do genoma da estirpe (pb) x 660 x 1x10⁹)]; 6,0221x10²³: constante de Avogadro (moléculas mol⁻¹); 660: Massa média em ng de 1 pb do dsDNA (g mol⁻¹); 1x10⁹: constante usada para transformar a massa do fragmento de DNA amplificado, de grama (g) para nanograma (ng) (ng g⁻¹); +: amplificação do fragmento de DNA alvo; nd: não detectado.

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE H – Ocupação nodular pelas estirpes CIAT 899 e PRF 81 detectadas por três *primers* a partir do extrato de nódulos de três plantas de feijoeiro cultivadas no solo 1. (continua)

| Tratamento | Primer | Planta 1 | | | | | | | | | | A% | B% | C% |
|-------------------------|----------------|----------|----------|---|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| CIAT 899 | Ciat899G139 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | |
| | Ciat899G1624II | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 100 | |
| | Ciat899G3718 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | |
| | Primer | Planta 2 | | | | | | | | | | A% | B% | |
| | Ciat899G139 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | 100 |
| | Ciat899G1624II | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 100 | ± |
| | Ciat899G3718 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | 00 |
| | Primer | Planta 3 | | | | | | | | | | A% | B% | |
| | Ciat899G139 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | |
| | Ciat899G1624II | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 100 | |
| | Ciat899G3718 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | |
| | Tratamento | Primer | Planta 1 | | | | | | | | | | A% | B% |
| CIAT 899 + PRF 81 | Ciat899G139 | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | nd | 80 | | |
| | Ciat899G1624II | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | nd | 80 | 80 | |
| | Ciat899G3718 | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | nd | 80 | | |
| | Primer | Planta 2 | | | | | | | | | | A% | B% | |
| | Ciat899G139 | + | + | + | + | + | + | nd | nd | nd | nd | 60 | | 57 |
| | Ciat899G1624II | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 60 | ± |
| | Ciat899G3718 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | 25 |
| | Primer | Planta 3 | | | | | | | | | | A% | B% | |
| | Ciat899G139 | + | + | + | nd | 30 | | |
| | Ciat899G1624II | + | + | + | nd | 30 | 30 | |
| | Ciat899G3718 | + | + | + | nd | 30 | | |

APÊNDICE H – Ocupação nodular pelas estirpes CIAT 899 e PRF 81 detectadas por três *primers* a partir do extrato de nódulos de três plantas de feijoeiro cultivadas no solo 1. (continua)

| Tratamento | Primer | Planta 1 | | | | | | | | | | A% | B% | C% | | |
|---------------|----------------|----------------|----------|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Não inoculado | Ciat899G139 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | | |
| | Ciat899G1624II | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | 00 | | | |
| | Ciat899G3718 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | | |
| | | Primer | Planta 2 | | | | | | | | | | A% | B% | | |
| | | Ciat899G139 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | 00 |
| | | Ciat899G1624II | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | 00 | | ± |
| | | Ciat899G3718 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | 00 |
| | | | Primer | Planta 3 | | | | | | | | | | A% | B% | |
| | | Ciat899G139 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | |
| | | Ciat899G1624II | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | 00 | | |
| | | Ciat899G3718 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | |

APÊNDICE H – Ocupação nodular pelas estirpes CIAT 899 e PRF 81 detectadas por três *primers* a partir do extrato de nódulos de três plantas de feijoeiro cultivadas no solo 3. (continua)

| Tratamento | Primer | Planta 1 | | | | | | | | | | A% | B% | C% | | | |
|-------------------------|----------------|----------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-----|----|---------------|---------------|----|
| CIAT 899 | Ciat899G139 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | 90 | 90 | 87 ± 06 | | |
| | Ciat899G1624II | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | | | |
| | Ciat899G3718 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | | | |
| | | Primer | Planta 2 | | | | | | | | | | A% | B% | | | |
| | | Ciat899G139 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | nd | | 80 | 80 |
| | | Ciat899G1624II | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | | 90 | |
| | | Ciat899G3718 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | 100 | |
| | | Primer | Planta 3 | | | | | | | | | | A% | B% | | | |
| | | Ciat899G139 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | 90 | | 90 | |
| | Ciat899G1624II | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | | | |
| | Ciat899G3718 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | 90 | | | | |
| Tratamento | Primer | Planta 1 | | | | | | | | | | A% | B% | C% | | | |
| CIAT 899 + PRF 81 | Ciat899G139 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | nd | 80 | 80 | 50 ± 26 | |
| | Ciat899G1624II | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | 90 | | | |
| | Ciat899G3718 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | nd | 80 | | | |
| | | Primer | Planta 2 | | | | | | | | | | A% | B% | | | |
| | | Ciat899G139 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | nd | 40 | | 60 |
| | | Ciat899G1624II | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | 70 | | | |
| | | Ciat899G3718 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | nd | 30 | | | |
| | | Primer | Planta 3 | | | | | | | | | | A% | B% | | | |
| | | Ciat899G139 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 60 | | 40 |
| | Ciat899G1624II | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 40 | | | | |
| | Ciat899G3718 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 60 | | | | |

APÊNDICE H – Ocupação nodular pelas estirpes CIAT 899 e PRF 81 detectadas por três *primers* a partir do extrato de nódulos de três plantas de feijoeiro cultivadas no solo 3. (continua)

| Tratamento | Primer | Planta 1 | | | | | | | | | | A% | B% | C% | |
|---------------|----------------|----------------|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Não inoculado | Ciat899G139 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | |
| | Ciat899G1624II | + | + | nd | 20 | 00 | | |
| | Ciat899G3718 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | |
| | | Primer | Planta 2 | | | | | | | | | | A% | B% | |
| | | Ciat899G139 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | 00 |
| | | Ciat899G1624II | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | 00 | ± |
| | | Ciat899G3718 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | 00 |
| | | Primer | Planta 3 | | | | | | | | | | A% | B% | |
| | | Ciat899G139 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | |
| | | Ciat899G1624II | + | + | nd | 20 | 00 | |
| | | Ciat899G3718 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | |

APÊNDICE H — Ocupação nodular pelas estirpes CIAT 899 e PRF 81 detectadas por três primers a partir do extrato de nódulos de três plantas de feijoeiro cultivadas no solo 3. (continua)

| Tratamento | Primer | Planta 1 | | | | | | | | | | A% | B% | C% | |
|-------------------------|------------|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|----|
| PRF 81 | Prf81G19 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | |
| | Prf81G530 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 100 | |
| | Prf81G546I | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | |
| | Primer | Planta 2 | | | | | | | | | | A% | B% | | |
| | Prf81G19 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | 90 |
| | Prf81G530 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | nd | 80 | 80 | ± |
| | Prf81G546I | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | nd | 80 | | 10 |
| | Primer | Planta 3 | | | | | | | | | | A% | B% | | |
| | Prf81G19 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | | |
| Prf81G530 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 | 90 | | |
| Prf81G546I | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | nd | 90 | | | |
| Tratamento | Primer | Planta 1 | | | | | | | | | | A% | B% | C% | |
| CIAT 899 + PRF 81 | Prf81G19 | + | + | + | + | + | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 50 | | |
| | Prf81G530 | + | + | + | + | + | + | + | nd | nd | nd | 70 | 50 | | |
| | Prf81G546I | + | + | + | + | + | + | nd | nd | nd | nd | 60 | | | |
| | Primer | Planta 2 | | | | | | | | | | A% | B% | | |
| | Prf81G19 | + | + | nd | 20 | | 27 |
| | Prf81G530 | + | + | nd | 20 | 20 | ± |
| | Prf81G546I | + | + | nd | 20 | | 21 |
| | Primer | Planta 3 | | | | | | | | | | A% | B% | | |
| | Prf81G19 | + | + | + | + | nd | 40 | | |
| Prf81G530 | + | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 10 | 10 | | |
| Prf81G546I | + | + | + | + | nd | 40 | | | |

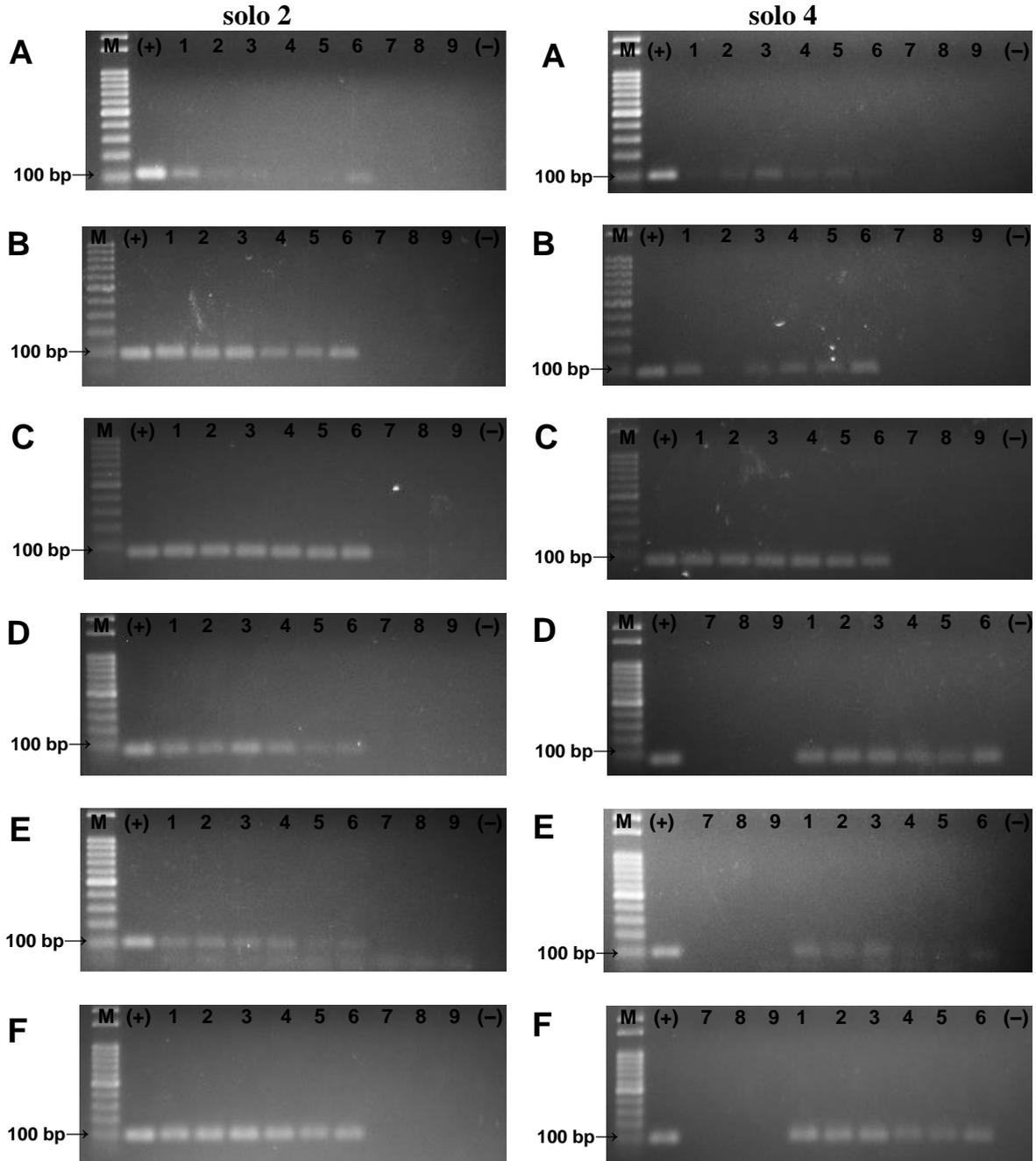
APÊNDICE H – Ocupação nodular pelas estirpes CIAT 899 e PRF 81 detectadas por três *primers* a partir do extrato de nódulos de três plantas de feijoeiro cultivadas no solo 3. (conclusão)

| Tratamento | Primer | Planta 1 | | | | | | | | | | A% | B% | C% | | |
|---------------|------------|------------|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------|----|--|
| Não inoculado | Prf81G19 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | 00 | 00 ± 00 | | |
| | Prf81G530 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | | |
| | Prf81G546I | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | | |
| | | Primer | Planta 2 | | | | | | | | | | A% | | B% | |
| | | Prf81G19 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | |
| | | Prf81G530 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | 00 | |
| | | Prf81G546I | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | 00 | |
| | | Primer | Planta 3 | | | | | | | | | | A% | | B% | |
| | | Prf81G19 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | | |
| | | Prf81G530 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | 00 | |
| | | Prf81G546I | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 00 | | 00 | |

A: Percentual de ocupação nodular observada por cada primers; B: Percentual de ocupação nodular detectadas por todos os primers; C: Percentual de ocupação nodular observado por tratamento; +: amplificação positiva na PCR; nd: não detectado.

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE I – Produtos de PCR das amostras de DNA isolados de raízes do feijoeiro cultivado em solos diferentes e analisadas com os *primers*: **A-** Ciat899G139, **B-** Ciat899G1624II, **C-** Ciat899G3718 para detecção da estirpe CIAT 899 e **D-** Prf81G19, **E-** Prf81G530 e **F-** Prf81G546I para detecção da estirpe PRF 81.



As amostras 1, 2 e 3 nas Figuras A, B e C são repetições do tratamento com a estirpe CIAT 899 e nas Figuras D, E e F são repetições do tratamento com a estirpe PRF 81; as amostras 4, 5 e 6 em todas as Figuras são repetições do tratamento Mix (CIAT 899 e PRF 81); e as amostras 7, 8 e 9 em todas as Figuras são repetições do tratamento não inoculado. (+) Controle positivo (-) controle negativo. M: marcador molecular.

Fonte: Do autor (2022).

CAPÍTULO 3 QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL DAS BACTÉRIAS *RHIZOBIUM TROPICI* ESTIRPE CIAT 899 E *RHIZOBIUM FREIREI* ESTIRPE PRF 81

RESUMO

As bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *R. freirei* PRF 81 são eficazes para nodularem raízes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) promovendo o desenvolvimento vegetal por meio da fixação biológica de nitrogênio. Por isso, são intensamente utilizadas como referências para diversos trabalhos científicos envolvendo a cultura do feijoeiro e/ou seleção de novas estirpes. Visando melhorar a rastreabilidade populacional dessas bactérias adicionadas ao sistema solo/planta, nesse trabalho foram avaliados *primers* estirpe-específico para cada uma delas, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Para validação dos *primers* foram observados parâmetros tais como suas eficiência e sensibilidade de amplificação, seus coeficientes de determinação e suas curvas de dissociação, testando três kits comerciais distintos contendo o corante SYBR[®] Green I. Além disso, três pares de *primers* para cada bactéria alvo foram avaliados quanto a suas capacidades individuais de quantificar as bactérias CIAT 899 e PRF 81, a partir de amostras de DNA isoladas de solo rizosférico e raízes do feijoeiro cultivado em casa de vegetação até o 24^o dia. Como resultados, observou-se que a maioria dos *primers* possui eficiência de amplificação dentro da faixa recomendada, sensibilidade de detecção na ordem de 10¹ fragmentos de DNA alvo na amostra e único pico de amplificação na curva de *melting* ou dissociação. Somado a isso, os *primers* quantificaram, tanto no solo, como na raiz, as estirpes CIAT 899 e PRF 81 individualmente, e as detectou em ensaios de qPCR utilizando extrato de nódulos. Essas análises mostraram que a população das bactérias CIAT 899 e PRF 81 nos tratamentos inoculados aumentou significativamente na raiz, tendeu a reduzir no solo e ocuou mais de 90% dos nódulos avaliados.

Palavras-chave: *Rhizobium tropici*. *Rhizobium freirei*. Ocupação nodular. qPCR.

ABSTRACT

The bacteria *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *R. freirei* PRF 81 are effective in nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots, promoting plant development through biological nitrogen fixation. Therefore, they are used as references for several scientific works involving the bean crop and/or selection of new strains. In order to improve their population traceability when added to the soil/plant system, strain-specific primers were evaluated for each strain using the Real-Time Polymerase Chain Reaction technique. For primer validation, parameters such as amplification efficiency, sensitivity, determination coefficients, and dissociation curves were observed, testing three different commercial kits containing the dye SYBR® Green I. In addition, three primer pairs for each target strain were evaluated for their ability to quantify CIAT 899 and PRF 81 from DNA isolated from rhizospheric soil and roots of common bean cultivated in a greenhouse until the 24th day. As a result, it was observed that most primers have amplification efficiency within the recommended range, detection sensitivity in the order of 10^1 target DNA fragments in the sample, and a single amplification peak in the melting or dissociation curve. In addition, the primers quantified CIAT 899 and PRF 81 in the soil, roots, and nodule extracts. These analyzes showed that the populations of CIAT 899 and PRF 81 increased significantly in the root, tended to reduce in the soil, and occupied more than 90% of the evaluated nodules.

Keywords: *Rhizobium tropici*. *Rhizobium freirei*. Nodular occupation. qPCR.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 e *R. freirei* PRF 81 são rotineiramente utilizadas em diversos estudos envolvendo a promoção do crescimento vegetal do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) ou como modelo para a seleção de novas estirpes (ABOU-SHANAB *et al.*, 2019; CHEKANAI; CHIKOWO; VANLAUWE, 2018; MOREIRA; OLIVEIRA; FERREIRA, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Porém, a espécie *P. vulgaris* da qual as estirpes CIAT 899 e PRF 81 foram isoladas (HUNGRIA *et al.*, 2000; MARTINEZ-ROMERO *et al.*, 1991) e para a qual são recomendadas como inoculante é bastante promíscua (ANDREWS; ANDREWS, 2017). Ou seja, também forma simbiose com outras bactérias nodulantes de diversas espécies dentro e fora do gênero *Rhizobium* sp. (MICHIELS, 1998; TONG *et al.*, 2018; WONG-VILLARREAL; CABALLERO-MELLADO, 2010). Sendo assim, para garantir que a estirpe alvo inoculada está interagindo com a planta de interesse, é preciso fazer a detecção dela *in loco* de forma confiável. Devido a isso, o monitoramento de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) tem sido bastante abordado no meio científico (RILLING *et al.*, 2019).

Tendo em vista a capacidade da espécie *P. vulgaris* ser nodulada por vários biovars em vez de uma ou poucas espécies (SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020) os resultados relacionados a promoção de crescimento vegetal do feijoeiro em função da inoculação com as estirpes elite CIAT 899 e PRF 81 podem ser contestáveis. Além da promiscuidade do feijoeiro, a população de determinada bactéria elite inoculada pode ter seu crescimento limitado devido a soma de diversos fatores inerentes ao sistema solo-planta (DOWLING; BROUGHTON, 1986; MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2021). Como por exemplo, a competição pelos sítios de infecção das raízes de leguminosas entre rizóbios nativos e inoculados (ONISHCHUK; VOROBYOV; PROVOROV, 2017; THIES; SINGLETON; BOHLOOL, 1991) ou problemas relacionados ao pH, salinidade e/ou temperatura do solo (ZHANG *et al.*, 2020). Cabe ressaltar que rizóbios nativos são altamente competitivos (CHECCUCCI *et al.*, 2017). Portanto, tanto em situações nas quais não ocorre resposta por parte da estirpe elite inoculada frente à população nativa (FIGUEIREDO *et al.*, 2016) como naquelas nas quais ocorre esta resposta (NOGUEIRA *et al.*, 2017) é válido um monitoramento de forma segura da estirpe avaliada.

Desde o começo da seleção de rizóbios elite para inoculação em culturas de interesse agrícola, é recorrente a utilização de técnicas de monitoramento (OLIVEIRA *et al.*, 2006; PILLAI *et al.*, 1992; ROLIM *et al.*, 2019; SCHMIDT; BANKOLE; BOHLOOL, 1968;

SELENSKA-POBELL, 1994). Porém, algumas técnicas são trabalhosas ou de baixa reprodutibilidade dos resultados, sendo em sua maioria utilizadas para avaliação da taxa de ocupação nodular (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2021). A maioria das técnicas utilizadas para detecção de rizóbios elites no solo e/ou em plantas leguminosas é semi-quantitativa e derivada da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (AGUILAR *et al.*, 1998; AKIMOVA *et al.*, 2017; PERRET; BROUGHTON, 1998; RICHARDSON *et al.*, 1995; SESSITSCH *et al.*, 1998; SVENNING *et al.*, 2001). Outra técnica também derivada da PCR é PCR em Tempo Real ou quantitativo (qPCR) que pode já ser utilizada para a quantificação da população de rizóbios tanto no solo como em plantas leguminosas (TRABELSI *et al.*, 2009; YUDISTIRA *et al.*, 2021) ou no controle de qualidade de inoculantes (GOULART *et al.*, 2015). A utilização da técnica de qPCR pode ser também uma alternativa para estimar a população de rizóbios no solo (LI *et al.*, 2018), geralmente monitorados por meio de plantas leguminosas iscas submetidas à técnica Número Mais Prováveis (NMP) com auxílio de tabelas estatísticas (FARID *et al.*, 2017).

Assim como na PCR convencional, na qPCR são utilizados *primers* específicos, entretanto, neste caso, para quantificação de determinado organismo alvo (BUSTIN; HUGGETT, 2017). Além disso, na qPCR são utilizadas tampões contendo moléculas repórteres fluorescentes que permitem com maior rapidez e especificidade, monitorar produtos amplificados durante cada ciclo na PCR, em tempo real, descartando a necessidade da utilização de gel de agarose pós-PCR (FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2014). Para ensaios de qPCR existem métodos baseados em moléculas fluorescentes intercalantes do DNA dupla fita (dsDNA), como por exemplo, o SYBR Green I (NAVARRO *et al.*, 2015). Essa tecnologia apresenta como vantagem o menor custo e praticidade (FRAGA *et al.*, 2014; NAVARRO *et al.*, 2015). Porém, a utilização do corante SYBR® Green I proporciona uma análise menos específica do que as demais tecnologias, uma vez que se liga a qualquer dsDNA formado durante o ensaio de qPCR. Apesar disso, é usualmente aplicado nos ensaios de qPCR para quantificação de diversos microrganismos (DE SOUZA GODOI *et al.*, 2017; ILHA *et al.*, 2016; PAULO *et al.*, 2014). Quanto a especificidade na qPCR utilizando corantes intercalantes, ela pode ser certificada por meio de uma curva de dissociação ou de *melting* (LIFE TECHNOLOGIES, 2014; SIGMA-ALDRICH, 2014). Tendo em vista que, se houver ampliações inespecíficas durante o ensaio de qPCR, elas serão detectadas nas temperaturas mais baixas entre 50 a 95 °C, durante a dissociação do SYBR Green I da molécula dsDNA (NAVARRO *et al.*, 2015). A amplificação esperada, carregada por meio de primer específicos, possui uma única curva de dissociação geralmente detectada acima de 80

°C (SIGMA-ALDRICH, 2014). Desse modo, a curva de *melting* está relacionada à especificidade da amplificação carregada pelos *primers* (FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2014).

Os *primers* em si, são sequências de nucleotídeos que norteiam uma região específica no genoma ou gene a ser amplificada na PCR, sendo, portanto, o ponto chave para a técnica (ROBERTSON; WALSH-WELLER, 1998). No Capítulo 2 dessa Tese foram validados *primers* estirpe-específicos para detecção rápida por PCR das estirpes CIAT 899 e PRF 81. Os *primers* para cada uma dessas bactérias tiveram sua especificidade confirmada por exclusividade na PCR convencional onde foram submetidas amostras do DNA de estirpes geneticamente próximas e distantes dos alvos desse estudo. Além disso, as estirpes CIAT 899 e PRF 81 foram detectadas utilizando os seus respectivos *primers*, a partir das raízes e extratos de nódulos de feijoeiro, mostrando elevada taxa de ocupação nodular nos tratamentos inoculados.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi testar e validar *primers* estirpe-específicos para as bactérias CIAT 899 e PRF 81 na qPCR. Além disso, mostrar suas capacidades para a quantificação das estirpes CIAT 899 e PRF 81 a partir das amostras de DNA isoladas individualmente de solo rizosférico e raízes do feijoeiro, bem como utilizá-los para avaliação de ocupação nodular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração de DNA

Para o isolamento de DNA da suspensão bacteriana e das raízes do feijoeiro foi utilizada a metodologia CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987). Para isso, as amostras foram preparadas conforme descrito a seguir. *Suspensão bacteriana*: as bactérias CIAT 899 e PRF 81 foram crescidas em meio 79 líquido (VINCENT, 1970). Uma alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana foi adicionada em microtubos estéreis de 2 mL e centrifugada a 10.000xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento formado (pellet) utilizado para extração de DNA. *Raízes*: essas foram desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 1% (v:v) e enxaguadas por cinco vezes com água destilada estéril e enxugada com papel toalha. O tecido vegetal foi macerado com nitrogênio líquido (-172 °C) em gral com pistilo. Para o isolamento do DNA 250 mg do macerado foram transferidos para microtubo estéril de 2 mL, seguido da adição de 800 µL do tampão CTAB [2% CTAB; 1,42 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH = 8,0; 20 mM EDTA pH = 8,0; 2% PVP; 5 mM ácido ascórbico e 4 mM DIECA] pré-aquecido a 65 °C, o qual foi homogeneizado em agitador do tipo vortex por ~ 5 s. As amostras foram incubadas em banho-maria e, concomitantemente, homogeneizadas por três vezes dentro do período de 15 min. Em seguida, as amostras foram deixadas em bancada até atingirem à temperatura ambiente, seguindo-se a adição de 3 µL de RNase [20 mg mL⁻¹] e 3 µL de Proteinase K [1 mg mL⁻¹] com posterior incubação a 37 °C por 30 min. Após esse período, adicionou-se 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 (CIA) e a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 10.000xg por 10 min. O sobrenadante foi coletado e novamente lavado com o mesmo volume anterior de CIA. Depois foi adicionado isopropanol correspondendo a 70% do volume de sobrenadante recuperado. Após isso, as amostras foram invertidas suavemente por 10 vezes, acomodadas em gelo por 15 min e depois centrifugadas a 10.000xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao pellet formado foram adicionados 500 µL de Etanol 70% (v:v) com posterior centrifugação a 10.000xg por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi posto para secar por 2 h em capela de exaustão com fluxo de ar ligado. O pellet foi reidratado com 100 µL de TE [10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0]. Solo: o solo coletado a partir dos ensaios experimentais desse estudo foi homogeneizado e pesado, obtendo-se amostras de massa igual a 250 mg para o isolamento de DNA total. Para o isolamento de DNA do solo utilizou-se o kit comercial DNeasy® PowerSoil® Kit (QIAGEN) conforme recomendações do fabricante. O rendimento

(ng μL^{-1}) e pureza (A_{260}/A_{280}) das amostras de DNA isoladas foram avaliados por absorvância utilizando o equipamento NanoDrop®. A integridade e a presença de possíveis contaminantes foram avaliados em gel de agarose 1% (m:v) submetido a eletroforese (70 V 60 min^{-1}) em tampão TAE 1x, corado com brometo de etídeo, descorado com água destilada, exposta a luz ultra violeta (UV) e foto-documentado pelo programa KODAK®.

2.2 Condições de PCR em Tempo Real

Os ensaios de qPCR foram conduzidos utilizando *primers* específicos para as bactérias *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 e *R. freirei* estirpe PRF 81 (TABELA 1) desenhados e testados utilizando PCR convencional no trabalho de Da Silva *et al.* (2022). O mix para os ensaios de qPCR foi preparado adicionando 6,5 μL de SYBR® Green, 0,3 μL de cada *primer* a 10 μM , 5,0 μL de DNA molde e água ultrapura para o volume final de 15,0 μL . O mix foi aplicado em placa (*MicroAmp optical 96-well, Applied Biosystems*) de qPCR contendo 96 poços de 0,1 mL cada. As condições de amplificação para cada um dos *primers* na qPCR foram programadas conforme descrito por Da Silva *et al.* (2022) e foram conduzidas no equipamento QuantStudio™ 3 System.

Tabela 1 — *Primers* selecionados utilizando PCR convencional no Capítulo 2 para a amplificação de fragmentos de DNA alvo no genoma das estirpes bacterianas CIAT 899 e PRF 81.

| Primer CIAT 899 | Id gene NCBI | Sequência (5'-3') | pb |
|--|---------------------|--|-----------|
| Ciat899G22 F Ciat899G12 R | RTCIAT899_CH00110 | GATGCTGGTCTGTGATGTCACG CCGCATTGTTGACGAGCAGATC | 101 |
| Ciat899G139 F Ciat899G139 R | RTCIAT899_RS06935 | CAGATCATCGCCAGTTTCGC ACCTAGAATCACATGCTCGTC | 111 |
| Ciat899G144 F Ciat899G144 R | RTCIAT899_RS00715 | CGTCAGCACTGCGAAGATGC CGGCAGGACATGGAAACATCG | 143 |
| Ciat899G166 F Ciat899G166 R | RTCIAT899_RS08285 | CCTTCACTTGCAGATCAAGC CAACGTCATAATGTTCCATCGG | 148 |
| Ciat899G882 F Ciat899G882 R | RTCIAT899_RS04385 | GAAGGTGAAGCCGAATGCG GATGCCGACGATTTTGTTCATCG | 91 |
| Ciat899G1624 F Ciat899G1624 R | RTCIAT899_RS08085 | AGACGAGTTCTTCGACGAGTAG GTTGATGACCTTCTCGGCG | 110 |
| Ciat899G1624I F Ciat899G1624I R | RTCIAT899_RS08085 | CGCACATCTCGCAACAGTTC GTGCAAAGCGTCGCAGGA | 87 |
| Ciat899G1624II F Ciat899G1624II R | RTCIAT899_RS08085 | CGATGCTGTTGCGATGTACG CCGCTTGAGGTAAGACAGG | 97 |
| Ciat899G1624III F Ciat899G1624III R | RTCIAT899_RS08085 | CTTTGGATCGAGGCATGGAC TTCCTGTGTGGAACGTCTCA | 100 |
| Ciat899G3718 F Ciat899G3718 R | RTCIAT899_RS18555 | CCTCTTGTCTGCATGTCAGG GAGAAGGAACTTCCGACAGC | 81 |
| Ciat899G3722 F Ciat899G3722 R | RTCIAT899_RS18575 | CCCAATGATCGGTTACAGGATGC ATCTTGTGCGACCGTCCACG | 96 |
| Ciat899G3723 F Ciat899G3723 R | RTCIAT899_RS18580 | TGTCCCTGGAAGTGGAGAAG ATCACCCCAATATAGGATTCCG | 175 |
| Primer PRF 81 | Id gene NCBI | Sequência (5'-3') | pb |
| Prf81G19 F Prf81G19 R | ENN84927.1 | AGGATATGGCAAAGGCAACACAG GCCGTCAGGTTGACCATGTG | 76 |
| Prf81G62 F Prf81G62 R | WP_004124305.1 | ATGCGAACCAGTTTACCGTC ATCCTGATCGTGGAATAGCG | 115 |
| Prf81G222II F Prf81G222II R | WP_037154253.1 | AGCTCGGTATGTCCTCATCG ACCCGCATCCGACAGTGT | 113 |
| Prf81G529 F Prf81G529 R | ENN85390.1 | CGGAGGAACAAAAGCAGCG GGTCTTAAGGTTGAGGCG | 110 |
| Prf81G530 F Prf81G530 R | WP_004125482.1 | CCCAGTTGAAGGAGGAAGG TCTGGATCGCATCGGAGC | 102 |
| Prf81G530II F Prf81G530II R | WP_004125482.1 | CCTTGCTCGACCATCATG CGGCAGGAAACGCTGCTT | 93 |
| Prf81G534 F Prf81G534 R | WP_004125485.1 | TCGATACCATCGTCCAATCGG CCTGAACCAGCGAAGCGA | 105 |
| Prf81G534I F Prf81G534I R | WP_004125485.1 | ACAATGTCGTCGTCTTCGGTG GAAACAGCGGGTCTTGCC | 98 |
| Prf81G546 F Prf81G546 R | ENN85405.1 | CTCAGGCTCTCCTTCTACG CGATGAAGGTCACAGTTTCG | 148 |
| Prf81G546I F Prf81G546I R | ENN85405.1 | TTGATGAGCTTCGGACTTGC GTCCCAGAAGCATCAAGAGG | 97 |
| Prf81G561 F Prf81G561 R | WP_004125559.1 | GAGGTGGATCTTCTGATCG CTCGGGTAAGTCTCGTATC | 92 |

Fonte: Do autor (2022).

2.3 Plotagem das curvas de calibração

Para a construção das curvas de calibração dos *primers* desenhados para as estirpes CIAT 899 e PRF 81, as amostras de DNA genômico foram padronizadas separadamente, para a concentração de $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (Qubit™). Cada amostra foi diluída em série de 10^0 a 10^{-5} utilizando o fator de diluição igual a 10 vezes para cada etapa. O número de cópias ou fragmentos de DNA alvo para cada um dos pontos da curva de calibração foi determinado considerando o tamanho do genoma de cada uma das bactérias *R. tropici* estirpe CIAT 899 (6,69 Mb) e *R. freirei* estirpe PRF 81 (7,08 Mb) (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012), a massa de DNA genômico empregada, a constante de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$) e o peso molecular do DNA (652 Da/pb). Para os ensaios de qPCR as diluições em série foram aplicadas em triplicatas de 5.0 μL cada. Portanto, as curvas de calibração dos *primers* foram plotadas na faixa entre $10^{6,5}$ a $10^{1,5}$ cópias de DNA alvo correspondente a massa de $2,5 \times 10^7$ e $2,5 \times 10^2$ fg na reação de qPCR, respectivamente. Para os ensaios de qPCR avaliando o desempenho dos *primers* foram testadas três diferentes marcas de mastermix: Sybr Green Fast SYBR™ Green Master Mix (AppliedBiosystems, Cat. N°./ID: 4385612), GoTaq® qPCR (Promega, Cat. N°./ID: A6002) e QuantiTect SYBR® Green PCR Kits (Qiagen, Cat. N°./ID: 204143). Como principais critérios para a seleção dos *primers*, considerou-se a eficiência de amplificação (E) determinada pela Equação (1), o coeficiente de determinação (R^2) da equação (y), o limite de detecção (LoD) e a curva de dissociação ou *melting*. O LoD dos *primers* foram estabelecidos com base em 20 repetições em ensaios de qPCR utilizando a amostra de DNA alvo mais diluídas da curva de calibração conforme recomendações de Kralik e Ricchi (2017).

$$E = (10^{-\frac{1}{s}} - 1) * 100 \quad (1)$$

Onde E é a eficiência de amplificação (%), s é representado pelo valor da inclinação da curva de calibração ou uma equação de regressão linear (y) que representa a concentração logarítmica do DNA padrão versus o valor de Ct (número de ciclos no ensaio de qPCR para atingir o limiar de fluorescência).

2.4 Experimentos para validação dos *primers* na qPCR

2.4.1 Suspensões bacterianas adicionadas no solo e raízes maceradas de feijoeiro

Para esse ensaio utilizou-se os *primers* Ciat899G144, Ciat899G1624II e Ciat899G3718 para a estirpe CIAT 899 e os Prf81G19, Prf81G222II e Prf81G561 para a estirpe PRF 81 (TABELA 1). E, os meios de cultivos contendo as estirpes CIAT 899 e PRF 81 separadamente, na concentração inicial de $8,91 \times 10^9$ e $3,67 \times 10^9$ UFC mL⁻¹, respectivamente. Cada meio de cultivo foi diluído de forma decimal em série de 10^0 a 10^{-7} vezes. Alíquotas de 100 µL, de cada diluição, para cada uma das bactérias, foram adicionadas separadamente, em microtubos de 2,0 mL contendo 250 mg de solo ou raízes maceradas de feijoeiro, cultivado em solução nutritiva de Norris estéril (Capítulo 2, **Subitem 2.5**). As amostras foram incubadas por 5 h em temperatura ambiente e posteriormente submetidas à extração de DNA conforme descrito anteriormente (Capítulo 2, **Subitem 2.1**) para cada uma das matrizes.

2.4.2 Experimento em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação utilizando vasos de volume igual a 0,3 mL preenchidos com Argissolo (TABELA 2), corrigido com calcário e adubado na semeadura com superfosfato triplo conforme recomendações de Portz *et al.* (2013) para a cultura do feijoeiro. O experimento foi montado com feijão-comum tipo Carioca variedade Pérola, submetido aos seguintes tratamentos: inoculado com a estirpe CIAT 899, inoculado com a estirpe PRF 81, inoculado com o mix (CIAT 899 e PRF 81) 1:1 (v:v), e sem inoculação. As sementes utilizadas nos tratamentos inoculados foram lavadas com água corrente, enxaguadas e imersas em água destilada por 15 min. Em seguida, as sementes foram imersas por 30 min em inoculante líquido (10^9 UFC mL⁻¹). Foram semeadas três sementes por vaso, para o total de 30 repetições por tratamento, divididas em três grupos de 10 vasos, arranjados em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em casa de vegetação. Todas as plantas receberam volume igual de água filtrada conforme o estágio de desenvolvimento. Após a germinação foram realizadas coletas destrutivas aos 3°, 6°, 9°, 12° e 15° dia. Para extração de DNA coletou-se amostras compostas de solo rizosférico e raiz de três e duas plantas, no 3° e 6° e 9° e 12° dia, respectivamente. A partir do 15° dia utilizou-se solo

rizosférico e raiz de apenas uma planta para extração de DNA, que foi isolado conforme descrito anteriormente. Para esse ensaio experimental utilizou-se a trinca de *primers* Ciat899G139, Ciat899G1624II e Ciat899G3722, e Prf81G19, Prf81G546I e Prf81G561, para as estirpes CIAT 899 e PRF 81, respectivamente. Além desses, utilizou-se os *primers* 1055yF 5'-ATGGYTGTCGTCAGCT-3' (RITALAHTI *et al.*, 2006) e 1392R: 5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3' (LANE, 1991) para quantificação do número total de cópias do gene 16S rRNA.

Tabela 2 — Resultado da análise química e microbiológica dos solos utilizados no experimento desse trabalho.

| Solo | pH und | Al $\text{cmol}_c\text{dm}^{-1}$ | H+Al | Ca+Mg | K mg L^{-1} | P | C % | N | SB¹ | CEC² | BS³ % | Rizóbios nativos (CFU g⁻¹ Solo)⁴ |
|-------------|------------------|--|-------------|--------------|--|-------------------|---------------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|---|
| Argissolo | 5,65 | 0,00 | 4,60 | 5,62 | 278,13 | 136,18 | 1,43 | 0,14 | 6,33 | 10,59 | 59,78 | $9,04 \times 10^5$ |

¹ Soma de Bases; ² Capacidade de troca de cátions; ³ Saturação de Bases = $((K+Ca+Mg)/T_{cec}) \times 100$, onde $T_{cec} = K+Ca+Mg+$ acidez total em pH 7,0 (H+Al); ⁴ Estimado pelo método Número Mais Provável (NMP) (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994) usando como planta isca feijão-comum tipo Carioca variedade Pérola. Média de três repetições ($n = 3$).

Fonte: Do autor (2022).

Quantificação das estirpes CIAT 899 e PRF 81 utilizando qPCR

Para quantificação na qPCR de cada população das bactérias CIAT 899 e PRF 81, as amostras de DNA isolado das raízes e solo, foram padronizadas para a concentração de 10 e 5 ng μL^{-1} , respectivamente. Ao mix para qPCR descrito anteriormente (**Subitem 2.2**) adicionou-se 5 μL de cada amostra padronizada, que foram avaliadas em triplicatas técnicas. O número de cópias das bactérias alvo nas amostras foi definido conforme a curva padrão de cada *primers* utilizado na qPCR. Posteriormente, o número de cópias ou células bacterianas quantificadas na qPCR foi extrapolado para 1,0 g de matriz (raiz ou solo) utilizando a Equação 2 (ILHA *et al.*, 2016).

$$Nc = (A * B * C)/(D * E) \quad (2)$$

Onde, Nc é a quantidade de fragmentos alvo ou número de células g^{-1} ; A é o número de fragmentos alvo ou células observadas para média do valor Ct na qPCR; B é a concentração de DNA genômico isolado para cada amostra ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$); C é o volume de DNA extraído em μL ; D é a massa de DNA total empregado no ensaio de qPCR (ng); e E é a massa de matriz utilizada para extração de DNA total (g).

2.5 Avaliação da ocupação nodular utilizando qPCR

Ensaio piloto: para a avaliação da ocupação nodular utilizando a técnica de qPCR, realizou-se um ensaio piloto utilizando o extrato de nódulos coletados de plantas de feijoeiro inoculadas separadamente com as estirpes CIAT 899 e PRF 81 e cultivadas em solução de Norris (Capítulo 2, **Subitem 2.5**). Três concentrações diferentes dos extratos de nódulos foram utilizadas para cada uma das estirpes, a saber, densidade óptica $(DO)_{560\text{nm}}$ 0,12; 0,65 e 1,56 para CIAT 899 e 0,15; 0,44 e 1,32 para PRF 81. Esses extratos foram preparados em três volumes (0,5; 1,0 e 1,5 μL para 4,5; 4,0 e 3,5 μL de água ultrapura), os quais foram utilizados nos ensaios de qPCR montados conforme descrito anteriormente. Para os ensaios de qPCR foram utilizados os *primers* Ciat899G139 e Prf81G19 para as estirpes CIAT 899 e PRF 81, respectivamente. Conforme a DO e o volume dos extratos de nódulos que proporcionaram melhor resultado no ensaio de qPCR, realizou-se a avaliação de ocupação nodular para plantas de feijoeiro do experimento em casa de vegetação citado anteriormente (**Subitem 2.4.2**) para plantas coletadas no 24º dia após o semeio. Para isso, foram coletados no total 120 nódulos de plantas dos quatro tratamentos, sendo 10 nódulos coletados aleatoriamente por

planta ($n = 3$) dentro de cada tratamento. Em seguida os nódulos foram desinfestados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 0,5 % (v:v) por 5 min e enxaguados com água destilada por cinco vezes e macerados em microtubo de 0,5 mL contendo 90 μ L de água ultrapura. Além da avaliação de ocupação nodular avaliou-se também o número de nódulos formados nas raízes. A eficiência de ocupação nodular ou competitividade de cada estirpe alvo desse estudo foi calculada conforme a Equação 3 (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2020).

$$CI = (Na/Nt) * 100 \quad (3)$$

Onde, CI é competitividade, Na é o número de nódulos ocupados com a estirpe alvo e Nt é o número de nódulos total avaliados por planta.

2.6 Estatística

Os dados adquiridos pelas quantificações realizadas na qPCR foram logaritmizados e analisados quanto à distribuição normal pelo teste Shapiro-Wilk, homocedasticidade global dos dados e submetidos à análise de regressão para nível de significância ($p < 0,05$) utilizando o programa R (R CORE TEAM, 2021). Outra parte dos dados foi submetida à análise de variância e ao teste de médias Duncan, todos com $p < 0,05$, utilizando o programa estatístico SISVAR® (Lavras, Brasil) versão 5.6 (FERREIRA 2014).

3 RESULTADOS

3.1 Curvas de calibração, limite de detecção e curvas de *melting*

Os *primers* selecionados de forma específica utilizando PCR convencional para cada uma das estirpes CIAT 899 e PRF 81 (TABELA 1), no Capítulo 2 dessa Tese, tiveram suas concentrações ajustadas, visando evitar a formação de dímeros de *primers* nos ensaios de qPCR. Porém, foram mantidas as temperaturas de anelamento definidas no Capítulo 2, sendo alterado apenas o tempo de anelamento conforme os kits mastermix SYBR® Green I utilizados no presente estudo. Esses reagentes adquiridos dos fornecedores Applied, Promega e Qiagen foram utilizados separadamente na plotagem de curvas de calibração, seguida por outra curva de calibração média dos três mastermix avaliados, para cada um dos pares de *primer* das estirpes CIAT 899 (FIGURA 1) e PRF 81 (FIGURA 2). Observou-se que o valor do Ct nas reações de qPCR não sofreu grande alteração conforme o mastermix SYBR® Green I utilizado. Porém, um maior desvio padrão pode ser observado na curva de calibração média para os *primers* Prf81G530 (FIGURA 2H). Entretanto, individualmente, dentro dos ensaios individuais para cada master mix, observa-se que o desvio padrão para as repetições ficou abaixo de 1,0 (TABELA 3). Vale ressaltar que, o mastermix SYBR® Green I do fornecedor Qiagen apresentou os melhores parâmetros obtidos para validação dos *primers* nos ensaios de qPCR, como pode ser observado nas Figuras 1 e 2 e Tabela 3.

A partir das equações que representam as curvas de calibração (y) foi possível determinar para cada um dos *primers* o coeficiente de determinação (R^2) e eficiência de amplificação (E) (FIGURAS 1 e 2). Ao final dos ensaios de qPCR observou-se também para cada um dos *primers* seu limite de detecção (LoD), suas curvas (FIGURAS 3 e 4) e temperaturas de *melting* (T_m) (TABELA 3).

Figura 1 – Curvas de calibração geradas a partir de três master mixes SYBR® Green I diferentes para os *primers* projetados para CIAT 899, **A** e **B**- Ciat899G139, **C** e **D**- Ciat899G144, **E** e **F**- Ciat899G1624, **G** e **H**- Ciat899G1624II, **I** e **J**- Ciat899G1624III, **K** e **L**- Ciat899G3718, e **M** e **N**- Ciat899G3722. Resultante de valores médios observados para três curvas com diferentes ensaios de qPCR ($n = 3$). (continua)

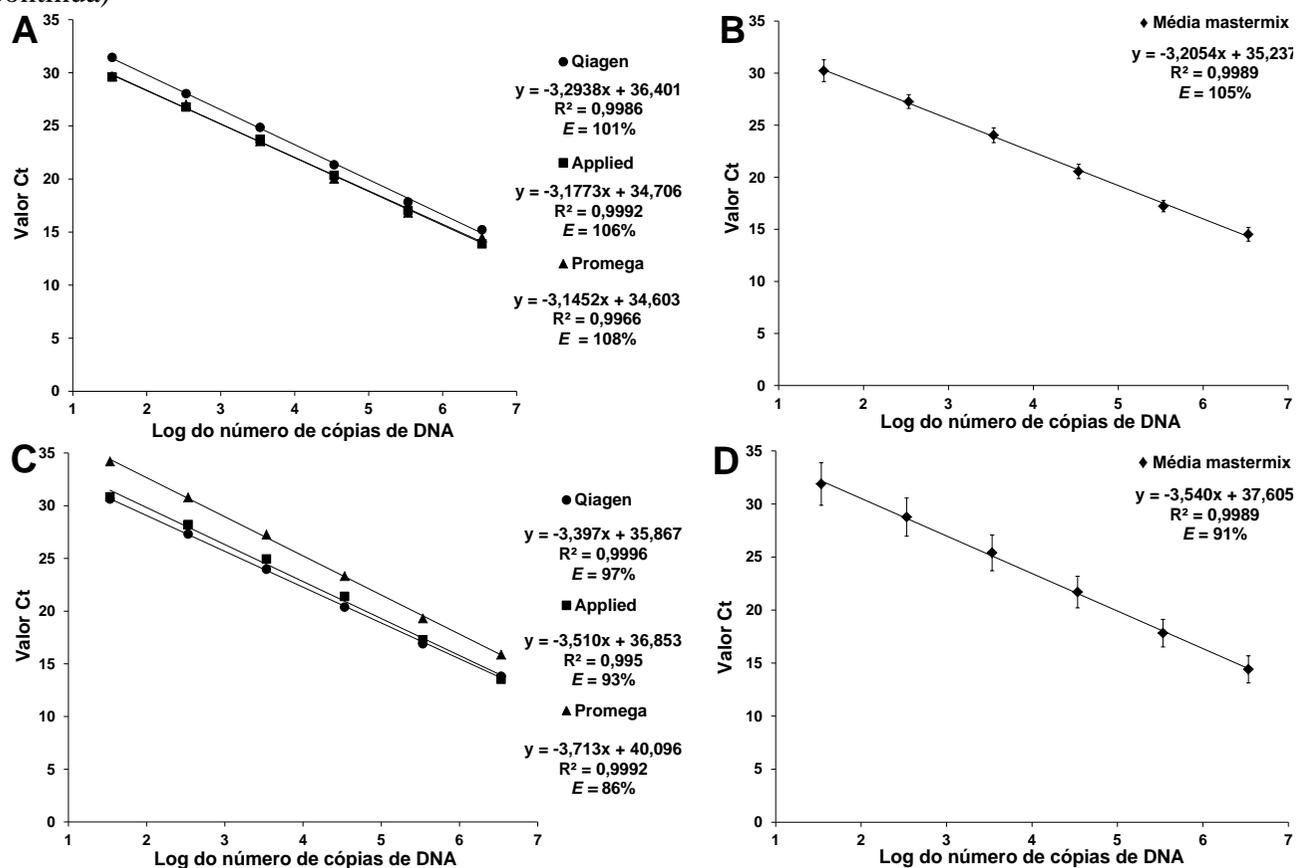


Figura 1 – Curvas de calibração geradas a partir de três master mixes SYBR® Green I diferentes para os *primers* projetados para CIAT 899, **A** e **B**- Ciat899G139, **C** e **D**- Ciat899G144, **E** e **F**- Ciat899G1624, **G** e **H**- Ciat899G1624II, **I** e **J**- Ciat899G1624III, **K** e **L**- Ciat899G3718, e **M** e **N**- Ciat899G3722. Resultante de valores médios observados para três curvas com diferentes ensaios de qPCR ($n = 3$). (continua)

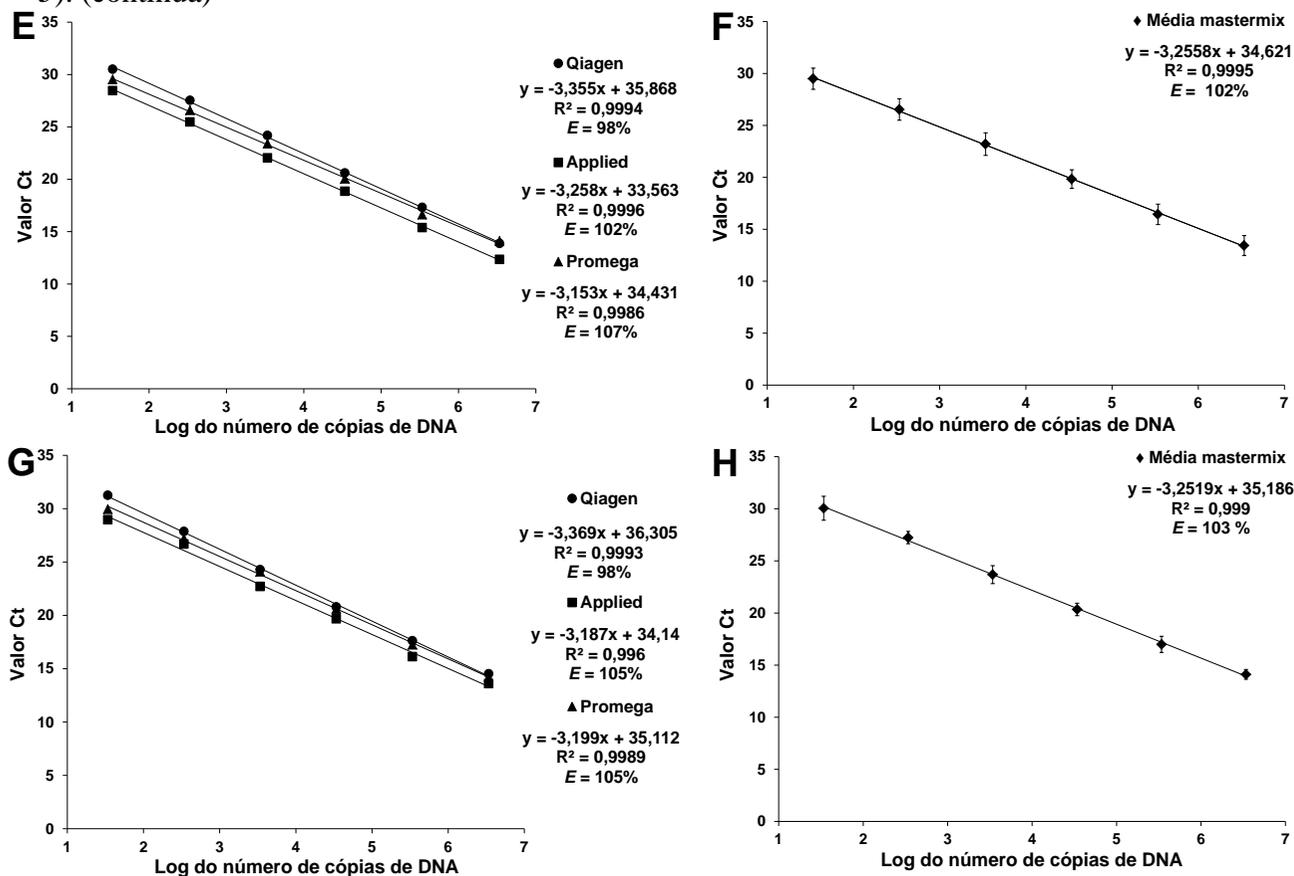


Figura 1 – Curvas de calibração geradas a partir de três master mixes SYBR® Green I diferentes para os *primers* projetados para CIAT 899, **A** e **B**- Ciat899G139, **C** e **D**- Ciat899G144, **E** e **F**- Ciat899G1624, **G** e **H**- Ciat899G1624II, **I** e **J**- Ciat899G1624III, **K** e **L**- Ciat899G3718, e **M** e **N**- Ciat899G3722. Resultante de valores médios observados para três curvas com diferentes ensaios de qPCR ($n = 3$). (continua)

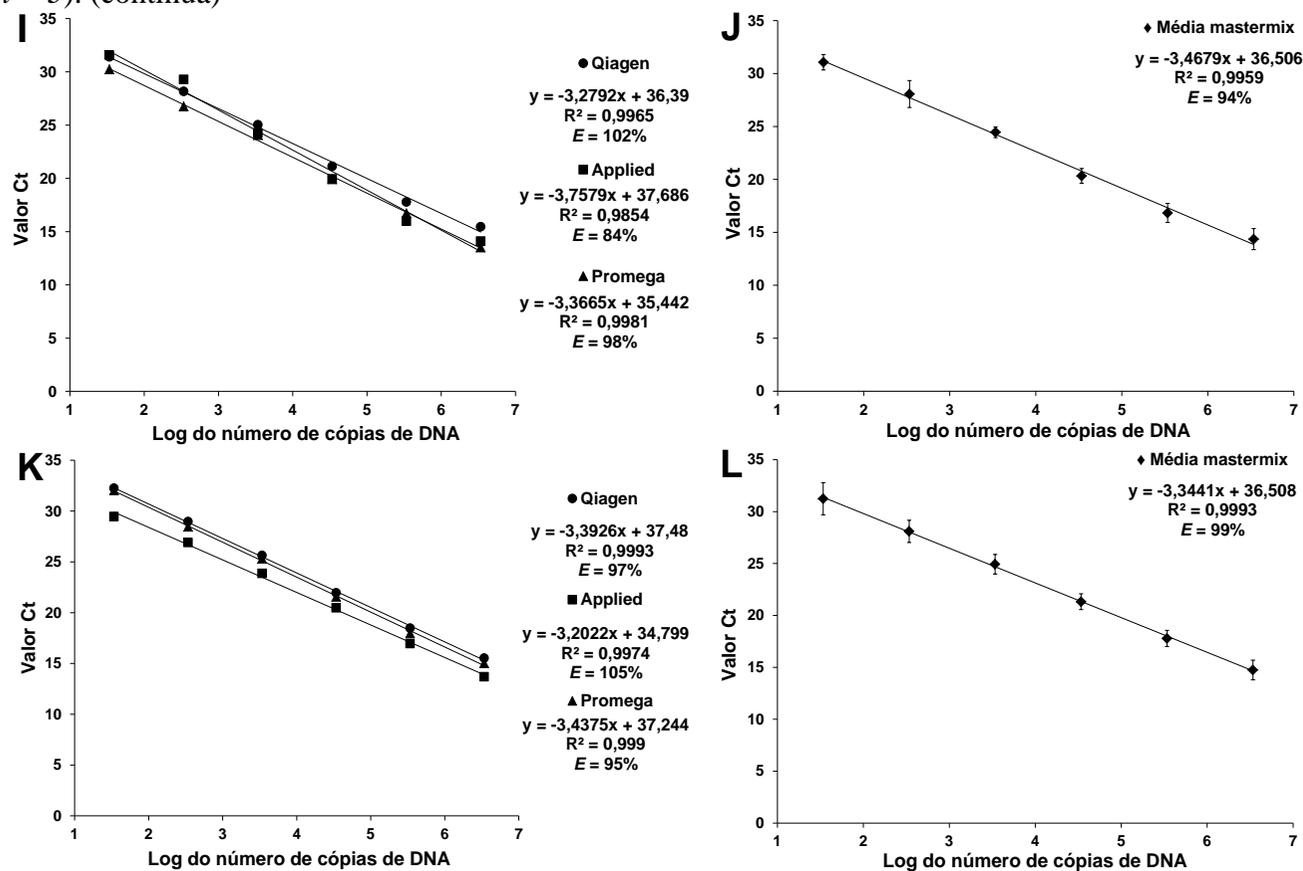
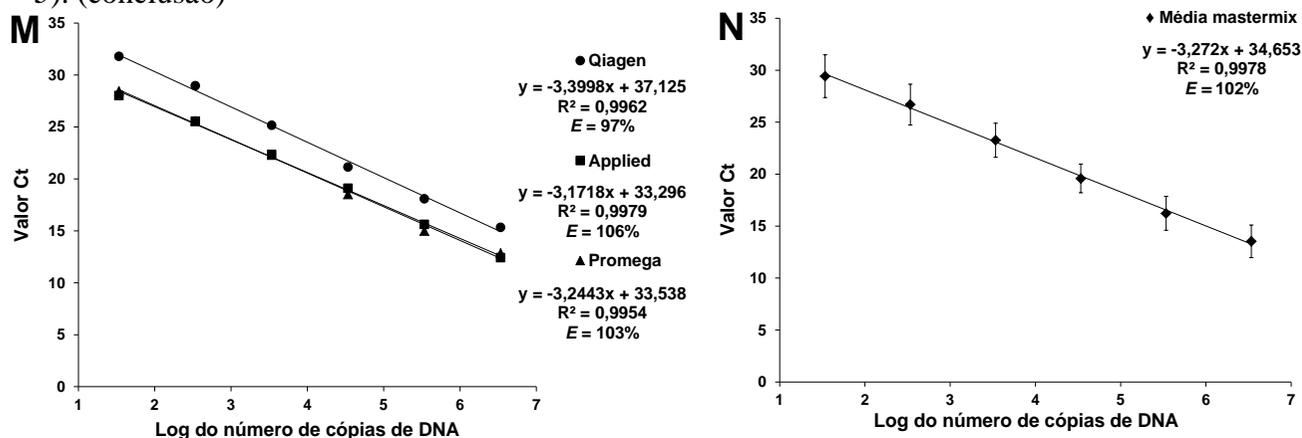


Figura 1 – Curvas de calibração geradas a partir de três master mixes SYBR® Green I diferentes para os *primers* projetados para CIAT 899, **A** e **B**- Ciat899G139, **C** e **D**- Ciat899G144, **E** e **F**- Ciat899G1624, **G** e **H**- Ciat899G1624II, **I** e **J**- Ciat899G1624III, **K** e **L**- Ciat899G3718, e **M** e **N**- Ciat899G3722. Resultante de valores médios observados para três curvas com diferentes ensaios de qPCR ($n = 3$). (conclusão)



Fonte: Do autor (2022).

Figura 2 — Curvas de calibração geradas a partir de três master mixes SYBR® Green I diferentes para os *primers* projetados para PRF 81, **A** e **B**- Prf81G19, **C** e **D**- Prf81G222II, **E** e **F**- Prf81G529, **G** e **H**- Prf81G530, **I** e **J**- Prf81G534I, **K** e **L**- Prf81G546I, e **M** e **N**- Prf81G561 resultante de valores médios observados para três curvas com diferentes ensaios de qPCR ($n = 3$). (continua)

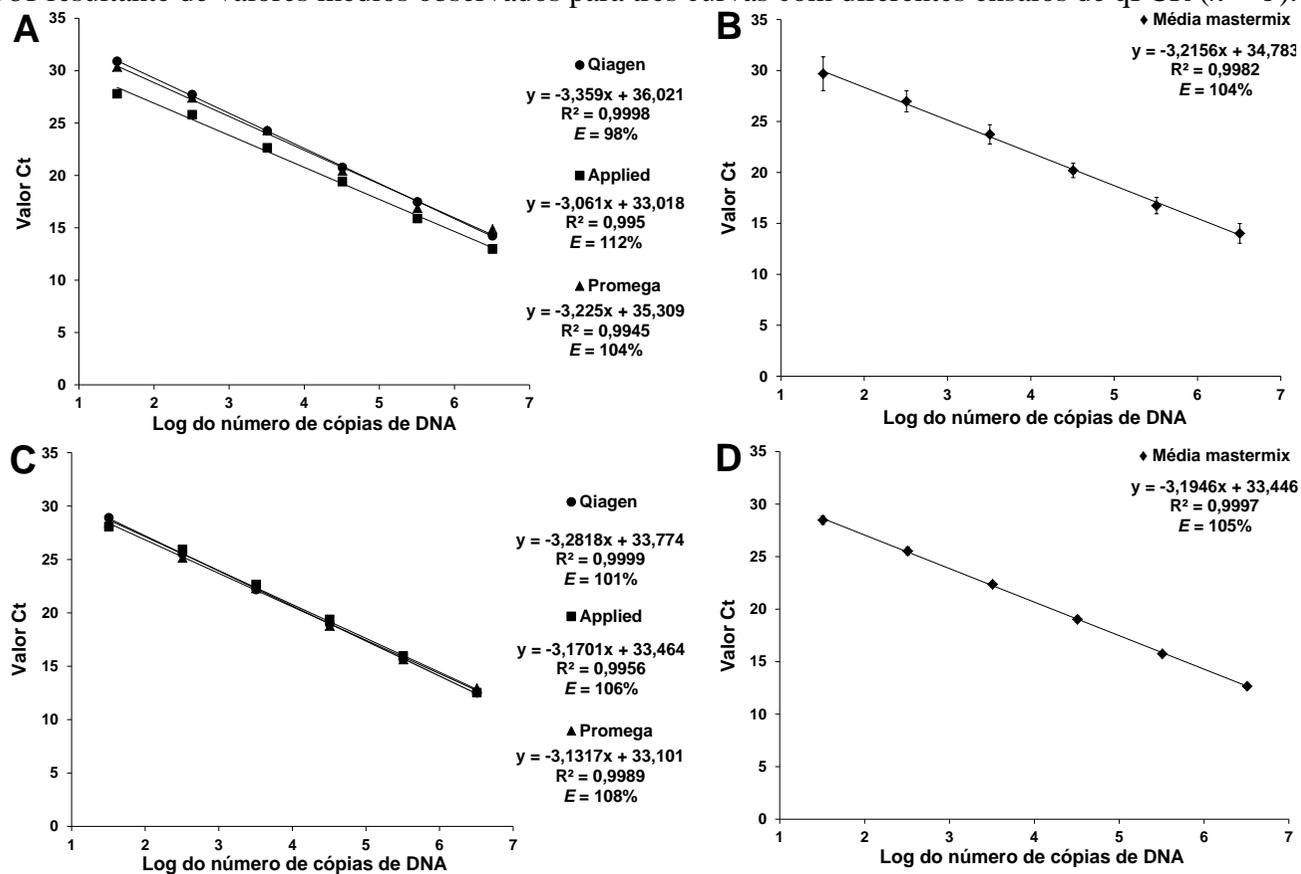


Figura 2 — Curvas de calibração geradas a partir de três master mixes SYBR® Green I diferentes para os *primers* projetados para PRF 81, **A** e **B**- Prf81G19, **C** e **D**- Prf81G222II, **E** e **F**- Prf81G529, **G** e **H**- Prf81G530, **I** e **J**- Prf81G534I, **K** e **L**- Prf81G546I, e **M** e **N**- Prf81G561 resultante de valores médios observados para três curvas com diferentes ensaios de qPCR ($n = 3$). (continua)

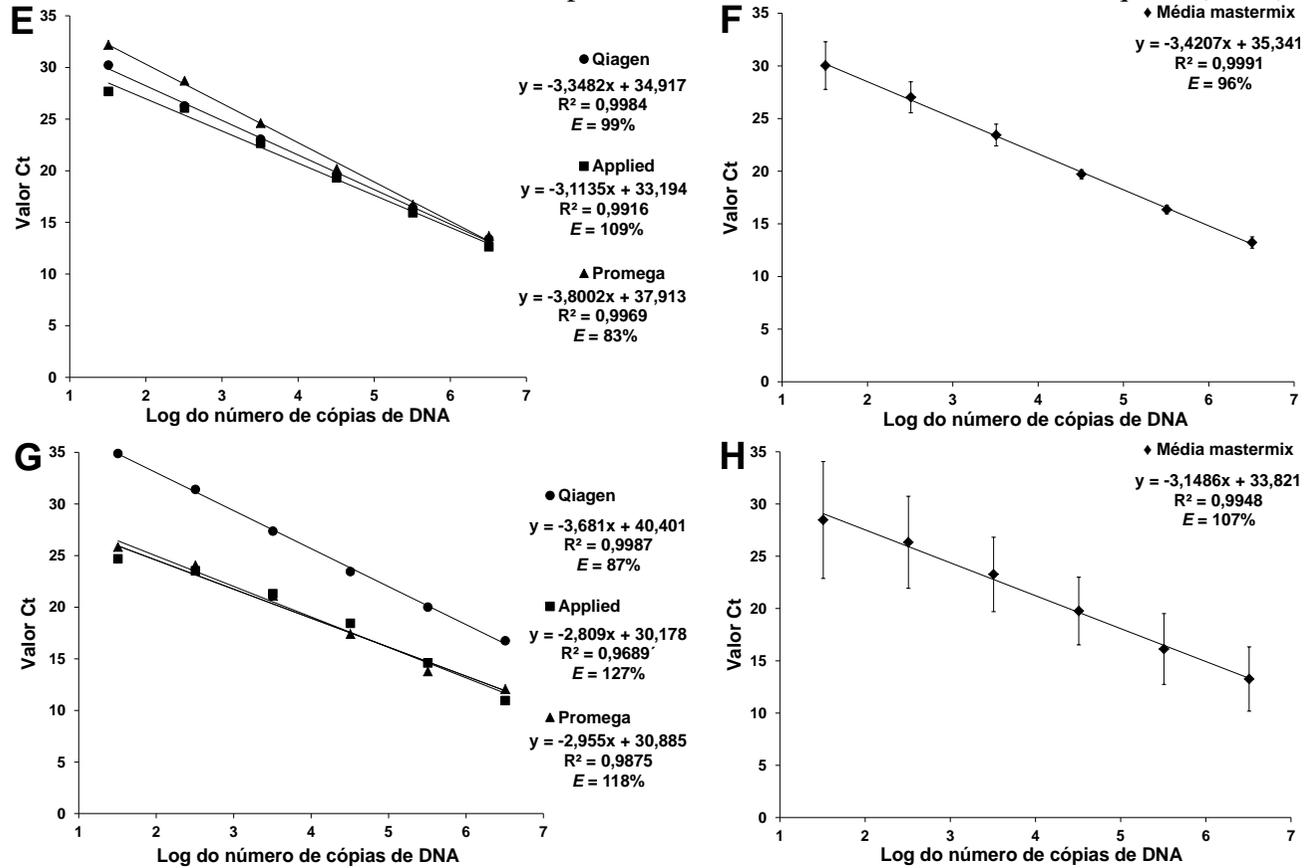


Figura 2 — Curvas de calibração geradas a partir de três master mixes SYBR® Green I diferentes para os *primers* projetados para PRF 81, **A e B-** Prf81G19, **C e D-** Prf81G222II, **E e F-** Prf81G529, **G e H-** Prf81G530, **I e J-** Prf81G534I, **K e L-** Prf81G546I, e **M e N-** Prf81G561 resultante de valores médios observados para três curvas com diferentes ensaios de qPCR ($n = 3$). (continua)

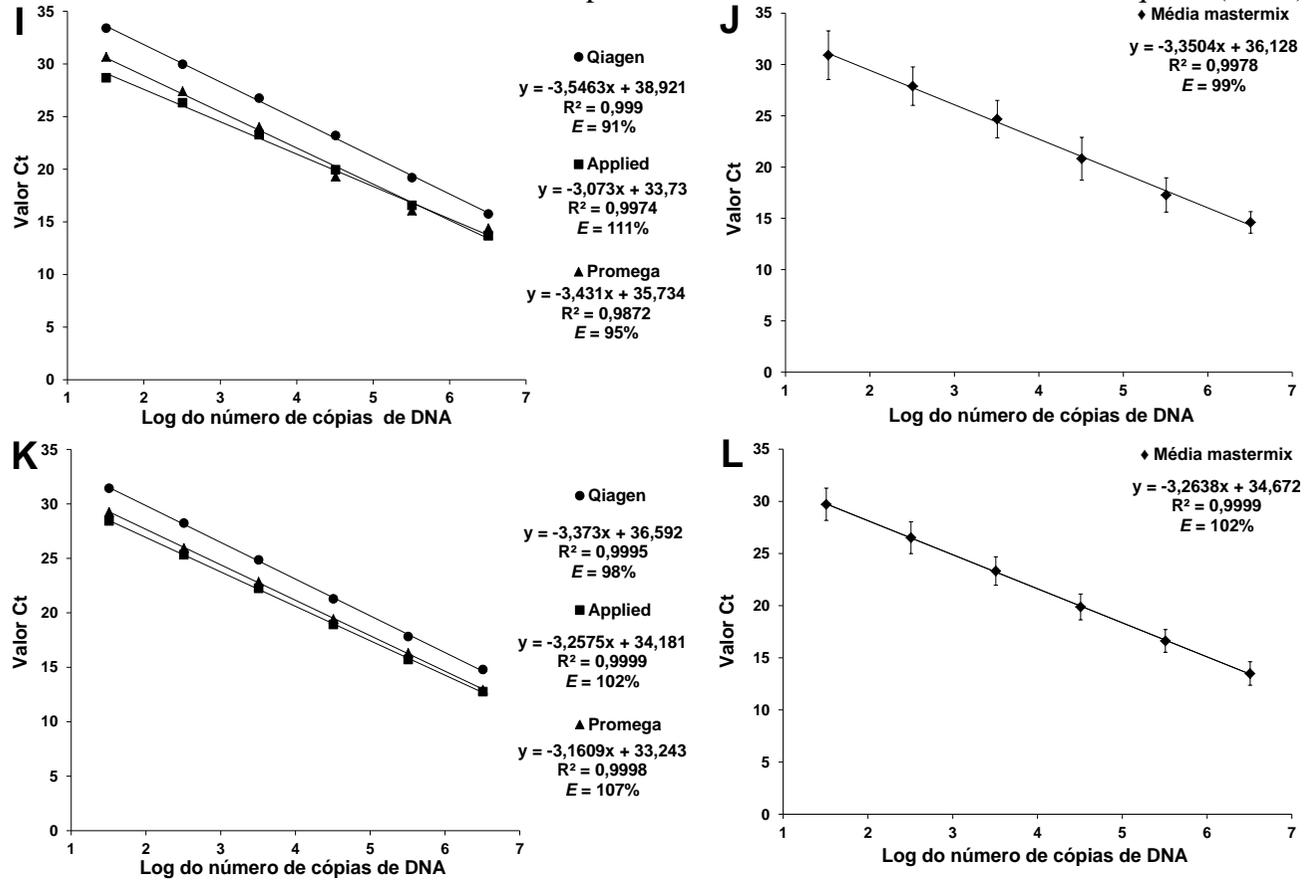
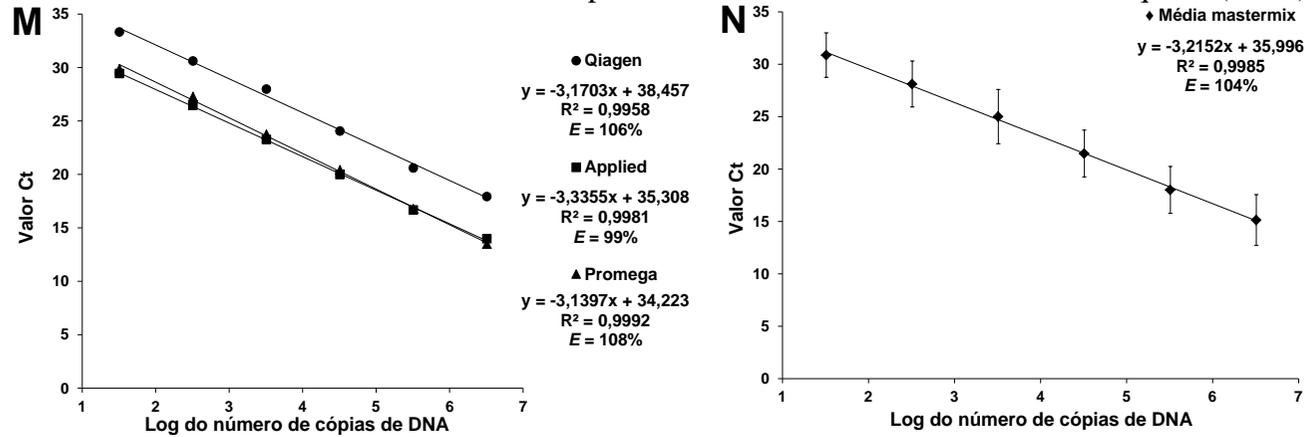


Figura 2 — Curvas de calibração geradas a partir de três master mixes SYBR® Green I diferentes para os *primers* projetados para PRF 81, **A e B-** Prf81G19, **C e D-** Prf81G222II, **E e F-** Prf81G529, **G e H-** Prf81G530, **I e J-** Prf81G534I, **K e L-** Prf81G546I, e **M e N-** Prf81G561 resultante de valores médios observados para três curvas com diferentes ensaios de qPCR ($n = 3$). (conclusão)



Fonte: Do autor (2022).

A partir das equações geradas pelas curvas de calibração observou-se que o valor do R^2 para todos os *primers* foi em média acima de 0,99, reflexo dos valores R^2 individuais para cada uma das curvas geradas em função dos diferentes master mixes avaliados (FIGURAS 1 e 2). Quanto a E média, observou-se que houve variação entre 91% a 105% e 96% a 107% para os *primers* desenhados para a estirpe CIAT 899 e PRF 81, respectivamente (FIGURAS 1 e 2).

Observou-se também que todos os *primers* mostraram LoD para mais de 95% das 20 amostras testadas contendo $2,5 \times 10^2$ fg de DNA genômico. Essa massa de DNA é equivalente a 32 e 34 cópias de fragmentos de DNA alvo quantificados em ensaios de qPCR para as estirpes CIAT 899 e PRF 81, respectivamente (TABELA 3). Além disso, independente do par de *primer* avaliado, para os três mastermix SYBR® Green I testados houve a predominância de apenas uma temperatura de *melting* (T_m1) (TABELA 3). Para alguns ensaios de qPCR e determinados mastermix SYBR® Green I, verificou-se mais de um valor T_m para as últimas diluições, indicando uma possível formação de dímeros de primers. Entretanto, o valor de T_m1 na diluição ($10^{-5} = 0,00025$ ng) apresenta-se maior que os demais (T_m2 e T_m3) e igual ou próximo ao das diluições anteriores, indicando a amplificação do fragmento de DNA alvo (TABELA 3).

Tabela 3 – Limite de detecção, threshold cycle (Ct) médio e temperatura de *melting* (Tm) dos *primers* desenhados para as estirpes CIAT 899 e PRF 81 avaliados com três master mixs SYBR® Green I diferentes. (continua)

| Primers (F/R) | Massa DNA(ng) | Número cópias | Applied (Ct) | Promega (Ct) | Qiagen (Ct) | Applied (Tm) | | | Promega (Tm) | | | Qiagen (Tm) | | |
|-----------------------|------------------|------------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|-------|-----|--------------|-----|-----|-------------|-------|-----|
| | | | Média ± SD | Média ± SD | Média ± SD | Tm1 | Tm2 | Tm3 | Tm1 | Tm2 | Tm3 | Tm1 | Tm2 | Tm3 |
| Ciat899G139 | 25 | 3409714 | 13,89 ± 0,05 | 14,48 ± 0,13 | 15,21 ± 0,11 | 81,67 | | | 85,67 | | | 83,57 | | |
| | 2,5 | 340971 | 17,03 ± 0,12 | 16,81 ± 0,01 | 17,84 ± 0,08 | 81,54 | | | 85,59 | | | 83,49 | | |
| | 0,25 | 34097 | 20,34 ± 0,02 | 20,01 ± 0,02 | 21,33 ± 0,05 | 81,68 | | | 85,73 | | | 83,45 | | |
| | 0,025 | 3410 | 23,72 ± 0,20 | 23,54 ± 0,02 | 24,85 ± 0,13 | 81,68 | | | 85,82 | | | 83,49 | | |
| | 0,0025 | 341 | 26,78 ± 0,01 | 27,01 ± 0,12 | 28,03 ± 0,06 | 81,71 | | | 85,81 | | | 83,39 | | |
| | 0,00025 | 34 | 29,60 ± 0,22 | 29,67 ± 0,17 | 31,45 ± 0,04 | 81,59 | 70,47 | | 85,92 | | | 83,31 | | |
| Ciat899G144 | 25 | 3409714 | 13,54 ± 0,14 | 15,87 ± 0,21 | 13,81 ± 0,06 | 82,24 | | | 86,70 | | | 84,46 | | |
| | 2,5 | 340971 | 17,26 ± 0,08 | 19,31 ± 0,28 | 16,90 ± 0,09 | 82,25 | | | 86,72 | | | 84,47 | | |
| | 0,25 | 34097 | 21,40 ± 0,10 | 23,32 ± 0,01 | 20,38 ± 0,08 | 82,15 | | | 86,77 | | | 84,43 | | |
| | 0,025 | 3410 | 24,95 ± 0,09 | 27,25 ± 0,11 | 23,97 ± 0,06 | 82,10 | | | 86,85 | | | 84,42 | | |
| | 0,0025 | 341 | 28,20 ± 0,13 | 30,78 ± 0,27 | 27,31 ± 0,04 | 82,19 | | | 86,85 | | | 84,37 | | |
| | 0,00025 | 34 | 30,84 ± 0,31 | 34,20 ± 0,15 | 30,63 ± 0,03 | 82,34 | 66,09 | | 87,33 | | | 84,43 | | |
| Ciat899G1624 | 25 | 3409714 | 12,34 ± 0,08 | 14,10 ± 0,07 | 13,86 ± 0,04 | 79,16 | | | 83,34 | | | 81,15 | | |
| | 2,5 | 340971 | 15,38 ± 0,01 | 16,62 ± 0,05 | 17,32 ± 0,10 | 79,08 | | | 83,51 | | | 81,19 | | |
| | 0,25 | 34097 | 18,85 ± 0,05 | 20,05 ± 0,07 | 20,60 ± 0,06 | 79,31 | | | 83,54 | | | 81,13 | | |
| | 0,025 | 3410 | 22,04 ± 0,02 | 23,40 ± 0,03 | 24,19 ± 0,13 | 79,35 | | | 83,59 | | | 81,04 | | |
| | 0,0025 | 341 | 25,47 ± 0,00 | 26,59 ± 0,06 | 27,53 ± 0,06 | 79,38 | | | 83,58 | | | 81,01 | | |
| | 0,00025 | 34 | 28,46 ± 0,26 | 29,53 ± 0,41 | 30,51 ± 0,05 | 79,31 | | | 83,84 | | | 81,04 | 75,40 | |
| Ciat899G1624II | 25 | 3409714 | 13,59 ± 0,00 | 14,21 ± 0,08 | 14,52 ± 0,10 | 81,00 | | | 85,37 | | | 83,34 | | |
| | 2,5 | 340971 | 16,13 ± 0,01 | 17,24 ± 0,15 | 17,61 ± 0,03 | 81,29 | | | 85,49 | | | 83,35 | | |
| | 0,25 | 34097 | 19,67 ± 0,00 | 20,59 ± 0,06 | 20,79 ± 0,02 | 81,09 | | | 85,48 | | | 83,29 | | |
| | 0,025 | 3410 | 22,77 ± 0,07 | 24,09 ± 0,08 | 24,28 ± 0,10 | 81,20 | | | 85,52 | | | 83,20 | | |
| | 0,0025 | 341 | 26,68 ± 0,02 | 27,18 ± 0,20 | 27,86 ± 0,14 | 81,15 | | | 85,52 | | | 83,24 | | |
| | 0,00025 | 34 | 28,96 ± 0,11 | 29,95 ± 0,18 | 31,25 ± 0,13 | 81,37 | | | 85,77 | | | 83,26 | | |

Tabela 3 — Limite de detecção, threshold cycle (Ct) médio e temperatura de *melting* (Tm) dos *primers* desenhados para as estirpes CIAT 899 e PRF 81 avaliados com três master mixes SYBR® Green I diferentes. (continua)

| Primers (F/R) | Massa DNA (ng) | Número cópias | Applied (Ct) | | | Applied (Tm) | | | Promega (Tm) | | | Qiagen (Tm) | | |
|------------------------|-------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-----|--------------|-------|-----|-------------|-------|-----|
| | | | Média ± Dp | Média ± Dp | Média ± Dp | Tm1 | Tm2 | Tm3 | Tm1 | Tm2 | Tm3 | Tm1 | Tm2 | Tm3 |
| Ciat899G1624III | 25 | 3409714 | 13,59 ± 0,00 | 16,72 ± 0,06 | 15,99 ± 0,15 | 81,00 | | | 85,38 | | | 82,55 | | |
| | 2,5 | 340971 | 16,13 ± 0,01 | 13,51 ± 0,31 | 19,54 ± 0,14 | 81,29 | | | 85,20 | | | 82,63 | | |
| | 0,25 | 34097 | 19,67 ± 0,00 | 19,92 ± 0,07 | 23,14 ± 0,21 | 81,09 | | | 85,25 | | | 82,56 | | |
| | 0,025 | 3410 | 22,77 ± 0,07 | 24,06 ± 0,15 | 27,08 ± 0,04 | 81,20 | | | 85,39 | | | 82,48 | | |
| | 0,0025 | 341 | 26,68 ± 0,02 | 26,75 ± 0,12 | 31,17 ± 0,26 | 81,15 | | | 85,38 | | | 82,41 | | |
| | 0,00025 | 34 | 28,96 ± 0,11 | 30,23 ± 0,40 | 34,66 ± 0,00 | 81,37 | | | 85,49 | | | 82,39 | | |
| Ciat899G3718 | 25 | 3409714 | 13,69 ± 0,20 | 15,02 ± 0,25 | 15,52 ± 0,04 | 81,48 | | | 85,01 | | | 83,01 | | |
| | 2,5 | 340971 | 16,94 ± 0,10 | 17,95 ± 0,14 | 18,48 ± 0,08 | 81,49 | | | 85,21 | | | 83,17 | | |
| | 0,25 | 34097 | 20,47 ± 0,13 | 21,55 ± 0,02 | 21,95 ± 0,02 | 81,49 | | | 85,17 | | | 83,03 | | |
| | 0,025 | 3410 | 23,86 ± 0,15 | 25,31 ± 0,09 | 25,63 ± 0,08 | 81,39 | 66,59 | | 85,21 | | | 82,97 | | |
| | 0,0025 | 341 | 26,90 ± 0,05 | 28,44 ± 0,51 | 28,96 ± 0,01 | 81,44 | 66,14 | | 85,06 | | | 82,87 | | |
| | 0,00025 | 34 | 29,45 ± 0,10 | 32,03 ± 0,24 | 32,25 ± 0,19 | 81,49 | 66,38 | | 85,68 | 67,74 | | 82,93 | | |
| Ciat899G3722 | 25 | 3409714 | 12,42 ± 0,11 | 12,87 ± 0,16 | 15,33 ± 0,20 | 77,77 | | | 82,26 | | | 79,89 | | |
| | 2,5 | 340971 | 15,62 ± 0,11 | 14,99 ± 0,12 | 18,09 ± 0,11 | 77,82 | | | 82,25 | | | 79,99 | | |
| | 0,25 | 34097 | 19,10 ± 0,05 | 18,52 ± 0,01 | 21,15 ± 0,01 | 77,75 | | | 82,25 | | | 79,77 | | |
| | 0,025 | 3410 | 22,34 ± 0,03 | 22,30 ± 0,09 | 25,16 ± 0,14 | 77,63 | | | 82,29 | | | 79,80 | | |
| | 0,0025 | 341 | 25,54 ± 0,16 | 25,59 ± 0,32 | 28,97 ± 0,02 | 77,72 | | | 82,38 | | | 79,81 | | |
| | 0,00025 | 34 | 28,02 ± 0,06 | 28,46 ± 0,32 | 31,80 ± 0,33 | 77,80 | | | 82,62 | | | 79,91 | 75,32 | |

Tabela 3 – Limite de detecção, threshold cycle (Ct) médio e temperatura de melting (Tm) dos primers desenhados para as estirpes CIAT 899 e PRF 81 avaliados com três master mixes SYBR® Green I diferentes. (continua)

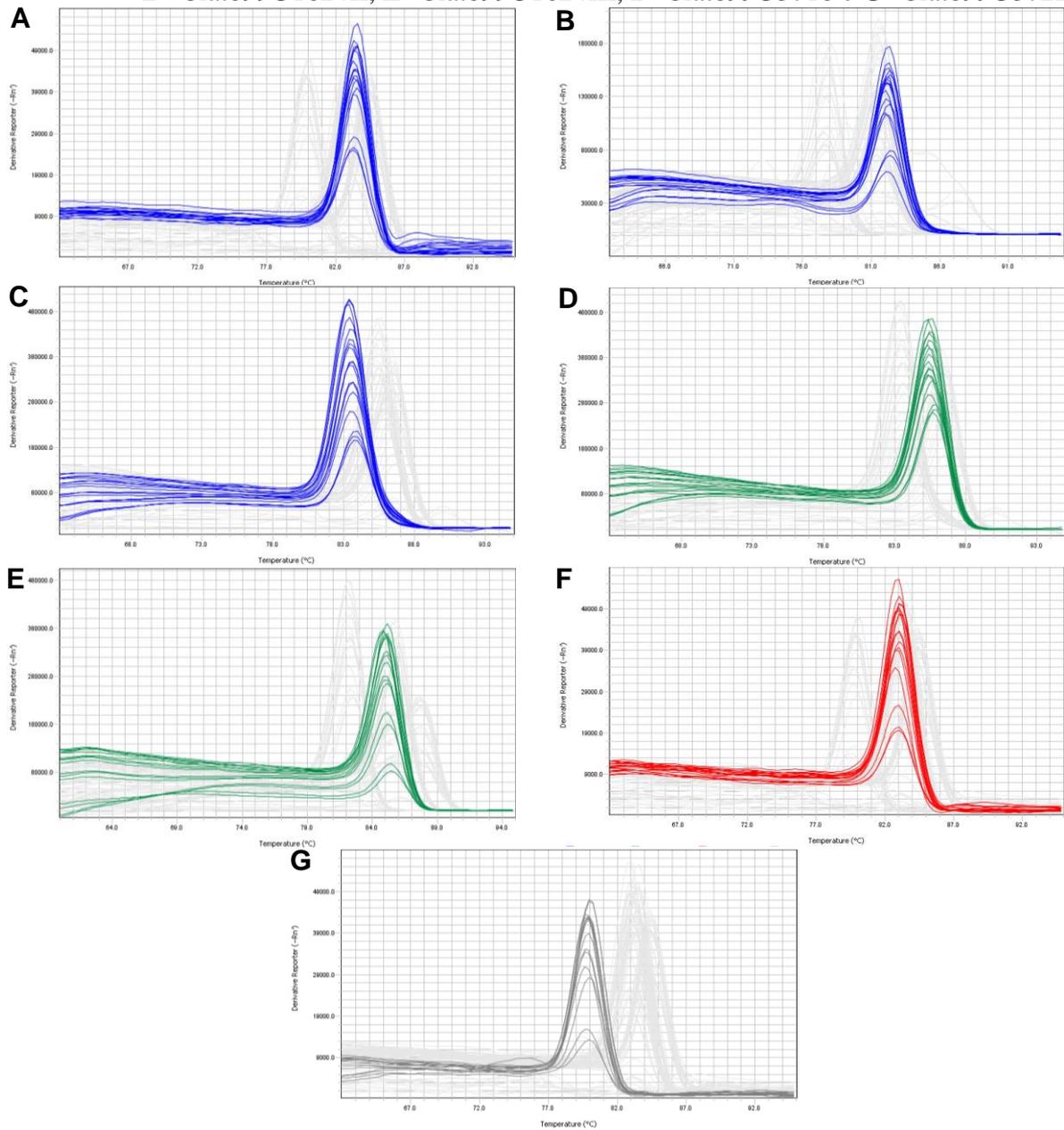
| Primers (F/R) | Massa DNA (ng) | Número cópias | Applied (Ct) | Promega (Ct) | Qiagen (Ct) | Applied (Tm) | | | Promega (Tm) | | | Qiagen (Tm) | | |
|--------------------|-------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------|-----|--------------|------|------|-------------|-----|-----|
| | | | Média ± Dp | Média ± Dp | Média ± SD | Tm1 | Tm2 | Tm3 | Tm1 | Tm2 | Tm3 | Tm1 | Tm2 | Tm3 |
| Prf81G19 | 25 | 3221891 | 12,96 ± 0,15 | 14,87 ± 0,07 | 14,23 ± 0,11 | 79,1 | | | 83,3 | | | 81,2 | | |
| | 2,5 | 322189 | 15,89 ± 0,11 | 16,89 ± 0,07 | 17,47 ± 0,10 | 79,2 | | | 83,3 | | | 81,1 | | |
| | 0,25 | 32219 | 19,40 ± 0,13 | 20,42 ± 0,06 | 20,77 ± 0,09 | 79,2 | | | 83,3 | | | 81,1 | | |
| | 0,025 | 3222 | 22,64 ± 0,16 | 24,31 ± 0,04 | 24,25 ± 0,09 | 79,2 | | | 83,3 | | | 81,0 | | |
| | 0,0025 | 322 | 25,79 ± 0,12 | 27,42 ± 0,13 | 27,72 ± 0,13 | 79,1 | | | 83,4 | | | 81,0 | | |
| | 0,00025 | 32 | 27,80 ± 0,06 | 30,36 ± 0,08 | 30,90 ± 0,07 | 79,1 | | | 83,6 | | | 80,9 | | |
| Prf81G222II | 25 | 3221891 | 12,53 ± 0,13 | 14,86 ± 0,30 | 12,50 ± 0,06 | 83,4 | | | 87,6 | | | 85,6 | | |
| | 2,5 | 322189 | 15,96 ± 0,27 | 18,47 ± 0,05 | 15,66 ± 0,06 | 83,4 | | | 87,7 | | | 85,6 | | |
| | 0,25 | 32219 | 19,38 ± 0,14 | 22,64 ± 0,03 | 18,95 ± 0,08 | 83,4 | | | 87,7 | | | 85,6 | | |
| | 0,025 | 3222 | 22,65 ± 0,03 | 27,04 ± 0,11 | 22,18 ± 0,03 | 83,4 | | | 87,8 | | | 85,5 | | |
| | 0,0025 | 322 | 25,94 ± 0,20 | 30,79 ± 0,94 | 25,53 ± 0,04 | 83,3 | | | 87,9 | 70,3 | | 85,5 | | |
| | 0,00025 | 32 | 28,08 ± 0,21 | 33,62 ± 0,09 | 28,90 ± 0,10 | 83,3 | | | 87,9 | 78,2 | | 85,6 | | |
| Prf81G529 | 25 | 3221891 | 12,63 ± 0,06 | 13,68 ± 0,26 | 13,39 ± 0,02 | 84,3 | | | 88,5 | | | 86,5 | | |
| | 2,5 | 322189 | 15,93 ± 0,08 | 16,71 ± 0,06 | 16,42 ± 0,11 | 84,4 | | | 88,8 | | | 86,6 | | |
| | 0,25 | 32219 | 19,33 ± 0,11 | 20,18 ± 0,38 | 19,62 ± 0,01 | 84,3 | | | 88,6 | | | 86,5 | | |
| | 0,025 | 3222 | 22,65 ± 0,18 | 24,61 ± 0,24 | 23,05 ± 0,06 | 84,3 | | | 88,8 | | | 86,4 | | |
| | 0,0025 | 322 | 26,07 ± 0,13 | 28,72 ± 0,30 | 26,27 ± 0,05 | 84,3 | | | 88,7 | 75,2 | | 86,5 | | |
| | 0,00025 | 32 | 27,68 ± 0,08 | 32,19 ± 0,19 | 30,23 ± 0,18 | 84,4 | 71,1 | | 89,2 | 71,2 | | 86,5 | | |
| Prf81G530 | 25 | 3221891 | 10,95 ± 0,21 | 12,06 ± 0,00 | 16,75 ± 0,06 | 82,1 | | | 86,8 | | | 83,2 | | |
| | 2,5 | 322189 | 14,59 ± 0,27 | 13,78 ± 0,18 | 20,01 ± 0,20 | 82,0 | | | 87,0 | | | 83,3 | | |
| | 0,25 | 32219 | 18,44 ± 0,27 | 17,40 ± 0,14 | 23,45 ± 0,03 | 82,0 | | | 87,0 | | | 83,2 | | |
| | 0,025 | 3222 | 21,31 ± 0,16 | 21,11 ± 0,09 | 27,37 ± 0,08 | 81,9 | | | 87,0 | | | 83,1 | | |
| | 0,0025 | 322 | 23,52 ± 0,32 | 24,06 ± 0,14 | 31,41 ± 0,11 | 82,0 | 73,0 | | 87,1 | | | 83,2 | | |
| | 0,00025 | 32 | 24,69 ± 0,38 | 25,83 ± 0,08 | 34,89 ± 0,00 | 82,1 | 73,1 | | 87,4 | 78,4 | 64,6 | 83,2 | | |

Tabela 3 – Limite de detecção, threshold cycle (Ct) médio e temperatura de *melting* (Tm) dos *primers* desenhados para as estirpes CIAT 899 e PRF 81 avaliados com três master mixes SYBR® Green I diferentes. (conclusão)

| Primers (F/R) | Massa DNA (ng) | Número cópias | Applied (Ct) | Promega (Ct) | Qiagen (Ct) | Applied (Tm) | | | Promega (Tm) | | | Qiagen (Tm) | | |
|-------------------|-------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------|-----|--------------|------|-----|-------------|------|-----|
| | | | Média ± Dp | Média ± Dp | Média ± Dp | Tm1 | Tm2 | Tm3 | Tm1 | Tm2 | Tm3 | Tm1 | Tm2 | Tm3 |
| Prf81G534I | 25 | 3221891 | 13,67 ± 0,21 | 14,40 ± 0,21 | 15,74 ± 0,06 | 82,0 | | | 86,4 | | | 83,9 | | |
| | 2,5 | 322189 | 16,57 ± 0,09 | 16,08 ± 0,22 | 19,19 ± 0,05 | 81,9 | | | 86,4 | | | 83,8 | | |
| | 0,25 | 32219 | 19,95 ± 0,12 | 19,31 ± 0,12 | 23,20 ± 0,53 | 81,9 | | | 86,5 | | | 83,8 | | |
| | 0,025 | 3222 | 23,28 ± 0,08 | 24,02 ± 0,37 | 26,75 ± 0,14 | 81,9 | | | 86,6 | | | 83,8 | | |
| | 0,0025 | 322 | 26,31 ± 0,17 | 27,40 ± 0,18 | 29,96 ± 0,14 | 81,9 | | | 86,7 | | | 83,7 | | |
| | 0,00025 | 32 | 28,68 ± 0,04 | 30,68 ± 0,00 | 33,40 ± 0,25 | 81,8 | 66,1 | | 86,8 | 68,0 | | 83,6 | | |
| Prf81G546I | 25 | 3221891 | 12,94 ± 0,11 | 12,76 ± 0,00 | 14,79 ± 0,11 | 77,6 | | | 82,2 | | | 79,4 | | |
| | 2,5 | 322189 | 16,31 ± 0,40 | 15,72 ± 0,08 | 17,82 ± 0,04 | 77,6 | | | 82,1 | | | 79,2 | | |
| | 0,25 | 32219 | 19,43 ± 0,07 | 18,93 ± 0,01 | 21,28 ± 0,08 | 77,7 | | | 82,1 | | | 79,3 | | |
| | 0,025 | 3222 | 22,85 ± 0,05 | 22,25 ± 0,15 | 24,86 ± 0,03 | 77,7 | | | 82,3 | | | 79,3 | | |
| | 0,0025 | 322 | 25,95 ± 0,08 | 25,35 ± 0,07 | 28,24 ± 0,02 | 77,8 | | | 82,3 | | | 79,3 | | |
| | 0,00025 | 32 | 28,86 ± 0,07 | 28,44 ± 0,21 | 31,44 ± 0,19 | 77,8 | | | 82,4 | | | 79,2 | | |
| Prf81G561 | 25 | 3221891 | 13,50 ± 0,15 | 13,99 ± 0,06 | 17,93 ± 0,16 | 81,7 | | | 85,6 | | | 83,3 | | |
| | 2,5 | 322189 | 16,78 ± 0,05 | 16,67 ± 0,06 | 20,60 ± 0,21 | 81,7 | | | 85,7 | | | 83,3 | | |
| | 0,25 | 32219 | 20,42 ± 0,09 | 19,99 ± 0,03 | 24,06 ± 0,01 | 81,7 | | | 85,7 | | | 83,3 | | |
| | 0,025 | 3222 | 23,77 ± 0,05 | 23,27 ± 0,07 | 27,99 ± 0,11 | 81,7 | | | 85,7 | | | 83,3 | | |
| | 0,0025 | 322 | 27,29 ± 0,03 | 26,47 ± 0,10 | 30,61 ± 0,15 | 81,1 | | | 85,8 | | | 83,2 | | |
| | 0,00025 | 32 | 29,88 ± 0,01 | 29,44 ± 0,07 | 33,32 ± 0,16 | 81,8 | 67,1 | | 86,0 | | | 82,9 | 80,6 | |

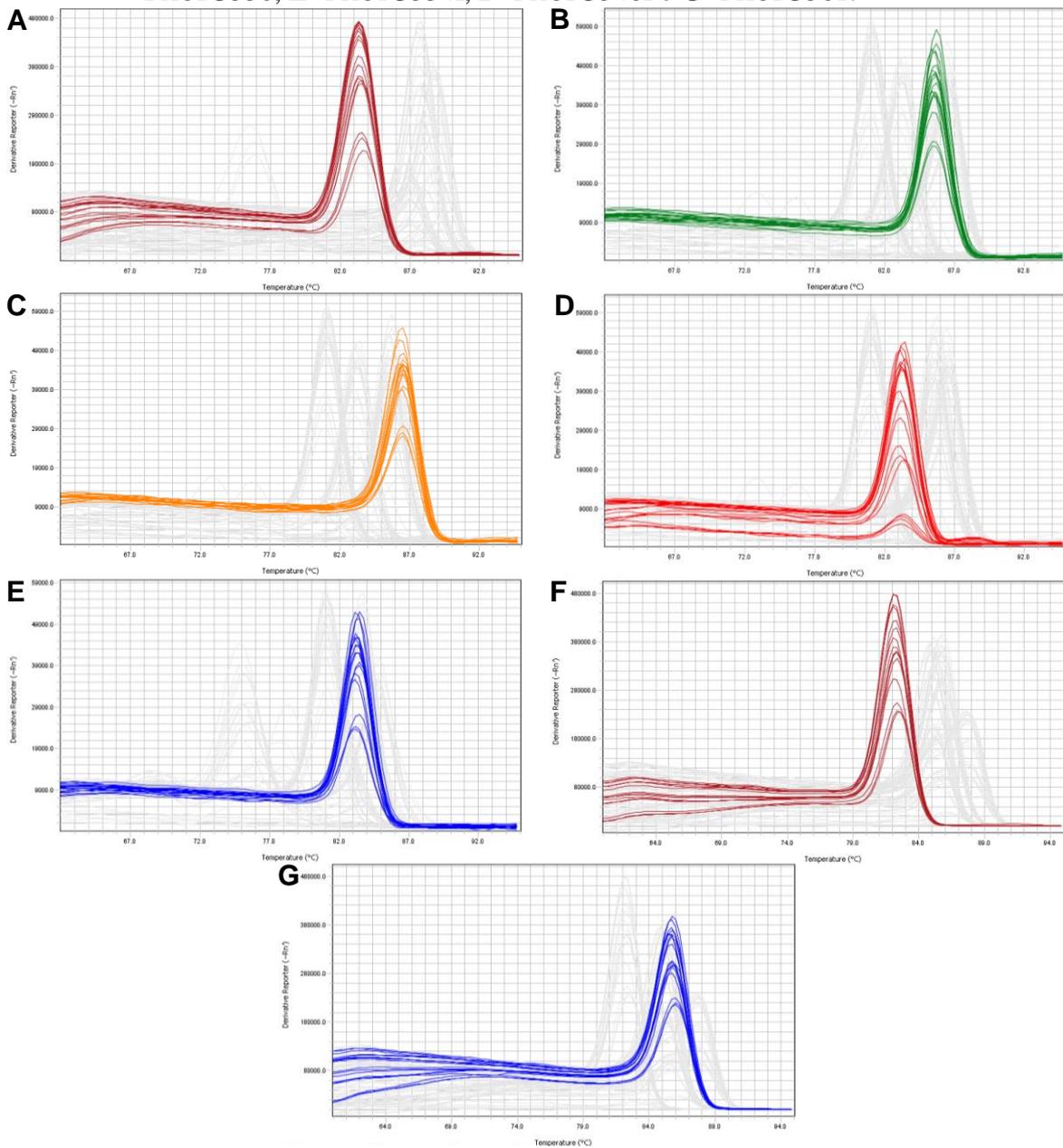
Fonte: Do autor (2022).

Figura 3 – Curvas de *melting* geradas nos ensaios de qPCR para os *primers* F/R desenhados para a estirpe CIAT 899, **A-** Ciat899G139, **B-** Ciat899G144, **C-** Ciat899G1624, **D-** Ciat899G1624II, **E-** Ciat899G1624III, **F-** Ciat899G3718 e **G-** Ciat899G3722.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 4 – Curvas de *melting* geradas nos ensaios de qPCR para os *primers* F/R desenhados para a estirpe PRF 81, **A-** Prf81G19, **B-** Prf81G222II, **C-** Prf81G529, **D-** Prf81G530, **E-** Prf81G534I, **F-** Prf81G546I e **G-** Prf81G561.



Fonte: Do autor (2022).

Diante dessas informações, sete pares de *primers*, para cada uma das estirpes, foram selecionados para os ensaios de qPCR conforme mostrado nas Tabelas 4 e 5 para a CIAT 899 e PRF 81, respectivamente. Os *primers* Ciat899G22 e Prf81G62 desenhados respectivamente para estirpe CIAT 899 e PRF 81, também apresentaram condições satisfatórias em ensaios de qPCR (APÊNDICE A). Porém, esses *primers* amplificam fragmentos de DNA alvo em ensaios de PCR, com temperatura de anelamento variando de 60 a 63 °C, a partir do DNA genômico das estirpes para os quais foram desenhados e de outras próximas a elas (Capítulo

2). Entretanto, a maior generalidade para amplificação por parte desses *primers* pode ser utilizada como estratégia para quantificação geral de rizóbios em trabalhos futuros envolvendo qPCR.

Tabela 4 – Concentrações e condições ideais dos *primers* selecionados para quantificação da estirpe CIAT 899 na qPCR.

| Bactéria alvo | Primer | | Kit comercial | Condições para qPCR |
|---------------------------------|-------------------|-----|---------------|---|
| | Nome | nM | | Desnaturação (Desnaturação-Anelamento-Extensão) x n° ciclos |
| <i>R. tropici</i> (CIAT 899) | Ciat899G139 F | 200 | Applied | 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 1 min) x 32 ciclos |
| | Ciat899G139 R | 200 | Promega | 95 °C por 2 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 30 s) x 32 ciclos |
| | Ciat899G144 F | 200 | Qiagen | 50 °C por 2 min; 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 15 s; 72 °C por 30 s) x 32 ciclos |
| | Ciat899G144 R | 200 | | |
| | Ciat899G1624 F | 200 | Applied | 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 63 °C por 1 min) x 32 ciclos |
| | Ciat899G1624 R | 200 | Promega | 95 °C por 2 min (95 °C por 5 s; 63 °C por 30 s) x 35 ciclos |
| | Ciat899G1624II F | 200 | Qiagen | 50 °C por 2 min; 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 63 °C por 15 s; 72 °C por 30 s) x 32 ciclos |
| | Ciat899G1624II R | 200 | | |
| | Ciat899G1624III F | 200 | Applied | 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 1 min) x 32 ciclos |
| | Ciat899G1624III R | 200 | Promega | 95 °C por 2 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 30 s) x 32 ciclos |
| | Ciat899G3718 F | 200 | Qiagen | 50 °C por 2 min; 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 15 s; 72 °C por 30 s) x 32 ciclos |
| | Ciat899G3718 R | 200 | | |
| | Ciat899G3722 F | 200 | | |
| | Ciat899G3722 R | 200 | | |

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 5 – Concentrações e condições ideais dos *primers* selecionados para quantificação da estirpe PRF 81 na qPCR.

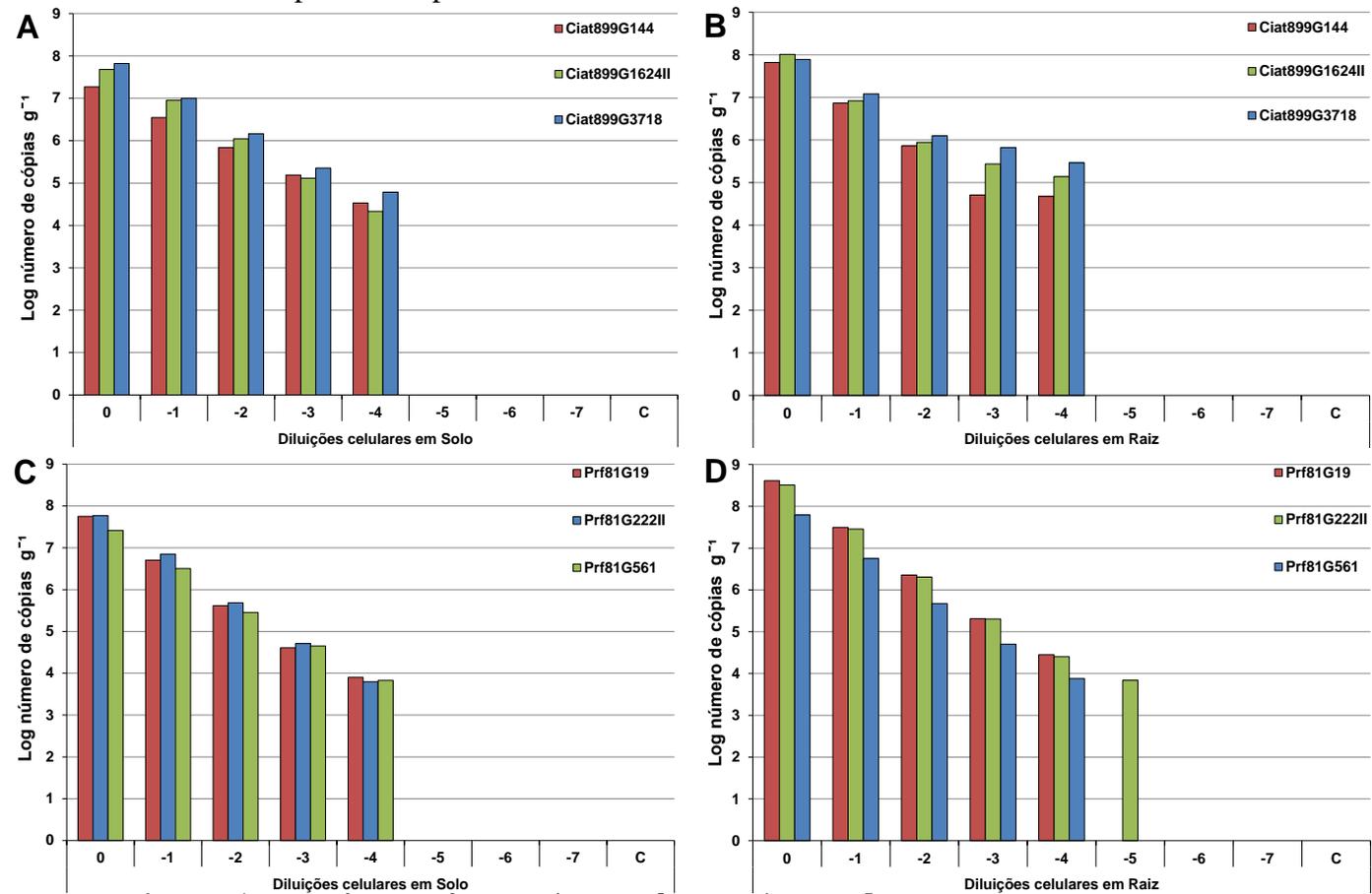
| Bactéria alvo | Primer | | Kit comercial | Condições para qPCR | |
|-------------------------------|---------------|-----|---------------|---|---|
| | Nome | nM | | Desnaturação (Desnaturação-Anelamento-Extensão) x n° ciclos | |
| <i>R. frereii</i> (PRF 81) | Prf81G19 F | 200 | Applied | 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 1 min) x 32 ciclos | |
| | Prf81G19 R | 200 | | | |
| | Prf81G222II F | 270 | Promega | 95 °C por 2 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 30 s) x 32 ciclos | |
| | Prf81G222II R | 270 | | | |
| | Prf81G529 F | 200 | Qiagen | 50 °C por 2 min; 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 15 s; 72 °C por 30 s) x 32 ciclos | |
| | Prf81G529 R | 200 | | | |
| | Prf81G534I F | 200 | Applied | 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 63 °C por 1 min) x 32 ciclos | |
| | Prf81G534I R | 200 | | | |
| | Prf81G546I F | 200 | Promega | 95 °C por 2 min (95 °C por 5 s; 63 °C por 30 s) x 32 ciclos | |
| | Prf81G546I R | 200 | | | |
| | Prf81G561 F | 250 | Qiagen | 50 °C por 2 min; 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 15 s; 72 °C por 30 s) x 32 ciclos | |
| | Prf81G561 R | 250 | | | |
| | | | | Applied | 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 61 °C por 1 min) x 35 ciclos |
| | Prf81G530 F | 250 | Promega | 95 °C por 2 min (95 °C por 5 s; 61 °C por 30 s) x 35 ciclos | |
| Prf81G530 R | 250 | | | | |
| | | | Qiagen | 50 °C por 2 min; 95 °C por 10 min (95 °C por 5 s; 61 °C por 15 s; 72° C por 30 s) x 35 ciclos | |

Fonte: Do autor (2022).

3.2 Quantificação das estirpes CIAT 899 e PRF 81 inoculadas em diluição seriada em raízes de feijoeiro maceradas ou solo

Todos os *primers* utilizados para esse ensaio foram capazes de quantificar as estirpes alvo em proporções decrescentes conforme a diluição seriada, da mais para a menos concentrada, tanto para as amostras de DNA isolado das raízes como também as do solo (FIGURA 5). As células da estirpe PRF 81 foram quantificadas na ordem decrescente de acordo ao fator diluição utilizado igual a 10 vezes, a partir da amostra matriz até a amostra diluída 10^{-4} (FIGURA 5CD). Já a quantificação da estirpe CIAT 899 nas raízes não respeitou o fator diluição igual a 10 vezes, sendo que nas últimas três diluições que foram quantificadas as células estavam na ordem de 10^5 g^{-1} de raiz (FIGURA 5B), isso provavelmente ocorreu devido a problemas inerentes à diluição. Quanto as demais diluições (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}), assim como para as amostras de DNA controle, sem inoculação, não houve quantificação de células alvo na qPCR por meio dos *primers* testados. Com exceção, da amostra do DNA isolada de raiz inoculada com a diluição 10^{-5} , onde a estirpe PRF 81 foi quantificada na qPCR utilizando os *primers* Prf81G222I (FIGURA 5D).

Figura 5 — Quantificação na qPCR das estirpes CIAT 899 e PRF 81 inoculadas em diluição seriada no **A-** solo e **B-** raiz, utilizando os *primers* Ciat899G144, Ciat899G1624 e Ciat899G3718 para a estirpe CIAT 899 e **C-** solo e **D-** raiz, utilizando os *primers* Prf81G19, Prf81G222II e Prf81G561 para a estirpe PRF 81.



Diluições $10^0 = 0$; $10^{-1} = -1$; $10^{-2} = -2$; $10^{-3} = -3$; $10^{-4} = -4$; $10^{-5} = -5$; $10^{-6} = -6$; $10^{-7} = -7$ e C- sem inoculação com suspensão celular.

Fonte: Do autor (2022).

3.3 Quantificação das estirpes CIAT 899 e PRF 81 nas raízes e solo rizosférico do feijoeiro cultivado em casa de vegetação

Nas análises quantitativas os *primers* selecionados para qPCR também foram específicos e eficientes. Por questões de custo operacional na qPCR foi conveniente fazer a análise do experimento utilizando apenas três dos *primers* para cada bactéria. Porém, como é mostrado nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5 e Tabela 3, todos os *primers* selecionados no presente estudo (TABELA 4) têm potencial para quantificar a estirpe CIAT 899 ou PRF 81 a partir de suas amostras DNA empregadas em ensaios de qPCR. Como foi observado para as amostras de DNA isoladas de raízes e solo rizosférico das plantas de feijoeiro, cultivadas em casa de vegetação até os primeiros 15 dias após o semeio (TABELA 6). Os dados dessa tabela mostram que as estirpes inoculadas CIAT 899 e PRF 81 tiveram suas populações quantificadas, significativamente, pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$), nas raízes e no solo rizosférico dos tratamentos inoculados com elas individualmente e em conjunto (mix) quando comparados aos tratamentos não inoculados. Por outro lado, nos tratamentos não inoculados (controle), não houve a detecção das estirpes alvo (TABELA 6). Observou-se também que o número de cópias do gene 16S rRNA dentro de cada coleta foi estável, independente do tratamento (TABELA 6). No APÊNDICE B é possível ter uma visualização melhor entre as coletas e os tratamentos, da quantidade de fragmentos do DNA genômico das estirpes CIAT 899 e PRF 81 bem como do gene 16S rRNA, separadamente, quantificados por grama de raiz ou solo rizosférico.

A utilização de um ou mais *primers* traz vantagens quanto a especificidade nos ensaios, porém, como mostrado nos APÊNDICES C e D, não houve diferença significativa dentro do grupo de *primers* utilizados para quantificar, separadamente, as estirpes CIAT 899 e PRF 81. Sendo assim, para trabalhos em condição estéril ou ambiente controlado, a utilização de um par de *primer* já seria o suficiente para quantificação absoluta da bactéria CIAT 899 ou PRF 81. Como, por exemplo, no controle de qualidade de inoculante contendo rizóbios (GOULART et al., 2015). Além disso, o número de *primers* selecionados para qPCR, sete pares para cada uma das estirpes alvo (Tabelas 4 e 5), traz a possibilidade de, em trabalhos futuros, haver a combinação deles na técnica multiplex qPCR. Nessa técnica, dois ou mais fragmentos de DNA alvo são especificamente amplificados numa mesma reação, descartando a necessidade de repetição do ensaio com mais de um par de *primer* para reforçar a especificidade da detecção (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

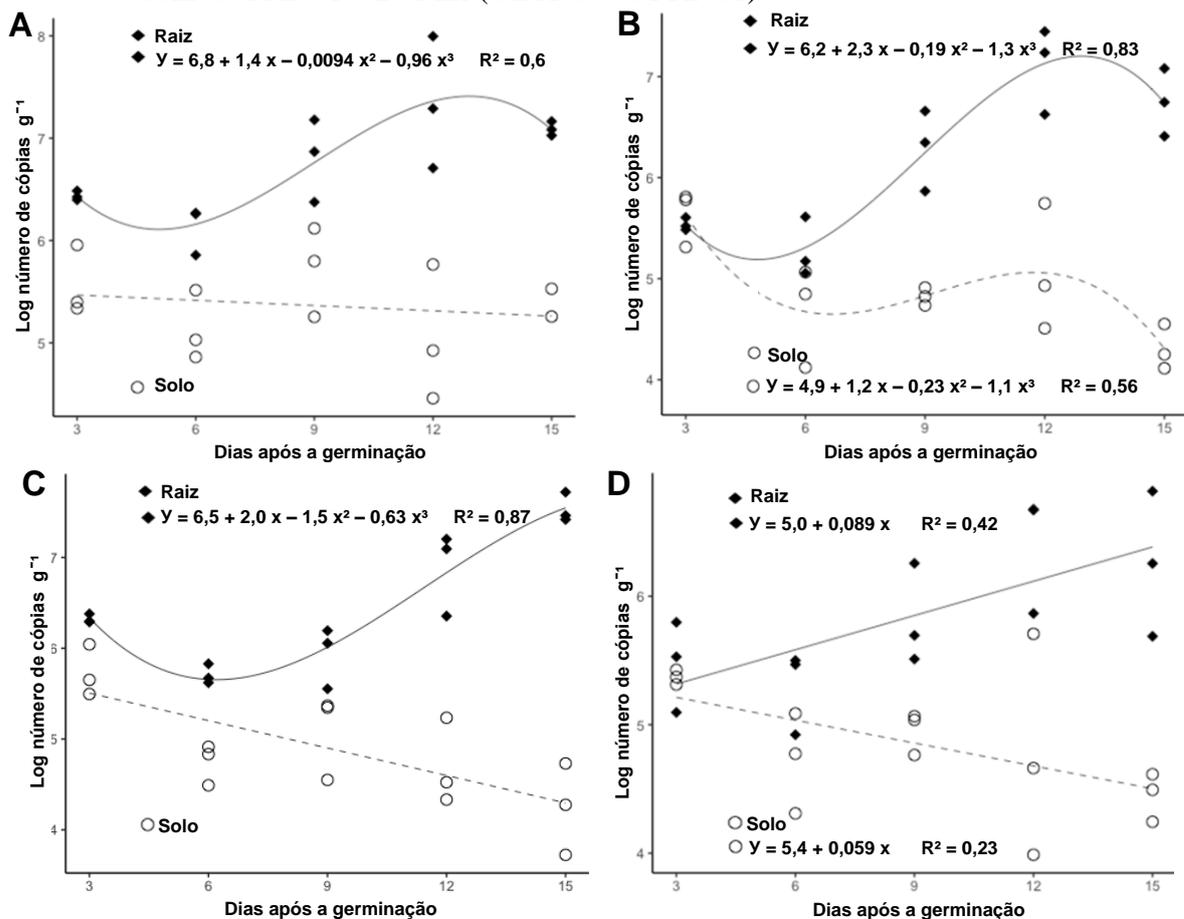
Tabela 6 – Populações das estirpes CIAT 899 e PRF 81 quantificadas individualmente ao longo de 15 dias por meio de *primers* específicos na qPCR.

| Época de coleta | 3° dia | 6° dia | 9° dia | 12° dia | 15° dia |
|-------------------------|---|---------|---------|---------|---------|
| Tratamento | Quantificação em log do n° células g de raiz ⁻¹ realizada pelos <i>primers</i> para estirpe CIAT 899 | | | | |
| CIAT 899 | 6,43 a | 6,13 a | 6,81 a | 7,33 a | 7,09 a |
| PRF 81 | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 1,70 b | 0,00 b |
| Mix (CIAT 899 e PRF 81) | 5,53 a | 5,27 a | 6,29 a | 7,10 a | 6,74 a |
| Não inoculado | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 c | 0,00 b |
| Tratamento | Quantificação em log do n° células g de solo ⁻¹ realizada pelos <i>primers</i> para estirpe CIAT 899 | | | | |
| CIAT 899 | 5,56 a | 5,13 a | 5,72 a | 5,05 a | 3,59 a |
| PRF 81 | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 1,57 b | 0,00 b |
| Mix (CIAT 899 e PRF 81) | 5,63 a | 5,68 a | 4,82 a | 5,06 a | 4,30 a |
| Não inoculado | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b |
| Tratamento | Quantificação em log do n° células g de raiz ⁻¹ realizada pelos <i>primers</i> para estirpe PRF 81 | | | | |
| CIAT 899 | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 2,00 b | 0,00 b |
| PRF 81 | 6,32 a | 5,70 a | 5,93 a | 6,88 a | 7,53 a |
| Mix (CIAT 899 e PRF 81) | 5,47 a | 5,29 a | 5,82 a | 6,40 a | 6,25 a |
| Não inoculado | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 c | 0,00 b |
| Tratamento | Quantificação em log do n° células g de solo ⁻¹ realizada pelos <i>primers</i> para estirpe PRF 81 | | | | |
| CIAT 899 | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b |
| PRF 81 | 5,73 a | 4,74 a | 5,09 a | 4,69 a | 4,24 a |
| Mix (CIAT 899 e PRF 81) | 5,37 a | 4,72 a | 4,95 a | 4,78 a | 4,44 a |
| Não inoculado | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b |
| Tratamento | Quantificação em log do n° células g de raiz ⁻¹ realizada pelos <i>primers</i> 16S rRNA | | | | |
| CIAT 899 | 8,79 a | 8,54 a | 8,48 a | 8,78 a | 8,76 a |
| PRF 81 | 8,86 a | 8,03 a | 8,60 a | 9,12 a | 8,61 a |
| Mix (CIAT 899 e PRF 81) | 8,74 a | 8,68 a | 8,97 a | 9,03 a | 8,84 a |
| Não inoculado | 8,74 a | 8,59 a | 8,97 a | 9,34 a | 8,81 a |
| Tratamento | Quantificação em log do n° células g de solo ⁻¹ realizada pelos <i>primers</i> 16S rRNA | | | | |
| CIAT 899 | 9,60 a | 10,03 a | 10,34 a | 9,90 a | 8,67 a |
| PRF 81 | 9,37 a | 9,71 a | 9,67 a | 9,09 b | 8,26 a |
| Mix (CIAT 899 e PRF 81) | 9,88 a | 9,72 a | 9,80 a | 9,68 ab | 8,59 a |
| Não inoculado | 9,31 a | 10,02 a | 9,91 a | 9,66 ab | 9,00 a |

Fonte: Do autor (2022).

Quanto ao comportamento populacional de cada uma das estirpes CIAT 899 e PRF 81 quantificadas nos ensaios de qPCR, notou-se que, a partir dos tratamentos em que cada uma foi inoculada, sua população aumentou significativamente nas raízes e decresceu no solo rizosférico, conforme o estágio fenológico da planta de feijoeiro (FIGURA 6). Observou-se que nas raízes as populações das bactérias inoculadas apresentaram para a maioria dos tratamentos, um comportamento crescente mais bem representado por uma equação polinomial de 3 graus (FIGURA 6ABC). Enquanto que no solo, para a maioria dos tratamentos, o comportamento populacional das bactérias inoculadas é decrescente com tendência linear (FIGURA 6ACD).

Figura 6 – Comportamento populacional ao longo do tempo na raiz e no solo rizosférico do feijoeiro para a estirpe CIAT 899 nos tratamentos inoculados com **A-** CIAT 899 e **B-** Mix (CIAT 899 e PRF 81) e para a estirpe PRF 81 nos tratamentos inoculados com **C-** PRF 81 e **D-** Mix (CIAT 899 e PRF 81).



Dados submetidos à análise de regressão com modelos significativamente ajustados a $p < 0,05$, a ausência de equação na curva significa que não houve padrão definido a $p < 0,05$.

Fonte: Do autor (2022).

3.4 Análise da ocupação nodular por meio da qPCR

Na avaliação de ocupação nodular utilizando diferentes concentrações e volumes do extrato de nódulos na qPCR observou-se que, o volume de 0,5 µL do extrato de nódulo, independente da concentração, foi o que proporcionou melhor curva de *melting* para os *primers* Ciat899G139 F/R, ou seja, um único pico bem definido acima de 80 °C (FIGURA 7BFH). Já para os *primers* Prf81G19 F/R houve a formação das curvas de *melting* com um único pico bem definido acima de 80 °C, independente dos volumes e concentração dos extratos de nódulos utilizados (FIGURA 8). Diante desses resultados foram realizados ensaios de qPCR para avaliação da ocupação nodular utilizando o volume de 0,5 µL do extrato de nódulo, independente da densidade óptica (DO). No presente estudo, a taxa de ocupação nodular foi confirmada tendo como base a temperatura de dissociação dos *primers* e a observação de suas curvas de *meltingi* após os ensaios na qPCR. Os dados mostraram que a taxa de ocupação nodular dos tratamentos inoculados com as estirpes, individualmente foi de 90% e 97% com a CIAT 899 e a PRF 81, respectivamente (TABELA 7). Em contrapartida, para o tratamento contendo as duas estirpes (mix) verificou-se taxa de ocupação nodular igual a 100% e 73% para as estirpes CIAT 899 e PRF 81, respectivamente (TABELA 7). Já para o tratamento não inoculado, observou-se que não houve ocupação nodular por parte das estirpes alvos do presente estudo, apesar de ter sido o segundo com maior número de nódulos (TABELA 7).

Tabela 7 – Número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN) e ocupação nodular do feijoeiro cultivado em casa de vegetação até o 24º dia após o semeio.

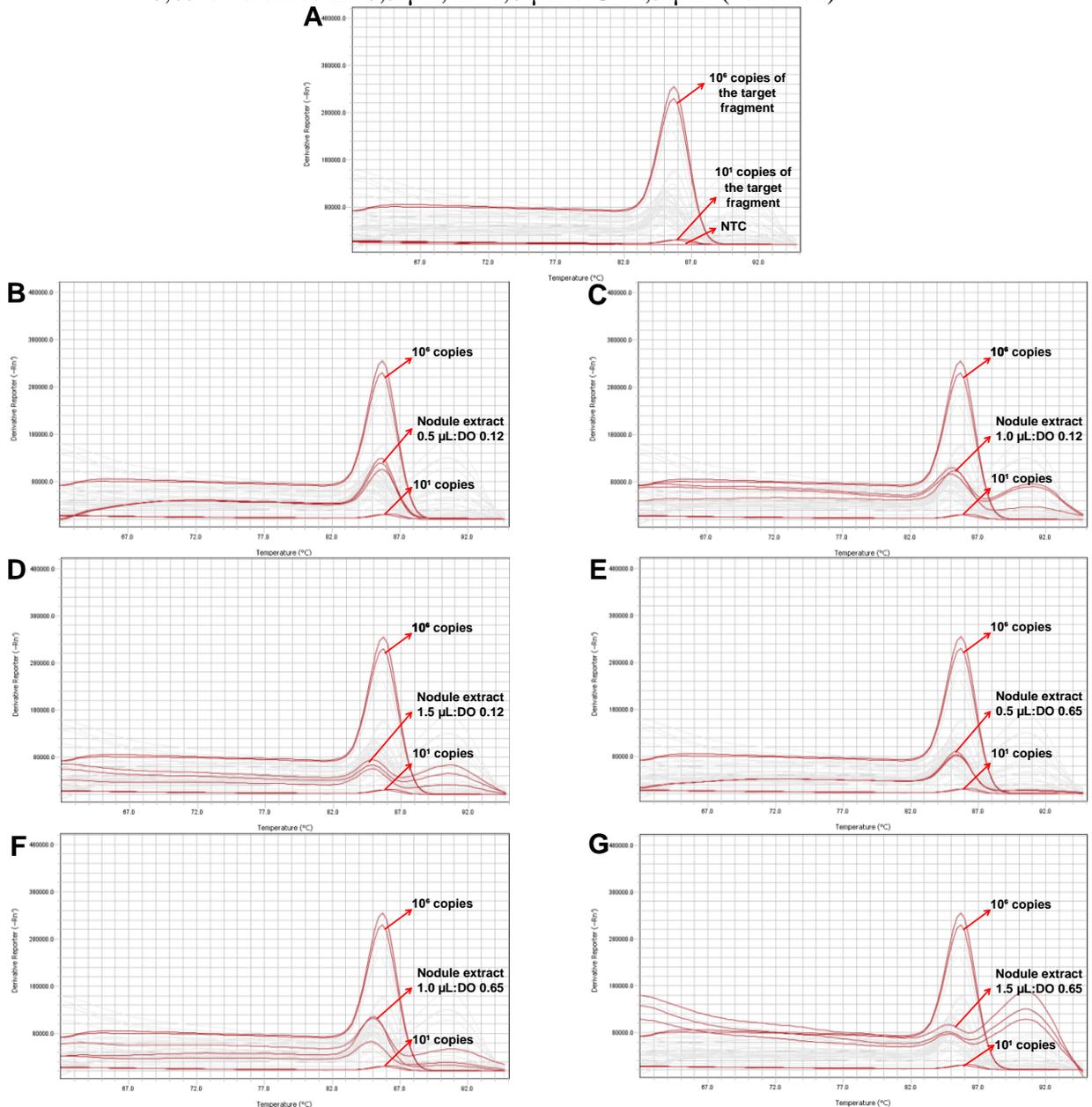
| Tratamento | NN ¹ und | MSN ¹ mg | Ocupação nodular por % ² | |
|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|--------|
| | | | CIAT 899 | PRF 81 |
| CIAT 899 | 29 ± 10 | 19,9 ± 7,3 | 90 | 00 |
| PRF 81 | 55 ± 31 | 18,7 ± 1,7 | 00 | 97 |
| Mix (CIAT 899 e PRF 81) | 27 ± 06 | 13,3 ± 4,4 | 100 | 73 |
| Não inoculado | 43 ± 04 | 14,8 ± 6,8 | 00 | 00 |

¹ médias ± desvio padrão de 3 repetições; ² médias de 30 nódulos de 3 plantas por tratamento.

Observação: os extratos de nódulos de todos os tratamentos ($n = 120$) foram avaliados na qPCR com os *primers* de cada uma das estirpes CIAT 899 e PRF 81, separadamente.

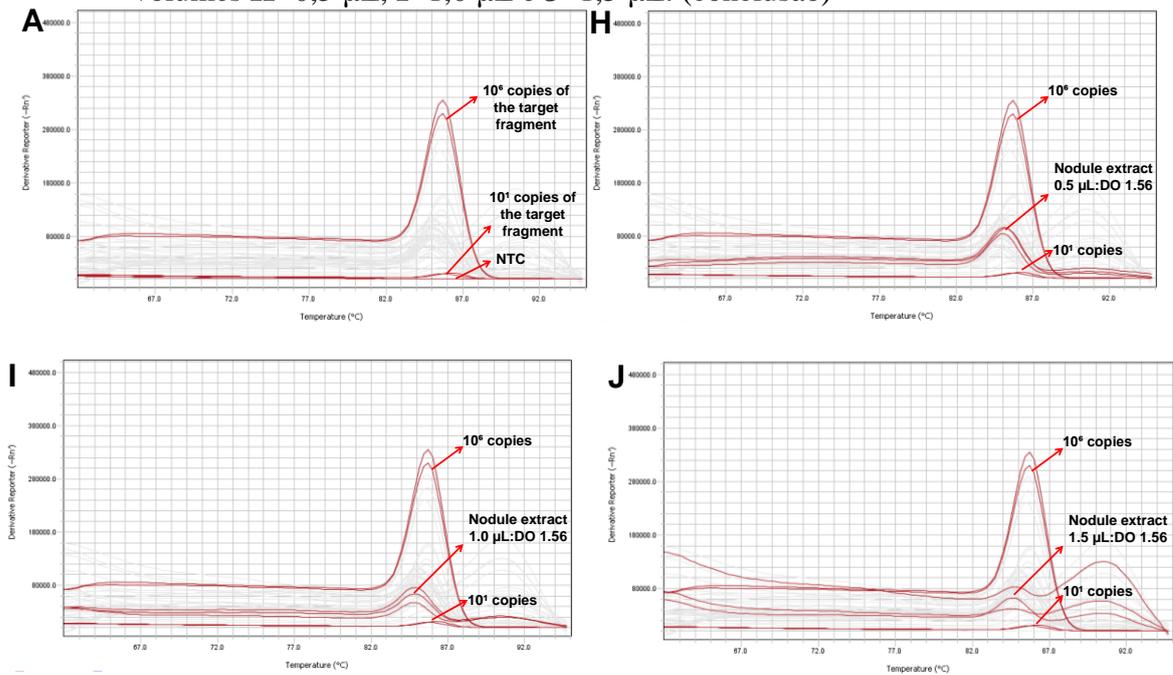
Fonte: Do autor (2022).

Figura 7 — Curvas de *melting* geradas em ensaios de qPCR para o *primer* Ciat899G139 testado com diferentes volumes e concentrações do extrato de nódulos contendo a estirpe CIAT 899. A- curvas de referência: o maior e o menor pico são referentes, respectivamente, a amostras de DNA da bactéria alvo equivalente a 10^6 e 10^1 cópias fragmento de DNA alvo ou células, a linha da base, sem pico, é referente ao controle negativo (NTC). As curvas de *melting* para as diferentes concentrações dos extratos de nódulos se encontram entre as curvas de referências, maior e menor pico. Para o extrato de nódulo com DO_{560nm} 0,12 e volumes B- 0,5 μ L, C- 1,0 μ L e D- 1,5 μ L. Para o extrato de nódulo com DO_{560nm} 0,65 e volumes E- 0,5 μ L, F- 1,0 μ L e G- 1,5 μ L. (continua)



Fonte: Do autor (2022).

Figura 7 - Curvas de *melting* geradas em ensaios de qPCR para o primer Ciat899G139 testado com diferentes volumes e concentrações do extrato de nódulos contendo a estirpe CIAT 899. A- curvas de referência: o maior e o menor pico são referentes, respectivamente, a amostras de DNA da bactéria alvo equivalente a 10^6 e 10^1 cópias fragmento de DNA alvo ou células, a linha da base, sem pico, é referente ao controle negativo (NTC). As curvas de *melting* para as diferentes concentrações dos extratos de nódulos se encontram entre as curvas de referências, maior e menor pico. Para o extrato de nódulo com DO560nm 1,56 volumes H- 0,5 μ L, I- 1,0 μ L e J- 1,5 μ L. (conclusão)



Fonte: Do autor (2020).

Figura 8 – Curvas de melting geradas em ensaios de qPCR para o primer Prf81G19 testado com diferentes volumes e concentrações do extrato de nódulos contendo a estirpe PRF 81. **A**- curvas de referência: o maior e o menor pico são referentes, respectivamente, a amostras de DNA da bactéria alvo equivalente a 10^6 e 10^1 cópias fragmento de DNA alvo ou células, a linha da base, sem pico, é referente ao controle negativo (NTC). As curvas de melting para as diferentes concentrações dos extratos de nódulos se encontram entre as curvas de referências, maior e menor pico. Para o extrato de nódulo com DO560nm 0,15 e volumes **B**- 0,5 μ L, **C**- 1,0 μ L e **D**- 1,5 μ L. Para o extrato de nódulo com DO560nm 0,44 e volumes **E**- 0,5 μ L, **F**- 1,0 μ L e **G**- 1,5 μ L. (continua)

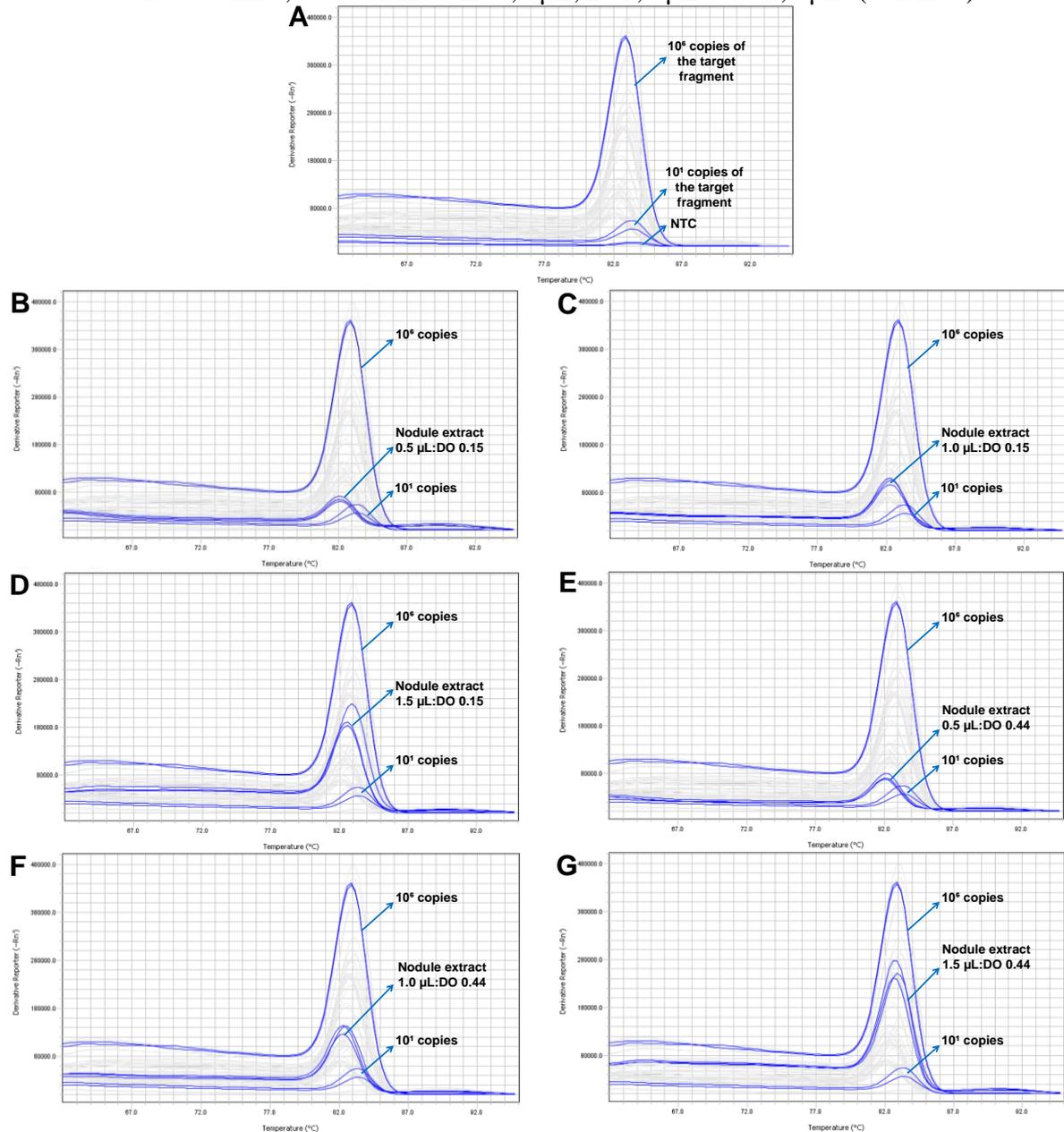
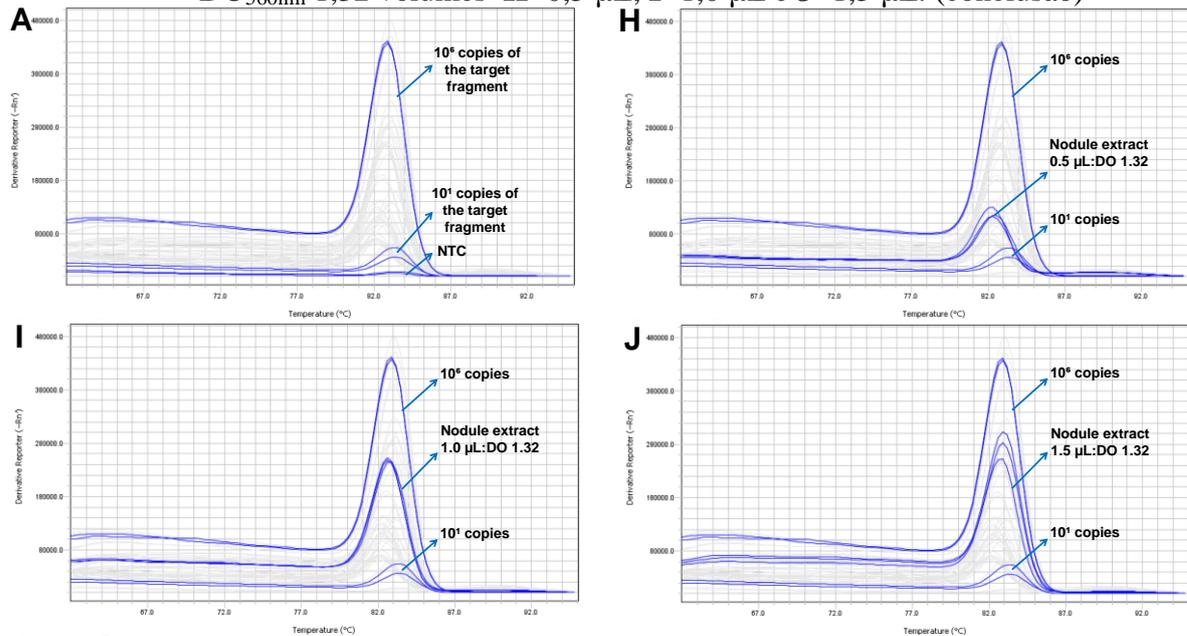


Figura 8 – Curvas de *melting* geradas em ensaios de qPCR para o *primer* Ciat899G139 testado com diferentes volumes e concentrações do extrato de nódulos contendo a estirpe CIAT 899. A- curvas de referência: o maior e o menor pico são referentes, respectivamente, a amostras de DNA da bactéria alvo equivalente a 10^6 e 10^1 cópias fragmento de DNA alvo ou células, a linha da base, sem pico, é referente ao controle negativo (NTC). As curvas de *melting* para as diferentes concentrações dos extratos de nódulos se encontram entre as curvas de referências, maior e menor pico. Para o extrato de nódulo com DO_{560nm} 1,32 volumes H- 0,5 μ L, I- 1,0 μ L e J- 1,5 μ L. (conclusão)



Fonte: Do autor (2022).

4 DISCUSSÃO

Na literatura são recorrentes publicações validando *primers* desenhados para quantificação em corridas de PCR em Tempo Real para bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (COUILLEROT *et al.*, 2010; FALEIRO *et al.*, 2013; PAULO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2021), inclusive para as formadoras de nódulos em leguminosas (BOONEN *et al.*, 2010; FURSETH; CONLEY; ANÉ, 2010; MACDONALD *et al.*, 2011; SHIN; VAN BRUGGEN, 2018). Porém, não se tinha, até então, relatos para as bactérias *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 e *R. freirei* estirpe PRF 81 comercializadas como inoculante para cultura do feijoeiro (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003) ou utilizadas como estirpes modelo (MOREIRA *et al.*, 2017). No entanto, a maioria dos *primers* desenhados para as estirpes CIAT 899 e PRF 81, validados na PCR convencional para avaliação de ocupação nodular no Capítulo 2 dessa Tese, mostrou-se também ser eficiente para a quantificação e o monitoramento das estirpes CIAT 899 e PRF 81 utilizando a técnica qPCR. No presente estudo, os *primers* foram avaliados em ensaios de qPCR observando-se a eficiência de amplificação (E), o coeficiente de determinação (R^2), o limite de detecção (LoD) e a curva de *melting* formados por eles, conforme as recomendações técnicas na literatura (BUSTIN; NOLAN, 2017; KRALIK; RICCHI, 2017; TAYLOR *et al.*, 2019). Além disso, utilizando três *primers* para cada uma das bactérias alvo, nos ensaios de qPCR, foi possível fazer a quantificação das populações das estirpes CIAT 899 e PRF 81 a partir das amostras de DNA total isoladas de raízes e solo rizosférico, bem como avaliar a ocupação nodular a partir do extrato de nódulos coletados das plantas de feijoeiro.

A maioria dos *primers* selecionados nesse trabalho apresentou na qPCR, eficiência de amplificação entre 95% a 105%, faixa ideal segundo Bustin e Huggett (2017). A eficiência de amplificação é importante para avaliar o ensaio de qPCR, pois ela determina se a quantidade do DNA alvo amplificado está sendo duplicada a cada ciclo representado pelo valor Ct ou Cq (ciclo de quantificação) (FRAGA *et al.*, 2014). Apesar das médias da eficiência de amplificação dos *primers* Ciat899G144, Ciat899G1624III e Prf81G530 não estarem dentro da faixa ideal de 95-105%, individualmente, observa-se que dentro dos ensaios independentes de qPCR, conforme o mastermix SYBR® Green I empregado, há valores que atendem a faixa recomendada (FIGURA 1FI e FIGURA 2G). Entretanto, são aceitos para qPCR, valores da inclinação de curva (s) entre -3,58 a -3,10 correspondente, respectivamente, a eficiência de amplificação entre 90% a 110% (ILHA *et al.*, 2016; LIFE TECHNOLOGIES, 2014). Assim sendo, os *primers* desenhados no presente estudo estão em conformidade quanto a eficiência

de amplificação exigida para ensaios de qPCR, bem como para o coeficiente de determinação (R^2) gerado pela curva de calibração (y), aceitável acima de 0,98 (KRALIK; RICCHI, 2017) que também pode ser averiguado nas Figuras 1 e 2.

Quanto ao LoD, é o parâmetro utilizado para avaliar o desempenho de determinado procedimento analítico relacionado à quantidade mínima de alvo que pode ser detectada e quantificada (FOROOTAN *et al.*, 2017). Em todos os ensaios de qPCR do presente estudo, as amostras mais diluídas das curvas de calibração continham massa igual a $2,5 \times 10^2$ fg de DNA alvo tanto para a estirpe CIAT 899 como para a estirpe PRF 81. Essa quantidade de DNA molde foi definida como o LoD, independente dos *primers* utilizados, uma vez que amplificações na qPCR utilizando diluições abaixo de 10^2 fg de DNA alvo na reação não foram recorrentes. Dessa forma, foi estabelecida como o LoD dos *primers* a massa de $2,5 \times 10^2$ fg de DNA genômico, equivalente a 32 e 34 cópias dos fragmentos de DNA alvo das estirpes CIAT 899 e PRF 81 amplificados durante a corrida de qPCR, respectivamente. O LoD para os *primers* observado nesse trabalho está condizente com outros observados na ordem de 10^1 cópias de BPCV quantificadas também em ensaios de qPCR (FALEIRO *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2021). Em teoria, na qPCR pode haver amplificação a partir de uma única cópia de DNA alvo, porém, duas a dez cópias são consideradas como o limite alvo mais baixo aceito de forma confiável para detecção em ensaios de PCR em Tempo Real (LIFE TECHNOLOGIES, 2014). Portanto, considerando que cada par de *primer* selecionado (TABELA 4) flanqueia a amplificação de um único fragmento de DNA alvo por genoma, às 32 ou 34 cópias citadas podem ser consideradas como células bacterianas detectadas nos ensaios de qPCR.

Na análise final do ensaio de qPCR o fragmento de DNA alvo amplificado ou amplicon (T_m1) é representado por um pico único na curva de *melting* geralmente acima de 80°C (SIGMA-ALDRICH, 2014). Já os dímeros de *primers* são indicados na análise final de qPCR por T_m2 e T_m3 , detectados à temperatura de dissociação mais baixa do que a do amplicon alvo (FRAGA *et al.*, 2014). É importante destacar que os valores de T_m1 observados para os *primers* nesse estudo variaram conforme o mastermix usado (TABELA 3). Apesar disso, observou-se que houve baixo desvio padrão nas curvas de calibração médias, plotadas a partir dos três mastermix diferentes (FIGURA 1 e 2). Segundo Morinha *et al.* (2020) o mastermix é um importante fator a ser considerado para um bom desempenho nos ensaios de qPCR, já que a química do tampão, o tipo de polimerase e/ou o corante fluorescente de ligação ao DNA pode afetar a magnitude dos valores de Ct. Além disso, em alguns casos o SYBR® Green I pode chegar a inibir a amplificação, ter ligação preferencial a

sequências ricas em GC e influenciar na temperatura de fusão do DNA, durante a corrida de qPCR (FRAGA *et al.*, 2014).

Quanto as temperaturas de anelamento (T_a) dos *primers* na qPCR, foram mantidas conforme as condições definidas para a especificidade deles observadas em ensaios de PCR convencional no Capítulo 2 dessa Tese. Segundo Bustin e Nolan (2017) a temperatura de anelamento de um primer é o principal parâmetro que deve ser avaliado na validação de *primers* para ensaios de qPCR. Como mostrado no Capítulo 2 dessa Tese, a faixa da temperatura de anelamento variando entre 61 °C a 63 °C definiu a especificidade exclusiva dos *primers*, individualmente, para cada uma das estirpes CIAT 899 e PRF 81 *versus* outras estirpes de rizóbios próximas e distantes. Em teoria, a faixa da temperatura de anelamento ideal para ensaios de qPCR deve ser igual ou próxima a 60 °C (LIFE TECHNOLOGIES, 2014; SIGMA-ALDRICH, 2014). Entretanto, segundo Bustin e Nolan (2017), quanto maior for o gradiente da temperatura de anelamento dos *primers*, melhor ele pode ser aproveitado em ensaios de qPCR. Os *primers* selecionados aqui para qPCR também operaram bem à temperatura de 60 °C na etapa de anelamento. Porém, por questões de especificidade, principalmente para corridas de qPCR utilizando extratos isolados de solo, raízes e nódulos, empregou-se para os *primers* as temperaturas de anelamento estabelecidas no **Subitem 2.1** do Capítulo 2 dessa Tese.

Conforme demonstrado no presente estudo há uma tendência de aumento da população das estirpes CIAT 899 e PRF 81 nas raízes do feijoeiro e redução no solo rizosférico ao longo do tempo (FIGURA 6). A presença significativa das bactérias inoculadas nos períodos avaliados dentro de 15 dias (TABELA 6) mostra que elas podem ser competitivas para a nodulação do feijoeiro logo nos primeiros dias de sua inoculação. Tendo em vista que nos tratamentos controle a população dessas bactérias foram ausentes nos primeiros dias, e quando detectadas no 12º dia, foi baixa e significativamente diferente dos tratamentos inoculados (TABELA 6). Esta é uma informação importante frente à promiscuidade apresentada pela espécie *P. vulgaris* (RICHARDSON *et al.*, 1995) a qual pode ser nodulada por inúmeras espécies de rizóbios (SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020). A análise de rizóbios nativos do solo utilizado nesse experimento estimou $9,04 \times 10^5$ UFC g⁻¹ (TABELA 2) e o número de nódulos para o tratamento não inoculado foi o segundo maior (TABELA 5). Isso indica que, para esse experimento avaliado em casa de vegetação, as estirpes CIAT 899 e PRF 81 foram eficazes na competição contra os rizóbios nativos do solo utilizado. Como é sabido, os rizóbios nativos são um dos principais entraves para a nodulação bem sucedida por parte de estirpes introduzidas no sistema (DOWLING; BROUGHTON,

1986; THIES *et al.*, 1991). A fertilidade do solo utilizado pode também ter colaborado para melhor infecção das estirpes alvo avaliadas. Tendo em vista os teores elevados de Ca, Mg e P e baixo de N para o solo utilizado (TABELA 2), estes são nutrientes relevantes para o processo de nodulação (HARTWIG, 1998). É importante notar que o processo de inoculação por meio da imersão de sementes no inoculante líquido contendo 10^9 UFC mL⁻¹, talvez tenha colaborado para melhor infecção das raízes do feijoeiro por parte das estirpes CIAT 899 e PRF 81. Conforme proposto por Ji *et al.* (2017) há possibilidade das estirpes de interesse formar nódulos nas raízes antes que as nativas entrem em contato. O aumento significativo da população das estirpes CIAT 899 e PRF 81 nas raízes (FIGURAS 6AB e 7AB) pode ser explicado pela maior infecção por elas, à medida que as raízes se desenvolviam. Para este experimento, a partir do 12º dia já era possível observar nas raízes primórdios de nódulos. O número médio de nódulos observados para as plantas do experimento em discussão estava adequado segundo Yates *et al.* (2016). Esses autores atribuem nota mínima igual a 0 (ausente) e nota máxima igual a 4 (adequado) para 20 ou mais nódulos pequenos ou grandes rosados.

Em relação a quantificação das estirpes alvo no solo, para os tratamentos inoculados com elas individualmente não foi possível plotar uma curva que representasse o comportamento de suas populações ao longo do tempo (FIGURAS 6AC). Porém, observou-se uma tendência de decréscimo de suas populações, assim como para os modelos significativos que representam a população de cada uma delas no solo do tratamento mix (CIAT 899 e PRF 81) (FIGURA 6BD). Segundo Brockwell *et al.* (1995), no solo, a concentração de rizóbios pode chegar à ordem de 10^7 UFC g⁻¹. Cabe ressaltar que, no solo utilizado neste trabalho, a população estava na ordem de $9,04 \times 10^5$ UFC g⁻¹ e o inoculante líquido na concentração igual a 10^9 UFC mL⁻¹. É possível que ao longo do tempo, a população das bactérias inoculadas no solo reduza em função da infecção das raízes em desenvolvimento. Como pode ser observado na Tabela 6, na primeira quantificação feita a partir do DNA isolado das raízes, a população das estirpes CIAT 899 e PRF 81, quantificadas individualmente, já estavam na ordem de 10^6 células g⁻¹, ou seja, dez vezes maior do que no solo da mesma coleta. Tal estabilidade pode ter sido alcançada uma vez que não houve diferença significativa entre o número de cópias para o gene 16S rRNA entre os tratamentos e coletas para a variável solo. Além disso, no ambiente rizosférico há concorrente, e fontes diferentes e limitadas de carbono (HIBBING *et al.*, 2010). Pode ser que isso tenha limitado o crescimento das estirpes inoculadas, no solo. Os autores Couillerot *et al.* (2010) também observaram redução no número de células da estirpe CRT1 da espécie *Azospirillum lipoferum* do inóculo inicial com 10^8 UFC mL⁻¹ para as quantificadas nos solos rizosféricos coletados após 10 dias do cultivo

de milho, inoculado também por imersão em suspensão celular. Entretanto, é importante lembrar que sempre há perdas de ácidos nucléicos no seu processo de extração, para futuro uso em ensaios de qPCR (KRALIK; RICCHI, 2017). Conseqüentemente, nem todas as células bacterianas presentes na amostra de solo são quantificadas.

A respeito da ocupação nodular avaliada neste trabalho, utilizando a técnica de PCR em Tempo Real, acredita-se que possa ser uma alternativa melhor do que outras utilizadas para tal finalidade (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2021). Entretanto, o monitoramento das estirpes CIAT 899 e PRF 81 utilizando *primers* específicos na qPCR traz vantagens no quesito economia de trabalho, tempo e custo. Apesar de utilizar um tampão SYBR® Green I, um pouco mais caro do que os tampões para PCR convencional, a análise final do monitoramento de rizóbios na qPCR utilizando o extrato de nódulos ou até mesmo o DNA genômico extraído desses, descarta etapas tais como sequenciamento, o preparo de gel, eletroforese e o registro de imagem para posterior análise. Isto é possível uma vez que a ausência ou presença dos rizóbios alvo na amostra é definida com base na curva de *melting* após o ensaio de qPCR, a exemplo, das representações nas Figuras 7 e 8. Além disso, os tampões para qPCR são mais específicos do que os utilizados em PCR convencional (FRAGA *et al.*, 2014). E, como o monitoramento de ocupação nodular na qPCR passa a ser semiquantitativo, ou seja, apenas para detectar a presença ou ausência de determinado rizóbio, há liberdade para a escolha do tampão economicamente mais viável, como por exemplo, o GoTaq® qPCR (Promega, Cat. N°./ID: A6002) (APÊNDICE E) utilizado no presente estudo.

No presente estudo utilizou-se o extrato de nódulo na qPCR para determinar a presença ou ausência das estirpes alvo nos nódulos de feijoeiro. Os resultados mostraram alto percentual de ocupação nodular para os tratamentos inoculados comparados ao tratamento controle, sem inoculação (TABELA 5). A taxa de ocupação nodular dos tratamentos inoculados individualmente com a estirpe CIAT 899 ou PRF 81, assemelha-se à observada no Capítulo 2 para cada uma delas, detectadas por meio da técnica de PCR convencional. Entretanto, observou-se uma alta taxa de coinfecção nos nódulos do tratamento mix (CIAT 899 e PRF 81) sendo que 73% dos nódulos se mostraram ocupados com as duas estirpes (TABELA 5). Isso é possível, uma vez que um mesmo nódulo pode ser ocupado por até seis estirpes diferentes (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2020).

O principal intuito do experimento para o presente estudo foi validar e mostrar o potencial dos *primers* desenhados para as bactérias *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 e *R. freirei* estirpe PRF 81, selecionados para o emprego em ensaios de qPCR. Como foi mostrado, esses *primers* são ferramentas moleculares que, por meio da PCR em Tempo Real,

são capazes de elucidar resultados que podem ter correlação com o comportamento populacional das estirpes CIAT 899 e PRF 81 inoculadas em experimentos que avaliem, como por exemplo, a fertilidade do solo (FIGUEIREDO *et al.*, 2016), a co-inoculação com outras BPCV (STEINER; FERREIRA; ZUFFO, 2019) e cultivares de feijoeiro (BEAVER *et al.*, 2021). Portanto, o monitoramento e quantificação dessas bactérias traz mais robustez para os experimentos, mostrando se elas estão ou não residindo no solo e/ou na planta.

5 CONCLUSÃO

É possível quantificar e monitorar com eficiência e especificidade as bactérias *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 e *R. freirei* estirpe PRF 81, utilizando *primers* estirpe-específicos na PCR em Tempo Real.

As estirpes CIAT 899 e PRF 81 são eficazes em infectar desde o estágio inicial, raízes do feijoeiro cultivado em solo contendo população de rizóbios nativos na ordem de 10^5 UFC g^{-1} de solo, em condições de casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

- ABOU-SHANAB, R. A. I. *et al.* Response of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to inoculation with indigenous and commercial Rhizobium strains under organic farming systems in Minnesota. **Symbiosis**, v. 78, n. 2, p. 125–134, 2 jun. 2019.
- AGUILAR, O. M. *et al.* Rapid identification of bean Rhizobium isolates by a nifH gene-PCR assay. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 13, p. 1655–1661, nov. 1998.
- AKIMOVA, E. S. *et al.* Genetic markers for search of rhizobia based on symbiotic genes. **Microbiology**, v. 86, n. 5, p. 640–646, 23 set. 2017.
- ANDREWS, M.; ANDREWS, M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 705, 26 mar. 2017.
- BEAVER, J. S. *et al.* Performance of Mesoamerican bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines in an unfertilized oxisol. **Agronomía Mesoamericana**, v. 32, n. 3, p. 701–718, 1 set. 2021.
- BOONEN, M. *et al.* Quantitative PCR assays to enumerate Rhizobium leguminosarum strains in soil also target non viable cells and overestimate those detected by the plant infection method. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2342–2344, 2010.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J.; THIES, J. E. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. **Plant and Soil**, v. 174, n. 1–2, p. 143–180, jul. 1995.
- BUSTIN, S.; HUGGETT, J. qPCR primer design revisited. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 14, n. March, p. 19–28, 2017.
- BUSTIN, S.; NOLAN, T. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 10, p. 756–774, 2017.
- CHECCUCCI, A. *et al.* Trade, diplomacy, and warfare: The Quest for elite rhizobia inoculant strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. nov, p. 1–7, 2017.
- CHEKANAI, V.; CHIKOWO, R.; VANLAUWE, B. Response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to nitrogen, phosphorus and rhizobia inoculation across variable soils in Zimbabwe. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 266, n. November 2017, p. 167–173, nov. 2018.
- COUILLEROT, O. *et al.* Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain Azospirillum lipoferum CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298–2305, 2010.
- DE SOUZA GODOI, P. A. *et al.* qPCR for the detection of foodborne Trypanosoma cruzi. **Parasitology International**, v. 66, n. 5, p. 563–566, out. 2017.

- DOWLING, D. N.; BROUGHTON, W. J. Competition for Nodulation of Legumes. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 131–157, out. 1986.
- FALEIRO, A. C. *et al.* Real time PCR detection targeting nifA gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, v. 61, n. 3, p. 125–133, 2013.
- FARID, M. *et al.* Response to selection for improved nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**, v. 213, n. 4, p. 1905–1920, 2017.
- FIGUEIREDO, M. A. de *et al.* Adubações nitrogenada e molíbdica e inoculação com *Rhizobium* spp. No feijoeiro-comum em dois latossolos. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 38, n. 1, p. 85–92, 01 jan. 2016.
- FOROOTAN, A. *et al.* Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 12, n. September 2016, p. 1–6, 2017.
- FRAGA, D.; MEULIA, T.; FENSTER, S. Real-Time PCR. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 8, n. 1, p. 10.3.1-10.3.40, 11 fev. 2014.
- FURSETH, B. J.; CONLEY, S. P.; ANÉ, J.-M. Enumeration of Soybean-Associated Rhizobia with Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2591–2596, nov. 2010.
- GOULART, K. C. S. *et al.* Detection and Enumeration of Bradyrhizobia Cells by Real-Time PCR Quantification. **Journal of Agriculture and Environmental Sciences**, v. 4, n. 1, p. 148–154, 2015.
- HARTWIG, U. A. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 1, n. 1, p. 92–120, jan. 1998.
- HIBBING, M. E. *et al.* Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 15–25, 2010.
- HUNGRIA, M. *et al.* Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11–12, p. 1515–1528, out. 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 2, p. 88–93, 1 dez. 2003.
- ILHA, E. C. *et al.* Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 597–606, 2016.
- Jl, Z. J. *et al.* Competition between rhizobia under different environmental conditions affects the nodulation of a legume. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 114–119, mar. 2017.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–9, 2017.

LI, Q. *et al.* Belowground interactions impact the soil bacterial community, soil fertility, and crop yield in maize/peanut intercropping systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 1–16, 2018.

LIFE TECHNOLOGIES. **Real-time PCR handbook**. [s.l.: s.n.].

MACDONALD, C. A. *et al.* Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Rhizobium leguminosarum* bacteria and discrimination between different biovars in zinc-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4626–4633, 2011.

MARTINEZ-ROMERO, E. *et al.* *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 417–426, 1991.

MENDOZA-SUÁREZ, M. *et al.* Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the *Rhizobium*-Legume Symbioses. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. August, 19 ago. 2021.

MENDOZA-SUÁREZ, M. A. *et al.* Optimizing *Rhizobium*-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N₂ fixation in nodules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 18, p. 9822–9831, 2020.

MICHIELS, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, n. 3, p. 193–205, ago. 1998.

MOREIRA, L. P.; OLIVEIRA, A. P. S.; FERREIRA, E. P. DE B. Nodulation, contribution of biological N₂ fixation, and productivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculated with rhizobia isolates. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 6, p. 644–651, 20 jun. 2017.

MORINHA, F.; MAGALHÃES, P.; BLANCO, G. Standard guidelines for the publication of telomere qPCR results in evolutionary ecology. **Molecular Ecology Resources**, 2020.

NAVARRO, E. *et al.* Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231–250, 2015.

NOGUEIRA, C. DE O. G. *et al.* Agronomic efficiency of *Rhizobium* strains from the Amazon region in common bean. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 3, p. 273–276, jul. 2017.

OLIVEIRA, D. P. *et al.* *Rhizobium* strains selected from the Amazon region increase the yield of snap bean genotypes in protected cultivation. **Bragantia**, v. 77, n. 2, p. 292–298, 2018.

- OLIVEIRA, V. M. *et al.* A ribosomal RNA gene intergenic spacer based PCR and DGGE fingerprinting method for the analysis of specific rhizobial communities in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 3, p. 366–379, 2006.
- ONISHCHUK, O. P.; VOROBYOV, N. I.; PROVOROV, N. A. Nodulation competitiveness of nodule bacteria: Genetic control and adaptive significance: Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 131–139, 10 mar. 2017.
- ORMEÑO-ORRILLO, E. *et al.* Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2012.
- PAULO, M. F. B. S. *et al.* Development of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane grown under field conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 31, p. 2937–2946, 30 jul. 2014.
- PEREIRA, T. P. *et al.* Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 7, p. 660–670, 2014.
- PERRET, X.; BROUGHTON, W. J. Rapid identification of *Rhizobium* strains by targeted PCR fingerprinting. **Plant and Soil**, v. 204, n. 1, p. 21–34, 1998.
- PILLAI, S. D. *et al.* Specific detection of rhizobia in root nodules and soil using the polymerase chain reaction. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 9, p. 885–891, set. 1992.
- PORTZ, A. *et al.* Recomendações de adubos, corretivos e de manejo da matéria orgânica para as principais culturas do Estado do Rio de Janeiro. In: FREIRE, L. R. *et al.* (Eds.). **Manual de Calagem e Adubação do Estado do Rio De Janeiro**. 1. ed. Seropédica, RJ: Universidade Rural, 2013. v. 91 p. 430.
- RICHARDSON, A. E. *et al.* Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4–5, p. 515–524, 1995.
- RILLING, J. I. *et al.* Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth–promoting bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 130, n. November 2018, p. 205–219, mar. 2019.
- RITALAHTI, K. M. *et al.* Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2765–2774, 2006.
- ROBERTSON, J. M.; WALSH-WELLER, J. An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 98, n. 12, p. 121–154, 1998.

ROLIM, L. *et al.* Identification of soybean Bradyrhizobium strains used in commercial inoculants in Brazil by MALDI-TOF mass spectrometry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 905–914, 2019.

SCHMIDT, E. L.; BANKOLE, R. O.; BOHLOOL, B. B. Fluorescent-Antibody Approach to Study of Rhizobia in Soil. **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 6, p. 1987–1992, jun. 1968.
SELENSKA-POBELL, S. How to monitor released rhizobia. **Plant and Soil**, v. 166, n. 2, p. 187–191, out. 1994.

SESSITSCH, A. *et al.* Use of marker genes in competition studies of Rhizobium. **Plant and Soil**, v. 204, n. 1, p. 35–45, 1998.

SHAMSELDIN, A.; VELÁZQUEZ, E. The promiscuity of Phaseolus vulgaris L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Springer Netherlands, 2020.

SHIN, K.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Bradyrhizobium isolated from huanglongbing (HLB) affected citrus trees reacts positively with *primers* for Candidatus Liberibacter asiaticus. **European Journal of Plant Pathology**, v. 151, n. 2, p. 291–306, 2018.

SIGMA-ALDRICH. **A Technical Guide PRC Technologies: PRC, RT-PCR, qPCR, TR-qPCR, dPCR**. World Headquarters 3050 Spruce St.; St. Louis, MO 63103: [s.n.].

SOARES, I. C. *et al.* Real-time PCR method to quantify Sp245 strain of Azospirillum baldaniorum on Brachiaria grasses under field conditions. **Plant and Soil**, n. 0123456789, 2021.

STEINER, F.; FERREIRA, H. C. P.; ZUFFO, A. M. Can co-inoculation of Rhizobium tropici and Azospirillum brasilense increase common bean nodulation and grain yield? **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 81, 15 fev. 2019.

SVENNING, M. M. *et al.* Competition for Nodule Occupancy Between Introduced Strains of Rhizobium leguminosarum Biovar trifolii and its Influence on Plant Production. **Annals of Botany**, v. 88, n. 4, p. 781–787, out. 2001.

TAYLOR, S. C. *et al.* The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 761–774, 2019.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. BEN. Influence of the Size of Indigenous Rhizobial Populations on Establishment and Symbiotic Performance of Introduced Rhizobia on Field-Grown Legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 19–28, jan. 1991.

TONG, W. *et al.* Genomic insight into the taxonomy of Rhizobium genospecies that nodulate Phaseolus vulgaris. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 300–310, jul. 2018.

TRABELSI, D. *et al.* Development of real-time PCR assay for detection and quantification of *Sinorhizobium meliloti* in soil and plant tissue. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 355–361, 2009.

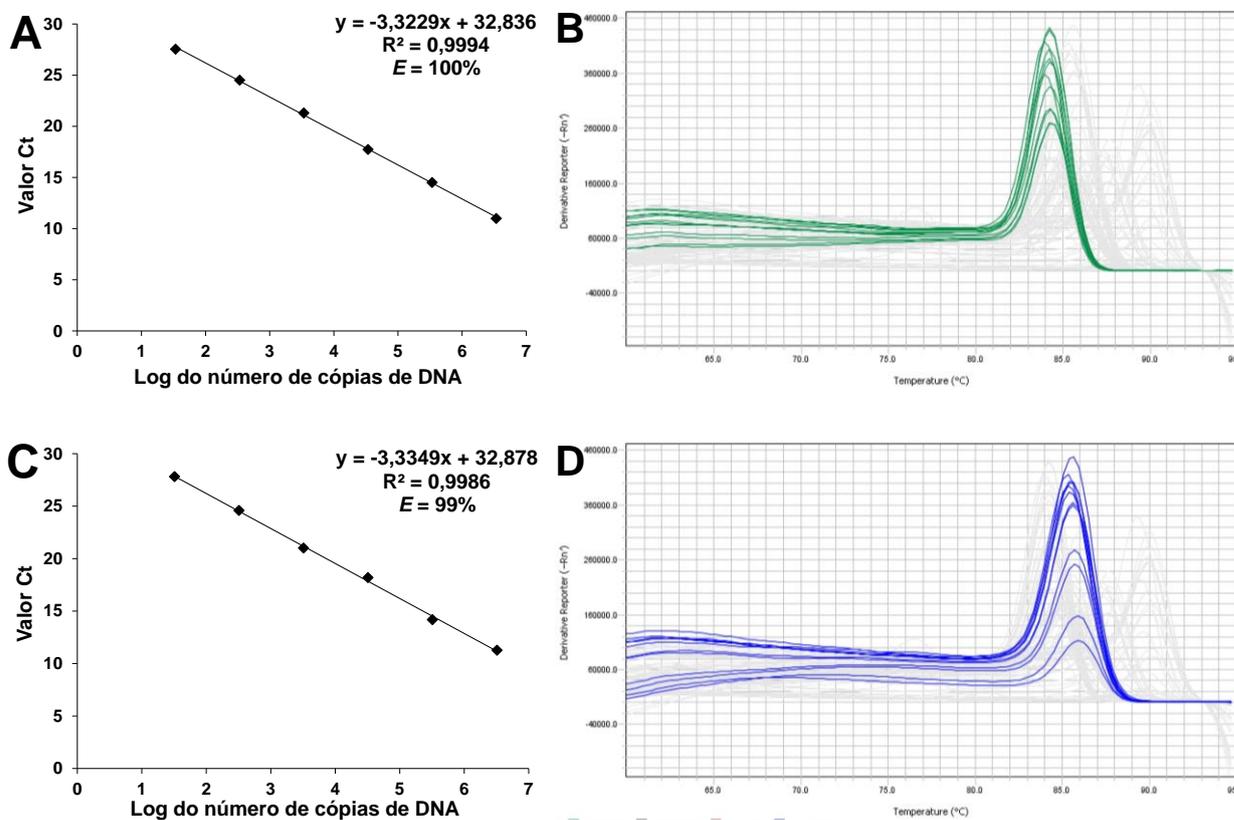
WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating Burkholderia species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 35–43, 2010.

YUDISTIRA, H. *et al.* qPCR assay targeting *Bradyrhizobium japonicum* shows that row spacing and soybean density affects *Bradyrhizobium* population. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 529–536, jul. 2021.

ZHANG, J. *et al.* Rhizobia at Extremes of Acidity, Alkalinity, Salinity, and Temperature. *In: Microbial Versatility in Varied Environments*. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 51–65.

APÊNDICES

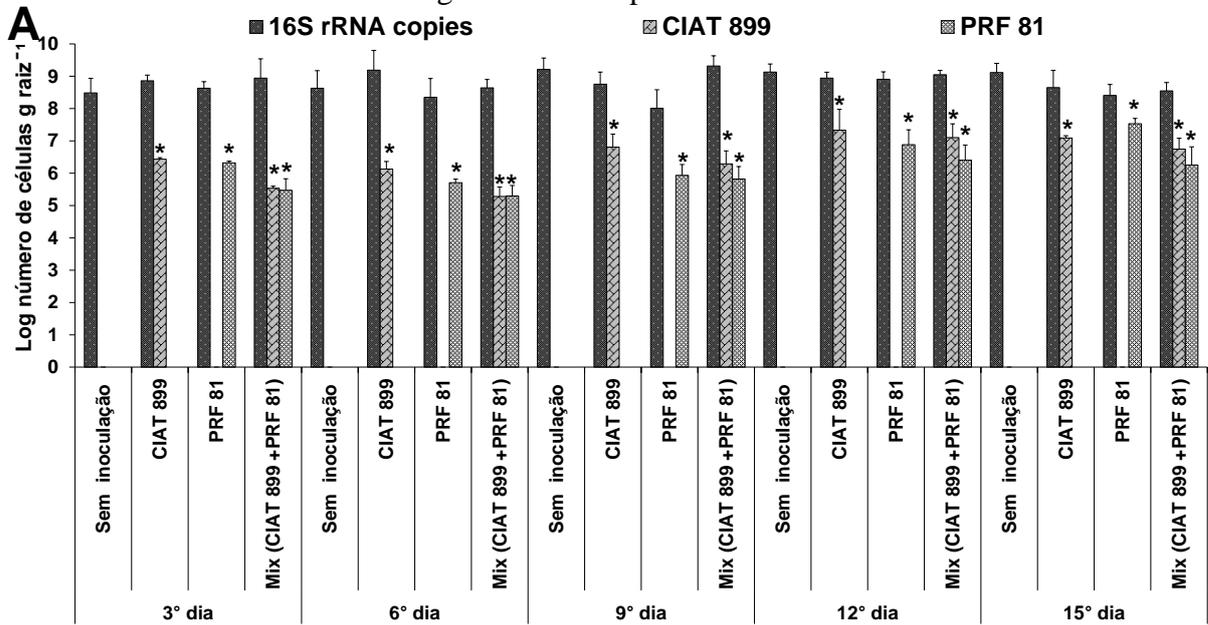
APÊNDICE A — Curva de calibração e de *melting* dos *primers* genéricos Ciat899G22 (A e B) e Prf81G62 (C e D) que amplificam fragmento de DNA alvo no genoma das estirpes CIAT 899 e PRF 81 e de estirpes próximas, respectivamente.



* Significativo dentro de cada coleta pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2022)

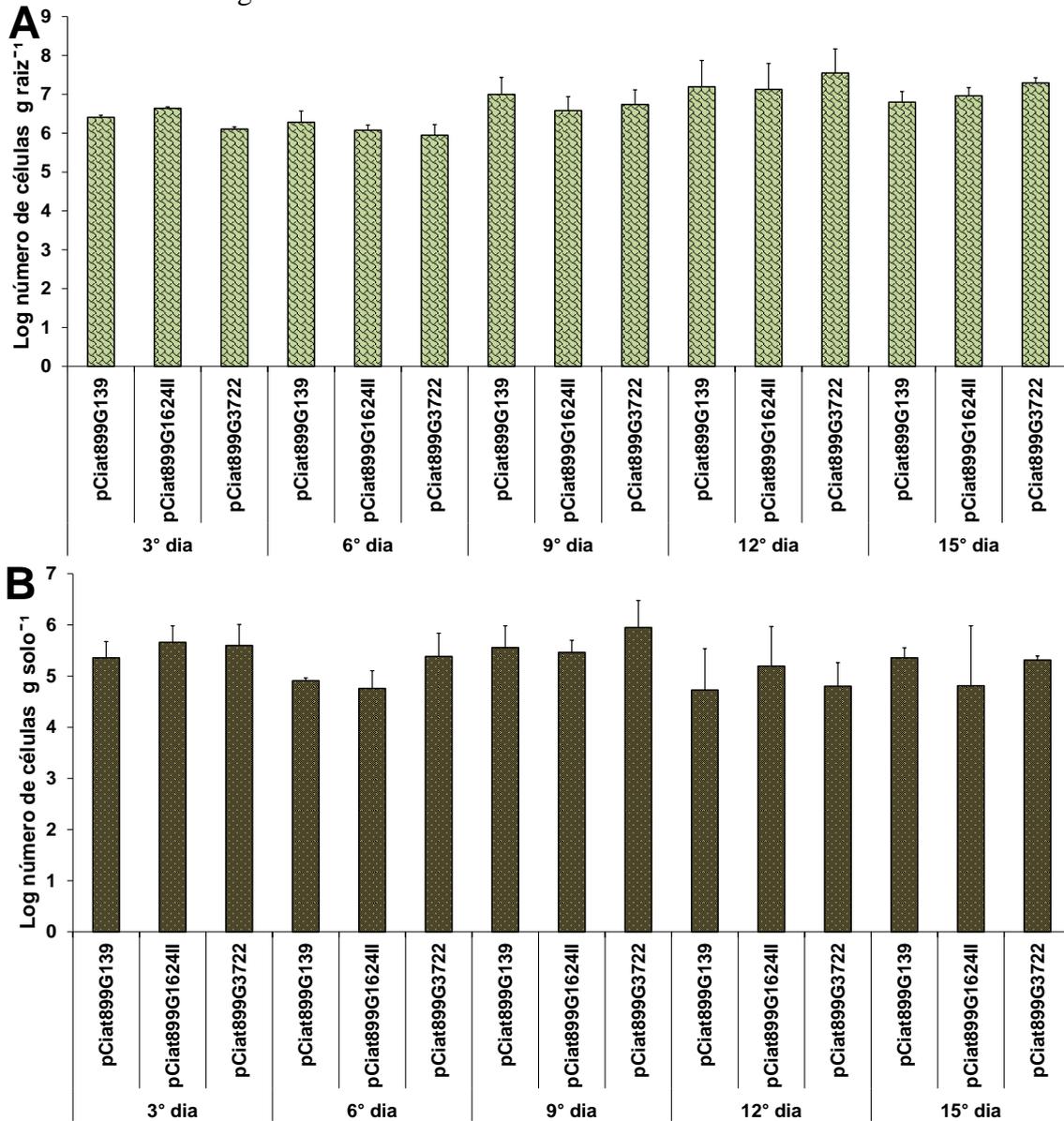
APÊNDICE B — Quantificação do número de cópias do gene 16S rRNA e dos fragmentos de DNA alvo ou número de células das estirpes CIAT 899 e PRF 81 nas A-raízes e B- solo rizosférico do feijoeiro submetido a quatro tratamentos e avaliados ao longo de 15 dias após o sementeio.



* Significativo dentro de cada coleta pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2022).

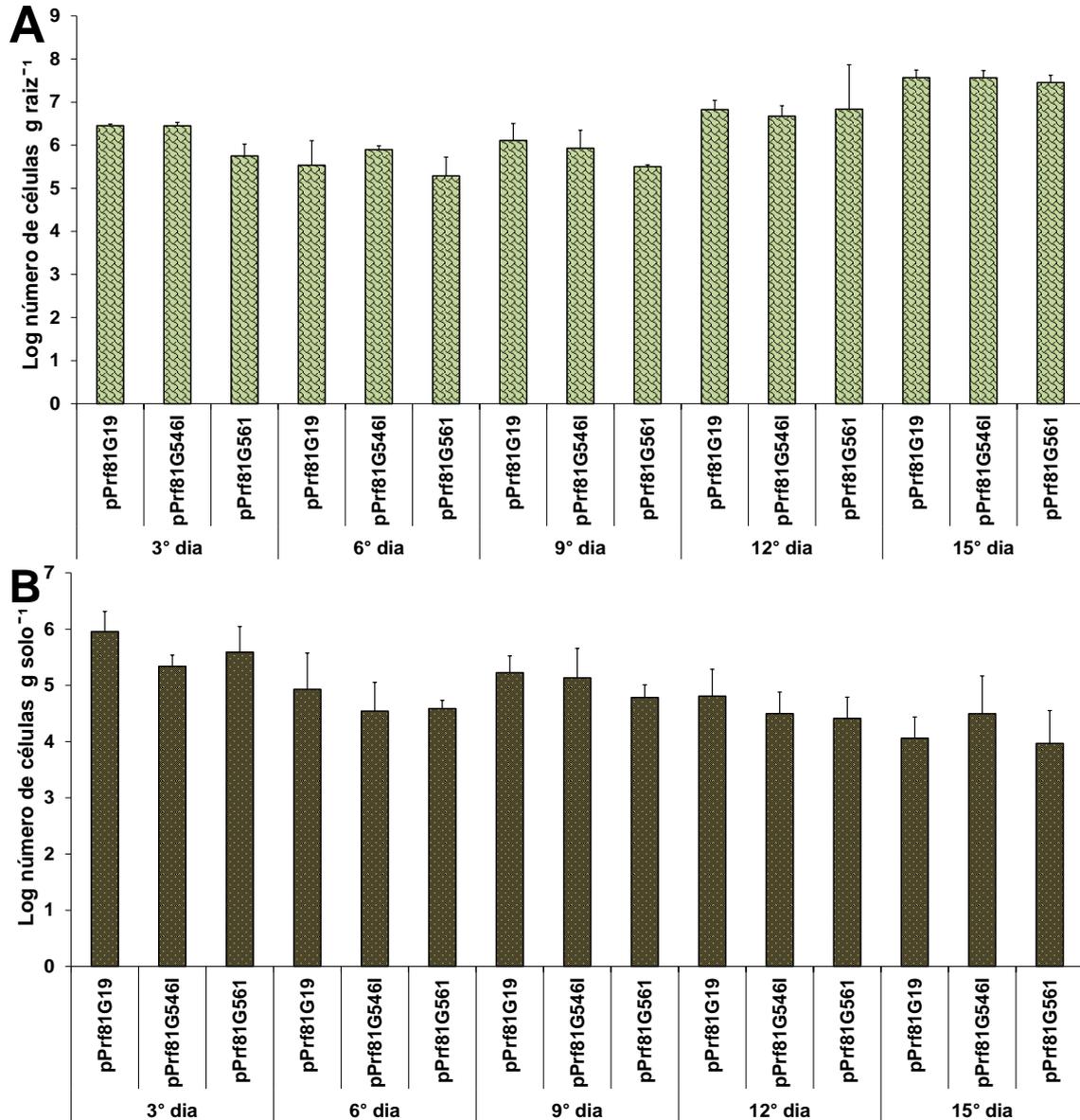
APÊNDICE C – Comparação entre as quantificações realizadas para a população da estirpe CIAT 899 utilizando os *primers* Ciat899G139, 1624II e 3722 nas **A-** raízes e **B-** solo rizosférico do feijoeiro dentro de cinco coletas ao longo de 15 dias.



Não foi identificada diferença significativa entre as quantificações realizadas com os *primers* para a estirpe CIAT 899, dentro de cada coleta, pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE D – Comparação entre as quantificações realizadas para a população da estirpe PRF 81 utilizando os *primers* Prf81G19, 546I e 561 nas **A-** raízes e **B-** solo rizosférico do feijoeiro dentro de cinco coletas ao longo de 15 dias.



Não foi identificada diferença significativa entre as quantificações realizadas com os *primers* para a estirpe PRF 81, dentro de cada coleta, pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE E – Cotação dos mastermixes SYBR® Green I utilizados no presente estudo.

| Master mix | Fornecedor | URL | Preço (\$) ¹ | Preço (\$) μL^{-1} | Preço (\$) $(6,5 \mu\text{L}^2)^{-1}$ | Preço (\$) $(7,5 \mu\text{L}^3)^{-1}$ |
|--|--|---|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Sybr Green Fast SYBR™ Green Master Mix | Applied Biosystems, Cat. N°./ID: 4385612 | https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4385612 | 554,46 | 0,1109 | 0,72 | 0,83 |
| QuantiTect SYBR® Green PCR Kits | Qiagen, Cat. N°./ID: 204143 | https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/probe-based-qpcr/quantitect-pcr-kits/ | 489,00 | 0,0958 | 0,62 | 0,72 |
| GoTaq® qPCR | Promega, Cat. N°./ID: A6002 | https://www.promega.com.br/products/pcr/qpcr-and-rt-qpcr/qpcr-kits/?catNum=A6001 | 314,62 | 0,0629 | 0,41 | 0,47 |

¹ Valores consultado no dia 26/01/2022; ² volume utilizado por reação com 15 μL no presente estudo; ³ volume recomendado pelos kits comerciais para reação com 15 μL .

Fonte: Do autor (2022).

CAPÍTULO 4 AVALIAÇÃO DA OCUPAÇÃO NODULAR PELAS ESTIRPES ELITE CIAT 899, CPAC H12 E PRF 81 EM RAÍZES DE FEIJOEIRO CULTIVADO EM SOLO COM E SEM HISTÓRICO DE CULTIVO COM A CULTURA

RESUMO

O cultivo do feijoeiro em determinada área agrícola pode induzir o aumento no solo de rizóbios nativos capazes de formarem simbiose com a leguminosa. Tendo em vista a facilidade do feijoeiro em ser nodulado por uma ampla diversidade de bactérias, a eficiência da inoculação com rizóbios elite recomendados pode ser baixa. Além do mais, rizóbios nativos são altamente competitivos por sítios de infecção na raiz, podendo eles ser ou não eficientes na fixação de nitrogênio atmosférico. Com base nisso, o presente estudo consistiu na avaliação de parâmetros fitotécnicos atrelados a ocupação nodular do feijoeiro inoculado com as estirpes elite CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81, e cultivado em solo com e sem histórico de cultivo com a cultura. Para isso, foram conduzidos experimentos em campo e em casa de vegetação, dos quais foram avaliados o número e a massa seca de nódulos, massa seca de raiz e parte aérea, massa seca de 100 sementes e produção de grãos. A avaliação de ocupação nodular ocorreu utilizando o extrato de nódulos com *primers* estirpe-específicos na PCR convencional. Os resultados mostraram que tanto a inoculação, quanto a adubação das plantas com N-fertilizante, não contribuíram significativamente para aumentar a produtividade da cultura nas áreas avaliadas. Quanto à ocupação nodular em casa de vegetação não houve diferença significativa independente do histórico dos solos. Entre as estirpes avaliadas, a que mais se destacou foi a CIAT 899, ocupando, em média, 63% e 72% dos nódulos coletados dos tratamentos em que foi inoculada em campo e casa de vegetação, respectivamente. O solo sem histórico de cultivo com feijoeiro apresentou melhores índices de massa seca de raiz e parte aérea e produtividade, bem como número e massa seca de nódulos. Apesar disso, algumas análises exploratórias dos dados mostraram que houve melhor resposta do feijoeiro inoculado quando comparado ao tratamento controle, sem inoculação e dose de N-fertilizante. Porém, fatores como a fertilidade do solo e a infestação de uma das áreas por *Cyperus rotundus* influenciaram na produtividade do feijoeiro. Em função disso, não foi possível concluir se os históricos das áreas, com e sem cultivo do feijoeiro, tiveram relação direta com a ocupação nodular e se ela influenciou a produtividade.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. *Rhizobium tropici*. *Rhizobium freirei*. Ocupação nodular. PCR.

ABSTRACT

Culturing common beans can increase the population of native rhizobia in the soil. Consequently, and given common bean's promiscuity, the inoculation efficiency with recommended elite rhizobia may be reduced. These native rhizobia are highly competitive for root infection sites and may not be efficient in fixing atmospheric nitrogen. Based on this, the present study evaluated phytotechnical parameters linked to the nodular occupation of the common bean inoculated with the elite strains CIAT 899, CPAC H12, and PRF 81 cultivated in soil with and without a recent history of cultivation with the culture. For that, experiments were carried out in the field and a greenhouse, in which the nodule number and dry weight, root and shoot weights, dry weight of one-hundred seeds, and grain yield were evaluated. The nodular occupancy was evaluated using nodule extracts and strain-specific primers in conventional PCR. The results showed that both inoculation and fertilization of plants with N-fertilizer did not significantly increase crop productivity in the evaluated areas. As for the nodular occupation in the greenhouse, there was no significant difference regardless of the soil history. CIAT 899 stood out among the evaluated strains, occupying, on average, 63% and 72% of the nodules collected in the field and the greenhouse, respectively. Grain yield, nodule number, shoot, root, and nodule dry weights were higher in the soil with no previous history of common bean cultivation. Nevertheless, an exploratory analysis showed that the common bean responded better when it was inoculated compared. As a result, it was not possible to conclude whether the histories of the areas, with and without bean cultivation, were directly related to the nodular occupation and whether it influenced productivity.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. *Rhizobium tropici*. *Rhizobium freirei*. Nodular occupation. PCR.

1 INTRODUÇÃO

A produção do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) assim como de outras culturas agrícolas está atrelada à disponibilidade de nutrientes para a planta (BROWN *et al.*, 2021). O macronutriente nitrogênio é essencial para o desenvolvimento vegetativo das plantas, podendo ser disponibilizado para as leguminosas por meio da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Esse processo ocorre por meio da simbiose de plantas, principalmente da família Leguminosae, com bactérias que formam nódulos, geralmente nas raízes, chamadas rizóbios (PEIX *et al.*, 2015). Entretanto, nem todas as bactérias que nodulam leguminosas são eficientes em fixar nitrogênio atmosférico (WESTHOEK *et al.*, 2021). Já as bactérias *Rhizobium tropici* CIAT 899 e CPAC H12 e *R. freirei* PRF 81 consideradas elites por mostrarem ser competentes para nodular e fixar nitrogênio atmosférico (N₂) são comercializadas como inoculante para a cultura do feijoeiro (MARTINEZ-ROMERO *et al.*, 1991; HUNGRIA *et al.*, 2000; MOSTASSO *et al.*, 2002; HUNGRIA *et al.*, 2003). O inoculante ou biofertilizante devem ser capazes de prover o crescimento vegetal, por exemplo, ofertando nutrientes para o aumento de biomassa aérea ou radicular, quando aplicado na semente, solo ou planta (VESSEY, 2003).

Porém, o desempenho de bactérias elites para nodular e fixar N₂ em culturas de interesse agrícola em campo está atrelado a diversos fatores (YATES *et al.*, 2011; MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2021). Dentre eles, um dos mais estudados há bastante tempo é a competição delas com rizóbios residentes no solo (NICOL; THORNTON, 1941; DOWLING; BROUGHTON, 1986; THIES *et al.*, 1991; STREIT *et al.*, 1995; JI *et al.*, 2017; ROPER *et al.*, 2020). Sabe-se que a planta de feijoeiro não possui uma restrição específica simbiótica para ser nodulada (MICHIELS, 1998; MARTÍNEZ-ROMERO, 2003; SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020). Podendo ser nodulada por até 18 espécies dentro do gênero *Rhizobium* hospedeiras também de outras leguminosas (SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020) e outras dentro dos gêneros *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Burkholderia* (YATES *et al.*, 2011). Além do mais, há relatos na literatura de que o cultivo de feijão comum pode aumentar o número de rizóbios nativos na área de cultivo (VLASSAK *et al.*, 1996; VARGAS *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2015). Com isso, cultivos sucessivos de feijoeiro na mesma área pode desfavorecer o efeito da inoculação com estirpes elite (BRITO *et al.*, 2015; RAPOSEIRAS *et al.*, 2006).

Com tudo isso, inferências diretas sobre ganhos de produtividade do feijoeiro em função da inoculação com bactérias elite podem ser equivocadas. Tendo em vista que a

população rizobiana nativa do solo também pode incrementar ganhos de produção por meio da fixação de N₂ em nódulos do feijoeiro (RUFINI *et al.*, 2011). Portanto, torna-se importante saber o grau de infecção por parte das estirpes inoculadas em áreas com histórico de cultivo com feijoeiro.

Diante dessa situação, alguns trabalhos procuram detectar estirpes elite inoculadas em experimentos de campo por meio da ocupação nodular (SVENNING *et al.*, 2001; HUNGRIA *et al.*, 2003; RAPOSEIRAS *et al.*, 2006; ABOU-SHANAB *et al.*, 2019; ROPER *et al.*, 2020). Diversas técnicas são utilizadas para avaliação de ocupação nodular (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2021). Dentre elas, tem as que dependem da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e derivadas, há bastante tempo empregadas (WATSON; SCHOFIELD, 1985; PILLAI *et al.*, 1992; SELENSKA-POBELL, 1994). A partir da PCR convencional é possível identificar uma estirpe alvo por meio do seu perfil de bandas ou *fingerprint* (PERRET; BROUGHTON, 1998; BATISTA *et al.*, 2015; REVELLIN *et al.*, 2018) de um gene amplificado e sequenciado (DOTY *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2014; JI *et al.*, 2017) ou diretamente a partir de um fragmento específico de DNA (WONG-VILLARREAL; CABALLERO-MELLADO, 2010; NAROŽNA *et al.*, 2015). Nesse último caso é mais vantajoso, pois elimina etapas mais onerosas como o sequenciamento ou a adoção de programas de alinhamento para comparação de sequências nucleotídicas ou de perfil de bandas. No Capítulo 2 desse trabalho foram validados *primers* estirpe-específicos para detecção das estirpes bacterianas CIAT 899, CPA CH12 e PRF 81 utilizando a técnicas de PCR convencional. A partir desses *primers* foi possível fazer a análise de ocupação nodular utilizando o extrato de nódulos empregados diretamente na PCR. Essa possibilidade permite maior escalabilidade para avaliação da ocupação nodular, tendo em vista que pula etapas tais como o isolamento, cultivo, e extração de DNA das bactérias ou dos nódulos.

O objetivo do presente estudo foi validar *primers* estirpes-específicos apresentados no Capítulo 2 para as estirpes CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81, a partir de nódulos coletados em experimentos de campo conduzidos em solo com e sem histórico de cultivo com feijoeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estirpes bacterianas utilizadas

Para o presente estudo, inoculantes turfosos e amostras do DNA de cada uma das bactérias *R. tropici* estirpe CIAT 899 (SEMIA 4077) e CPAC H12 (SEMIA 4088) e *R. freirei* estirpe PRF 81 (SEMIA 4080) foram cedidos pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB). Os inoculantes estavam individualmente com a concentração de $3,97 \times 10^8$, $6,21 \times 10^8$ e $5,40 \times 10^8$ UFC g⁻¹ das bactérias CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81, respectivamente.

2.2 Levantamento da população de rizóbios nativos

Antes de montar os experimentos, os solos das duas áreas experimentais foram coletados separadamente, a profundidade de 0-20 cm em 10 pontos distintos. Posteriormente, as amostras para cada uma das áreas foram homogeneizadas e 10 g utilizados para diluição em série a partir de 90 mL de solução salina de NaCl á 0,85% m:v, com fator diluição igual a 10. O volume igual a 1,5 mL das diluições de 10^0 a 10^{-8} foi aplicado, com cinco repetições de cada, em sementes pré-germinadas das seguintes plantas isca: feijoeiro tipo Carioca cv. Pérola, feijoeiro tipo Preto cv. Ouro Negro e Siratro (*Macroptylum atropurpureum*). Estas foram acomodadas em algodão contido por dupla fita de papel filtro, em garrafas comerciais do tipo longneck, contendo aproximadamente 300 mL de solução nutritiva de Norris [1,0 mL K₂HPO₄ 10%; 1,0 mL KCl 10%; 1,0 mL MgSO₄.7H₂O 10%; 0,344 g CaSO₄.2H₂O; 0,5 mL solução de micronutrientes; e 0,5 mL de solução de Ferro]/1000 mL, autoclavadas. Para tal, as sementes de feijão-comum haviam sido desinfestadas superficialmente com álcool 70% v:v por 1 min e hipoclorito de sódio 0,5% v:v por 3 min, enxaguadas 10x com água destilada estéril e distribuídas em placa de Petri contendo papel filtro sobre algodão umedecido com água destilada estéril, vedadas e armazenadas em BOD a 28 °C/48 h. Por sua vez, as sementes de siratro foram escarificadas por 2 min em solução pura de HCl, em seguida desinfestadas por 3 min com peróxido de hidrogênio, enxaguadas por 10x com água destilada estéril e acomodadas conforme descrito para as sementes de feijão-comum. As garrafas foram então acomodadas em casa de vegetação pelo período de 21 dias. Ao final desse período, as plantas de todas as diluições foram avaliadas quanto a presença ou ausência de nódulos, sendo

estimado o número de rizóbios nativos com base nas tabelas de diluições proposta por Woomer (1994).

2.3 Experimentos de campo

Para esse estudo foram montados dois experimentos na área experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), Seropédica, RJ, Brasil. Os experimentos de campo foram montados em duas áreas distintas com (Área 1) e sem (Área 2) histórico de cultivo recente de feijoeiro (FIGURA 1). Na Área 1, a cultivar Pérola do feijoeiro foi cultivada no ano de 2018, sendo inoculada com a estirpe CIAT 899 e diferentes doses de *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7 conforme descrito por Leite *et al.* (2022). Detalhes sobre adubação, níveis de inoculação e produtividade são apresentados pelos mesmos autores. A área permaneceu em pousio até a montagem do novo experimento. A Área 2 havia sido cultivada anteriormente com soja (*Glycine max*) proporcionando produtividade média de 3.233 kg ha⁻¹. Amostras do solo (Argissolo) das Áreas 1 e 2 foram coletadas separadamente, homogeneizadas e utilizadas para análise química e biológica (TABELA 1). Com base nos teores de Ca e Mg da análise química do solo, não foi lançado calcário nas áreas avaliadas. Porém, foi realizada adubação com fósforo (P) em ambas as áreas na dose equivalente a 130 kg de P₂O₅ ha⁻¹ e com potássio (K) apenas na Área 1 na dose eq-uivalente a 30 kg de K₂O ha⁻¹, conforme o manual de calagem e adubação do estado do Rio de Janeiro para a cultura do feijoeiro (PORTZ *et al.*, 2013).

Os experimentos foram montados no delineamento de blocos ao acaso, com seis tratamentos e três repetições. Os seguintes tratamentos foram avaliados: inoculações individuais com (i) *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899; (ii) *R. tropici* estirpe CPAC H12; (iii) *R. freirei* estirpe PRF 81; (iv) Mix, mistura das três estirpes (1:1:1); e dois controles, sendo um adubado com N-fertilizante (v) e o outro, um controle absoluto, isto é, não inoculado e sem adução com N (vi).

Utilizou-se a variedade Pérola, com grão do tipo Carioca, hábito de crescimento tipo II/III, arquitetura indeterminado e porte semiereto, ciclo de 95 dias e massa de 100 grãos com 14% de umidade igual a 27 g. As sementes dos tratamentos inoculados receberam inoculante turfoso (10⁸ UFC g⁻¹) para que ficassem com uma concentração final de aproximadamente 10⁶ UFC por semente. Os tratamentos nitrogenados receberam o equivalente a 80 kg ha⁻¹ de N, sendo 20 kg ha⁻¹ na semeadura, e o restante em partes iguais aos 20 e 40 dias após a emergência (DAE), utilizando-se a ureia como fonte de N. As parcelas continham dimensões de 5 x 5 m (25 m²) com dez linhas espaçadas 0,5 m entre si. Foi utilizada nas linha,s a

densidade de 15 sementes por metro linear, as sementes apresentaram potencial de germinação igual a 80%, ficando as parcelas com adensamento equivalente a 240.000 plantas por hectare. Os experimentos foram irrigados por um período de 2 h e turno de rega de 2 dias. O controle de plantas espontâneas foi realizado duas semanas após a semeadura com os herbicidas Flex e Fusilede 250 EW, ambos seletivos para feijoeiro, na dosagem equivalente a 1,0 e 1,2 L ha⁻¹, respectivamente.

Para as análises, realizou-se coletas de 12 plantas por parcela de cada uma das Áreas 1 e 2, aos 25 e 45 dias após a semeadura (DAS). As coletadas ocorreram nas duas linhas de cada extremidade, excluindo a bordadura. Dessas, nove plantas foram utilizadas para avaliação dos seguintes parâmetros fitotécnicos: número de nódulos maiores do que 2 mm (NN >2mm), número de nódulos total (NN total), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA). Para isso, a parte aérea foi separada da raiz na cicatriz dos cotilédones e os nódulos, destacados, separados por peneira de 2 mm e contados. Para a obtenção da massa seca, as partes vegetais foram armazenadas a 65 °C até peso constante. As outras três plantas foram utilizadas para avaliação da taxa de ocupação nodular. Para tal, 90 nódulos de cada tratamento, 30 por parcela, foram destacados das raízes, desinfestados superficialmente por 30 s em álcool 70%, enxaguados com água destilada, imersos por mais 3 min em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, enxaguados por 5x com água destilada estéril, secos em papel toalha e armazenados em freezer a -20 °C. Para a avaliação da produtividade em kg ha⁻¹ foram utilizadas as quatro linhas centrais de cada parcela, sendo que os grãos colhidos tiveram umidade relativa corrigida para 13% (BRASIL, 2009). Além disso, avaliou-se também o peso seco constante de 100 sementes, sendo elas desidratadas em estufa por 24 h a 65 °C (BRASIL, 2009).

Tabela 1 – Resultado da análise química e microbiológica dos solos utilizados no experimento desse trabalho.

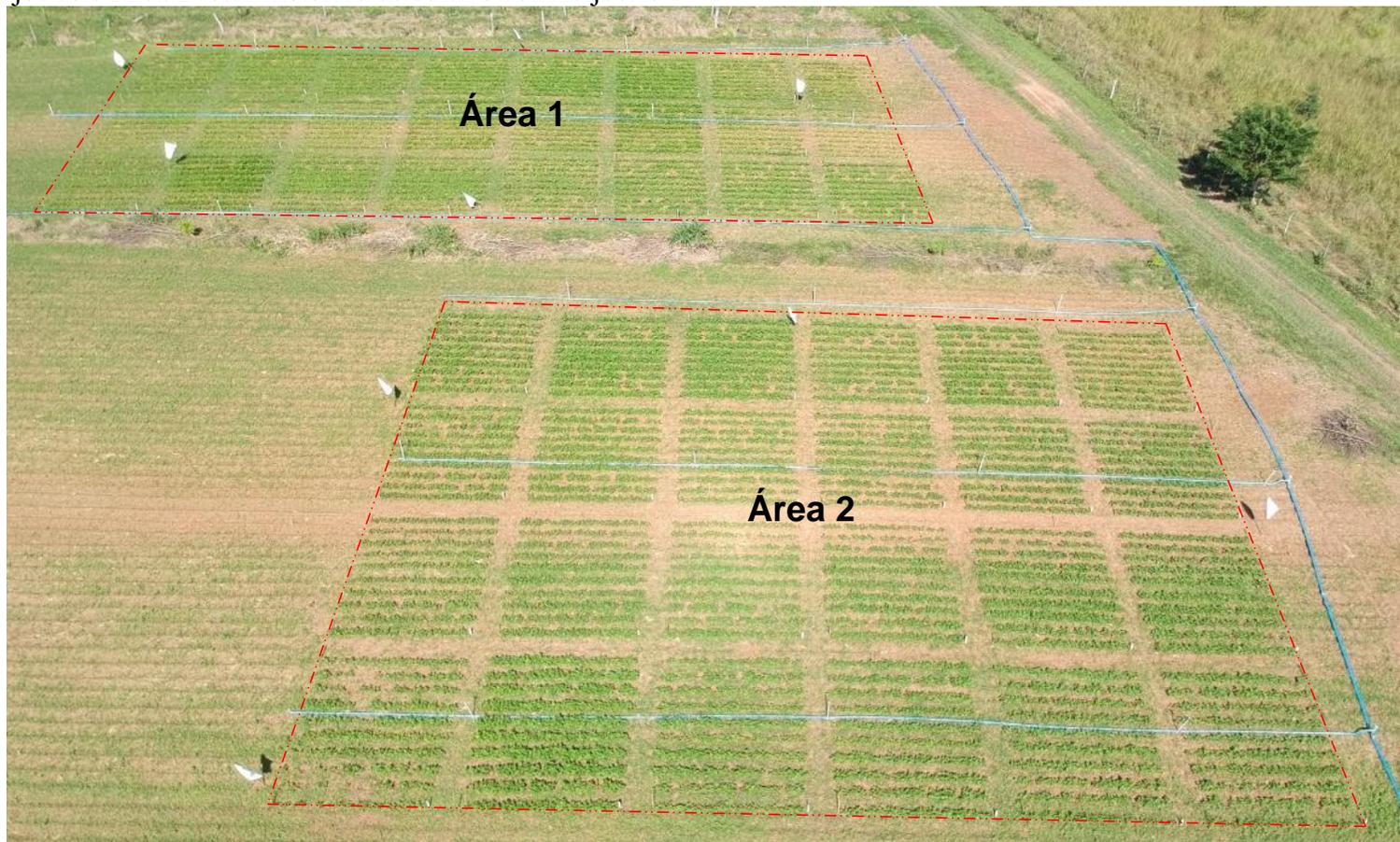
| Solo | pH und | Al | H+Al cmol _c dm ⁻³ | Ca+Mg | K mg L ⁻¹ | P | C %..... | N | SB ¹ | CTC ² | SB ³ % | Rizóbios nativos (CFU g ⁻¹ solo) ⁴ | | |
|--------------|-----------|----------------------|--|-------|--|------|----------------------|------|-----------------|------------------|----------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| | | | | | | | | | | | | A | B | C |
| 1- Argissolo | 5,50 | 0,04 | 3,53 | 3,81 | 58,76 | 4,64 | 0,77 | 0,09 | 3,96 | 7,49 | 52,87 | 3,20 x10 ³ | 4,78 x10 ³ | 2,81 x10 ⁴ |
| 2- Argissolo | 5,90 | 0,00 | 2,71 | 3,51 | 109,76 | 3,95 | 0,77 | 0,10 | 3,79 | 6,50 | 58,30 | 1,58 x10 ³ | 5,62 x10 ⁵ | 7,94 x10 ⁵ |

¹ Soma de Bases; ² Capacidade de troca de cátions; ³ Saturação de Bases = ((K+Ca+Mg)/Tcec)×100, onde Tcec = K+Ca+Mg+ acidez total em pH 7.0 (H+Al);

⁴ Estimado pelo método Número Mais Provável (MPN) (WOOMER, 1994) usando como planta isca feijão comum **A**- tipo Carioca variedade Pérola, **B**- tipo Preto variedade Ouro Negro e **C**- siratro (*Macroptylum atropurpureum*) (n = 5).

Fonte: Do autor (2022).

Figura 1 — Áreas de campo utilizadas para experimentação com feijoeiro no presente estudo, sendo a Área 1- com histórico de cultivo com feijoeiro e Área 2- sem histórico de cultivo com feijoeiro



Experimento conduzido entre 09/05/2019 e 11/08/2019 no Terraço, campo experimental, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, BRA.

Fonte: Do autor (2022).

2.4 Experimento em casa de vegetação

Conduziu-se um experimento em casa de vegetação utilizando vasos de 3,7 L preenchidos com solos das Áreas 1 e 2. Isso possibilitou tornar o solo mais um fator e fazer a aleatorização para a comparação entre eles. Nesse experimento foram avaliados os mesmos tratamentos empregados em campo, entretanto, com oito repetições cada, totalizando 48 unidades experimentais para cada um dos solos, arranjadas no delineamento inteiramente casualizado (DIC) em fatorial (6 X 2). A inoculação das sementes para esse ensaio ocorreu conforme descrito no subitem anterior. Em cada vaso foram semeadas cinco sementes, sendo que, após a germinação, três plântulas foram desbastadas, deixando-se apenas as duas mais vigorosas. Para todos os experimentos foram realizadas duas coletas destrutivas, aos 25 e 45 DAS. A obtenção dos dados fitotécnicos ocorreu conforme descrito para os experimentos de campo, porém, com duas plantas como unidades amostrais por parcela. A avaliação de ocupação nodular foi realizada apenas para a primeira coleta, para tal, 30 nódulos de cada tratamento foram aleatoriamente destacados das raízes.

2.5 Avaliação de ocupação nodular

Para a avaliação da ocupação nodular por meio de PCR convencional, os nódulos de aproximadamente 2 mm que haviam sido coletados dos experimentos de campo e casa de vegetação, separadamente, foram apertados com auxílio de pinça estéril em microtubo de 0,5 mL contendo 90 µL de água ultrapura. Ao mix para PCR adicionaram-se 2,0 µL do extrato de nódulo, 1,5 µL de Tween 20 2% (v:v), 3,0 µL de buffer 5x, 0,3 µL de dNTP 10 mM, 0,15 µL de Taq Polimerase 5 U, MgCl₂, *primers* (F/R) e água ultra pura para o volume final de 15,0 µL. As concentrações de *primers* e MgCl₂ bem como as condições da PCR são informadas na Tabela 2. A ocupação nodular foi confirmada com base na observação de ampliações específicas por dois pares de *primer* para cada bactéria alvo (TABELA 2). Os *primers* Ciat899G166 e Ciat899G1624 desenhados para a estirpe CIAT 899 foram utilizados também para o monitoramento da estirpe CPAC H12 a partir dos extratos de nódulos coletados nas parcelas que receberam tratamento com essa estirpe. A Equação 1 foi utilizada para calcular a eficiência de ocupação nodular de cada uma das estirpes alvo (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2020).

$$CI = (Na/Nt) * 100 \quad (1)$$

Onde, CI é competitividade, Na é o número de nódulos ocupados com a estirpe alvo e Nt é o número de nódulos total avaliados por tratamento.

Tabela 2 — Concentrações de reagentes e condições ideais de PCR convencional para os primers que detectam as estirpes elite CIAT 899 ou CPAC H12 e PRF 81.

| Espécie Estirpe | Reagentes | | Condições de PCR | | |
|---|-------------------|------------------------|------------------|-------------------------|---|
| | Nome do primer | Sequência (5'-3') | PCR nM | MgCl ₂ mM | Desnaturação/Anelamento/ Extensão |
| <i>R. tropici</i> (CIAT 899 ou CPAC H12) | Ciat899G166 F | CCTTCACTTGCAGATCAAGC | 120 | 1,7 | 95 °C por 5 min (95 °C por 15 s, 62°C por 30 s, 72 °C por 30 s) x 30 ciclos, 72 °C por 5 min |
| | Ciat899G166 R | CAACGTCATAATGTTCCATCGG | 120 | | |
| | Ciat899G1624 F | AGACGAGTTCTTCGACGAGTAG | 140 | 1,7 | 95 °C por 2 min (95 °C por 30 s, 63 °C por 30 s, 72 °C por 30 s) x 32 ciclos, 72 °C por 5 min |
| | Ciat899G1624 R | GTTGATGACCTTCTCGGCG | 140 | | |
| <i>R. freirei</i> (PRF 81) | Prf81G222II F | AGCTCGGTATGTCCTCATCG | 133 | 1,0 | 95 °C por 2 min (95 °C por 15 s; 62 °C por 30 s, 72 °C por 30 s) x 32 ciclos, 72 °C por 5 min |
| | Prf81G222II R | ACCCGCATCCGACAGTGT | 133 | | |
| | Prf81G561 F | GAGGTGGATCTTCTGATCG | 167 | 2,0 | 95 °C por 5 min (95 °C por 15 s; 62 °C por 30 s; 72 °C por 30 s) x 35 ciclos, 72°C por 5 min |
| | Prf81G561 R | CTCGGGTAAGTCTCGTATC | 167 | | |

Fonte: Do autor (2022).

2.6 Avaliação da diversidade de rizóbios nativos

Para o levantamento da diversidade de rizóbios nativos das Áreas 1 e 2 utilizou-se o *primer* de ligação aleatória RPO1 (RICHARDSON *et al.*, 1995). Esse *primer* foi empregado na PCR convencional junto com amostra do extrato de nódulo coletado de tratamento sem inoculação e N-fertilizante, controle absoluto. No total, foram avaliados 120 extratos de nódulos representativos de cada uma das áreas e como padrão o DNA genômico das estirpes CIAT 899 e PRF 81. As reações foram montadas utilizando 3,0 μL de buffer 5x, 1,5 μL de MgCl_2 25 mM, 0,5 μL de dNTP 10 mM, 2,0 μL de *primer* RPO1 10 μM , 2,0 μL de Tween® 20 2% v:v, 0,15 μL de DNA Taq polimerase 5 U, 2,0 μL do extrato de nódulo e água ultrapura para o volume final de 15,0 μL . As reações foram realizadas a 96 °C for 5 min, para desnaturação inicial, 40 ciclos a 95 °C for 1 min; 55 °C for 1 min (anelamento) e 72 °C for 2 min e uma etapa de extensão final 72 °C for 7 min. O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 3% m:v e submetido a eletroforese (70 V 3 h⁻¹) e, em seguida, corado com brometo de etídeo, descorado sob agitação com água destilada por 5 h e fotodocumentado para posterior análise. O perfil de bandas amplificadas na PCR utilizando o *primer* PRO1 foi utilizado para a análise da relação genética entre os rizóbios nativos presentes nos extratos de nódulos utilizando o programa BioNumerics v.7.6 (APPLIED MATHS, BÉLGICA). O agrupamento de matrizes de similaridade foi realizado pelo algoritmo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) e as matrizes de similaridade para a construção do dendrograma foram calculadas pelo coeficiente de correlação de Jaccard sendo os níveis de otimização igual a 0,85% e tolerância de 2,0% e linha de corte para 70% de similaridade.

2.7 Estatística

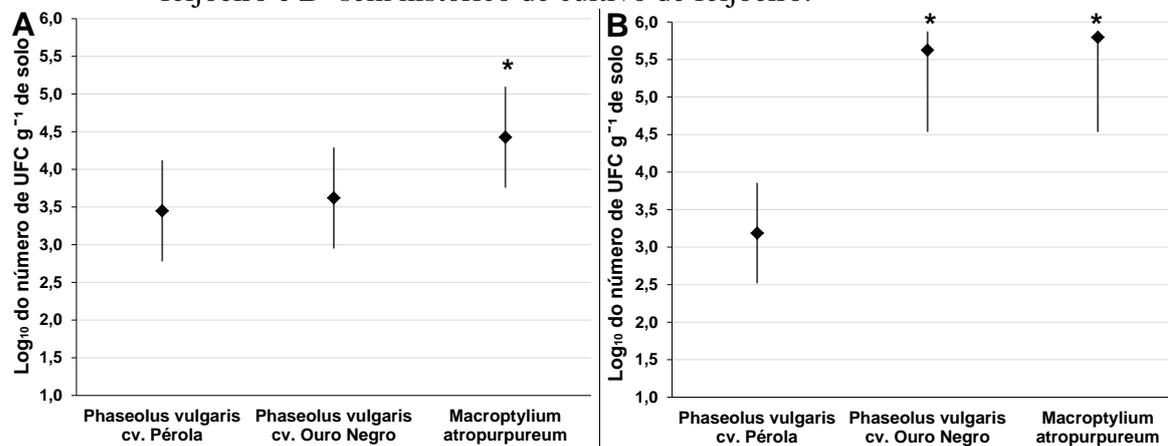
Os dados foram analisados quanto a distribuição normal pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e homocedasticidade pelo teste de Bartlett ($p > 0,05$) ANOVA ($p < 0,05$). Uma vez atendidos os pressupostos, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de média Duncan ($p < 0,05$) utilizando o pacote *easyanova* (ARNH-OLD, 2013) no programa R (R CORE TEAM, 2021). As médias de produtividade dos tratamentos inoculados para as duas áreas foram comparadas pelo teste Meta-análise pelos modelos de efeitos comuns e de efeitos aleatórios ($p < 0,05$). Além disso, utilizando as médias das variáveis coletas de plantas de ambas as áreas foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA).

3 RESULTADOS

3.1 Populações de rizóbios nativos das áreas com e sem histórico prévio de cultivo com feijoeiro

As populações de rizóbios nativos capazes de nodular o siratro foram de 10^5 e 10^6 UFC g^{-1} solo nas áreas com e sem histórico de cultivo com feijoeiro, respectivamente (FIGURA 2). As populações de rizóbio nativo capazes de nodular o feijoeiro foram, em média igual, a $10^{3,5}$ e $10^{4,3}$ UFC g^{-1} nas Áreas 1 e 2, respectivamente. A variedade Ouro Negro foi a segunda a detectar maior número de rizóbios nativos na ordem de $10^{3,6}$ UFC g^{-1} de solo da área 1 e $10^{5,6}$ UFC g^{-1} de solo da Área 2. A população de rizóbios nativos que nodulou a cultivar Pérola, avaliada nesse trabalho, estava na mesma ordem de grandeza, 10^3 UFC g^{-1} de solo de ambas as áreas experimentais (FIGURA 2). Na Área 1 o siratro apresentou resultado significativo para maior população de rizóbios nativos em relação as demais plantas iscas. Já na Área 2, a população de rizóbios nativos foi estatisticamente igual para o siratro e feijoeiro cv. Ouro Negro e diferente da detectada pela variedade de feijoeiro cv. Pérola.

Figura 2 – População de rizóbios nativos detectados a partir das plantas-isca feijoeiro cv. Pérola e Ouro Negro e siratro nas áreas **A**- com histórico de cultivo com feijoeiro e **B**- sem histórico de cultivo de feijoeiro.



*significativo conforme análise do teste NMP (WOOMER, 1994).

Fonte: Do autor (2022).

3.2 Experimento de campo em áreas com e sem histórico prévio de cultivo com feijoeiro

Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis avaliadas na área com histórico de cultivo com feijoeiro, com exceção da MSPA na primeira coleta, que foi maior no tratamento que recebeu N-fertilizante ($p < 0,05$) (TABELA 3). Juntos, os tratamentos inoculados produziram 1.421 kg ha⁻¹ de grãos a mais do que o controle absoluto. Observou-se baixa ocupação nodular em nódulos dos tratamentos Mix e CPAC H12, bem como a ausência da estirpe alvo nos nódulos do tratamento que recebeu a estirpe PRF 81. Porém, a estirpe CIAT 899 ocupou 54% dos nódulos avaliados no tratamento inoculado apenas com ela (TABELA 3).

Tabela 3 — Resultados da 1ª e 2ª coleta realizadas aos 25 e 45 DAS, respectivamente, para as variáveis número de nódulo maiores que 2 mm (NN > 2mm), número de nódulos totais (NN_{total}), massa seca de nódulo (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA), ocupação nodular (ON), massa seca de 100 sementes (M100s) e produtividade de plantas de feijoeiro inoculadas com estirpes elite de rizóbios cultivadas na área com histórico de cultivo de feijoeiro (Área 1) sob diversos tratamentos inoculados e controles, médias de 3 repetições ($n = 3$).

| 1ª coleta | | | | | | | | | |
|------------|-------|-------|-------|---------|----------|--------|----------------------|----------|--------|
| Trat. | Var. | NN | NN | MSN | MSR | MSPA | Ocupação nodular (%) | | |
| | > 2mm | > 2mm | total | mg | mg | g | CIAT 899 | CPAC H12 | PRF 81 |
| CIAT 899 | | 18 a | 41 a | 39,02 a | 309,00 a | 1,21 b | 54 | nd | nd |
| CPAC H12 | | 20 a | 50 a | 54,27 a | 292,33 a | 1,26 b | nd | 07 | nd |
| PRF 81 | | 24 a | 67 a | 57,59 a | 357,66 a | 1,27 b | nd | nd | nd |
| Mix | | 20 a | 67 a | 48,77 a | 319,00 a | 1,25 b | 07 | 07 | nd |
| Cont. Abs. | | 13 a | 36 a | 34,28 a | 332,33 a | 1,37 b | nd | nd | nd |
| D80kgN | | 23 a | 58 a | 50,79 a | 453,00 a | 1,84 a | nd | nd | nd |

| 2ª coleta | | | | | | | | |
|------------|-------|-------|-------|---------|----------|--------|---------|---------------------|
| Trat. | Var. | NN | NN | MN | MSR | MSPA | M100s | Rendimento |
| | > 2mm | > 2mm | total | mg | mg | g | g | kg ha ⁻¹ |
| CIAT 899 | | 13 a | 40 a | 44,15 a | 675,33 a | 3,24 a | 22,26 a | 1.037,84 a |
| CPAC H12 | | 16 a | 47 a | 51,15 a | 766,33 a | 3,69 a | 22,12 a | 931,63 a |
| PRF 81 | | 8 a | 39 a | 31,26 a | 708,00 a | 4,12 a | 22,65 a | 1,208,62 a |
| Mix | | 13 a | 45 a | 48,82 a | 676,74 a | 3,40 a | 22,41 a | 1,186,79 a |
| Cont. Abs. | | 12 a | 36 a | 46,11 a | 700,00 a | 4,45 a | 23,51 a | 735,62 a |
| D80kgN | | 12 a | 31 a | 33,64 a | 842,66 a | 4,50 a | 24,19 a | 1.876,56 a |

Letras iguais na coluna indica ausência de significância pelo teste de Duncan ($p < 0,05$); nd: não detectado; Mix: CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81.

Fonte: Do autor (2022).

Os resultados observados na área sem histórico de cultivo do feijoeiro foram similares ao da área com histórico. Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para MSPA durante a primeira coleta, onde o tratamento inoculado com N-fertilizante proporcionou uma maior MSPA se comparado aos demais. Também houve incremento equivalente a 2.010 kg

ha⁻¹ de grãos por parte dos tratamentos inoculados em conjunto, se comparado ao não inoculado sem dose de N-fertilizante (TABELA 4). A estirpe CIAT 899 foi detectada em mais de 72% dos nódulos do tratamento inoculado apenas com ela. Mais uma vez, a estirpe CPAC H12 foi detectada em uma baixa proporção dos nódulos e a estirpe PRF 81 não foi detectada em nenhum dos tratamentos.

Tabela 4 — Resultados da 1ª e 2ª coleta realizadas aos 25 e 45 DAS, respectivamente, para as variáveis número de nódulo maiores que 2 mm (NN > 2mm), número de nódulos totais (NN_{total}), massa seca de nódulo (MSN), massa seca de raiz (MSR) massa seca de parte aérea (MSPA), ocupação nodular (ON), massa seca de 100 sementes (M100s) e produtividade de plantas de feijoeiro inoculadas com estirpes elite de rizóbios e cultivadas na área sem histórico de cultivo de feijoeiro (Área 2) sob diversos tratamentos inoculados e controles, médias de 3 repetições (n = 3).

| 1ª coleta | | | | | | | | |
|------------|-------|-------|----------|-----------|---------|----------------------|----------|--------|
| Var. | NN | NN | MSN | MSR | MSPA | Ocupação nodular (%) | | |
| | >2mm | total | mg | mg | g | CIAT 899 | CPAC H12 | PRF 81 |
| CIAT 899 | 54 a | 90 a | 143,38 a | 374,33 ac | 1,51 ab | 72 | nd | nd |
| CPAC H12 | 25 ab | 73 ab | 137,30 a | 403,33 ab | 1,65 a | nd | 01 | nd |
| PRF 81 | 28 ab | 64 ab | 86,53 a | 369,00 ac | 1,33 ab | nd | nd | nd |
| Mix | 34 ab | 69 ab | 108,04 a | 350,00 bc | 1,27 ab | 28 | 28 | nd |
| Cont. Abs. | 12 b | 47 b | 62,67 a | 251,00 c | 1,13 b | nd | nd | nd |
| D80kgN | 26 ab | 48 b | 63,21 a | 497,66 a | 1,67 a | nd | nd | nd |

| 2ª coleta | | | | | | | |
|------------|-------|-------|----------|------------|--------|---------|---------------------|
| Var. | NN | NN | MSN | MSR | MSPA | M100s | Rendimento |
| | >2mm | total | mg | mg | g | g | kg ha ⁻¹ |
| CIAT 899 | 30 a | 72 a | 127,75 a | 933,33 a | 6,14 b | 24,90 a | 2.794,07 a |
| CPAC H12 | 12 b | 49 ab | 51,15 a | 885,00 a | 5,53 b | 25,15 a | 2.591,80 a |
| PRF 81 | 13 ab | 40 b | 86,40 a | 872,33 a | 5,35 b | 23,57 a | 2.514,44 a |
| Mix | 14 ab | 52 b | 75,30 a | 883,33 a | 5,31 b | 23,66 a | 2.142,13 a |
| Cont. Abs. | 16 ab | 40 b | 79,57 a | 844,33 a | 4,94 b | 24,55 a | 2.008,11 a |
| D80kgN | 15 ab | 40 b | 60,85 a | 1.211,33 a | 7,93 a | 24,09 a | 2.923,92 a |

Letras iguais na coluna indica ausência de significância pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$); nd: não detectado; Mix: CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81.

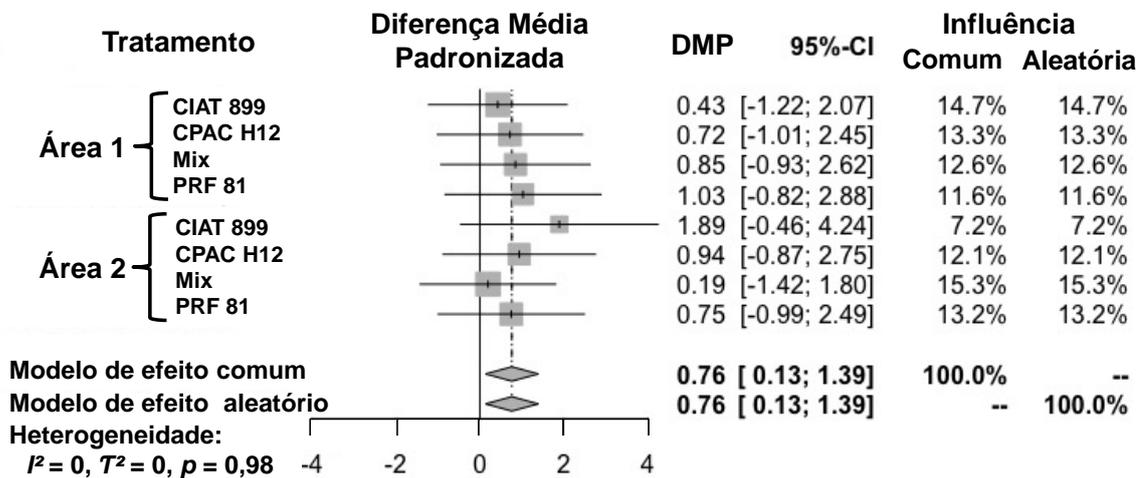
Fonte: Do autor (2022).

A diferença de produtividade observada entre as Áreas 1 e 2, em média 1.334 kg ha⁻¹, pode ter sido em função da fertilidade solo (TABELA 1) e/ou pela infestação da Área 1 por tiririca (*Cyperus rotundus*) (APÊNDICE A). Em apenas uma parcela de 25 m², no estágio inicial de plantas do feijoeiro, foram coletados 1,126 kg de massa fresca de *C. rotundus* o equivalente a 450 kg ha⁻¹ (APÊNDICE A). E, o controle químico com os herbicidas Flex e Fusilede 250 EW não foi eficiente em controlar a planta daninha (APÊNDICE A).

No entanto, os dados de produtividade das duas áreas mostram que apesar de ter havido incrementos em função da inoculação, eles não foram significativos pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$). Isso provavelmente deve ter ocorrido devido à alta variação entre as médias de produtividade obtidas para cada uma das áreas (APÊNDICE B). No entanto, os

dados referentes aos tratamentos inoculados de ambas as áreas, analisados em conjunto pela técnica de Meta-análise, mostrou evidência para um efeito significativo da inoculação sobre a produtividade ($p < 0,05$), tanto pelo modelo de efeito comum quanto pelo modelo de efeito aleatório (FIGURA 3). Por vez, a Meta-análise evidencia que a inoculação do feijoeiro com a estirpe CIAT 899, na área sem histórico de cultivo da cultura, teve um efeito positivo na produtividade em kg ha^{-1} . Além da produtividade, o número e a massa de nódulos também apresentaram evidência para um efeito positivo pela inoculação por ambos os modelos ($p < 0,05$).

Figura 3 — Resultados da Meta-análise para a variável produtividade (kg ha^{-1}) dos tratamentos inoculados referentes às áreas com (1) e sem (2) histórico de cultivo com feijoeiro.



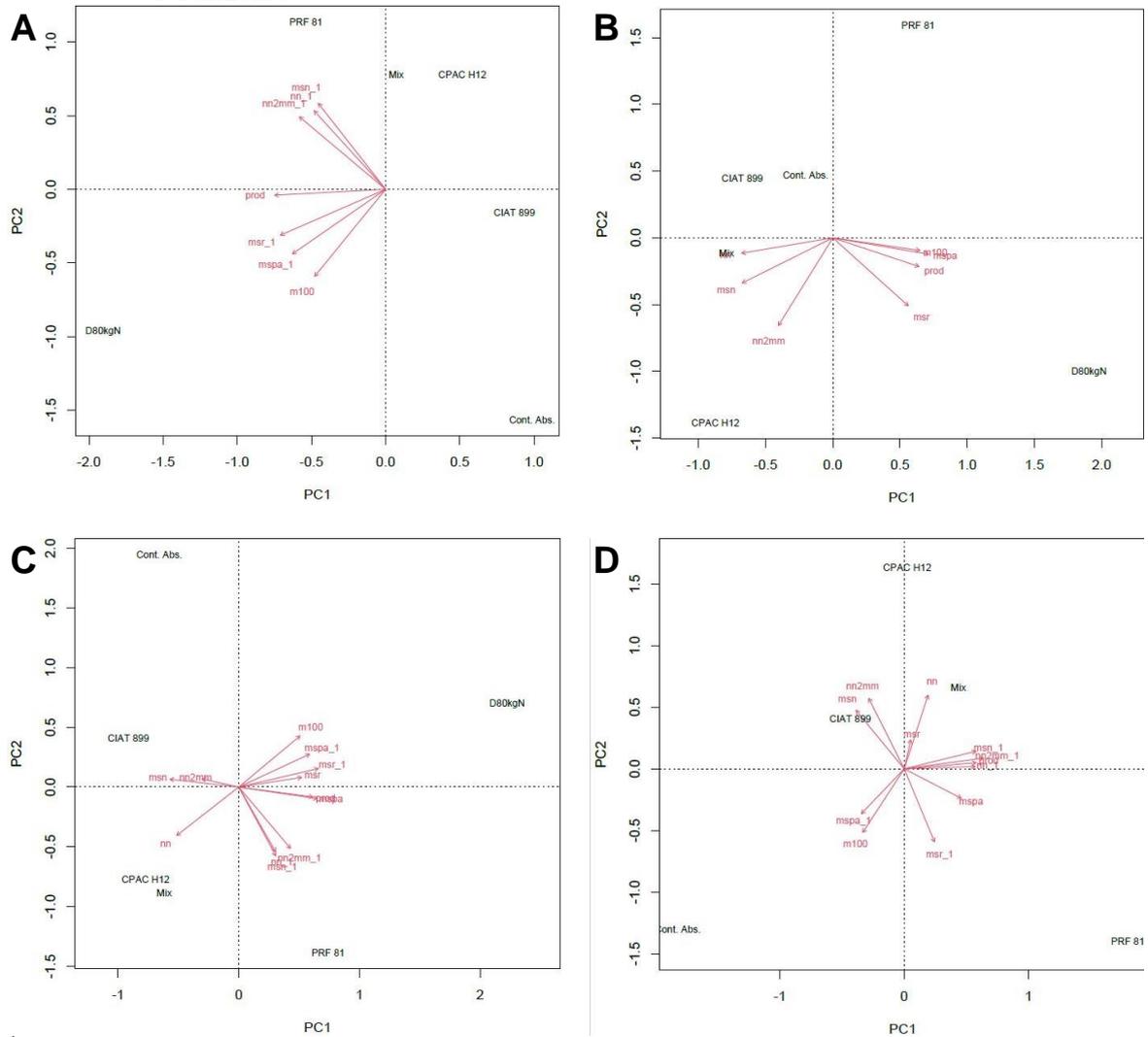
Nessa figura o eixo vertical representa a média de produtividade do tratamento sem inoculação e N-fertilizante (controle absoluto); os blocos cinza com barras de erro perpendiculares, a média de produtividade para cada um dos tratamentos inoculados conforme as áreas; os losangos cinza, a média de todos os tratamentos inoculados, distante da média de produtividade do tratamento controle absoluto, o eixo vertical. DMP: Desvio médio padrão.

Fonte: Do autor (2022).

Na PCA realizada para as variáveis adquiridas da área com histórico de cultivo com feijoeiro, observa-se que a maioria delas estar correlacionada ao tratamento com N-fertilizante (FIGURA 4ABC). Entretanto, quando excluído da análise o tratamento com N-fertilizante, os tratamentos inoculados passam a ter maior correlação com as variáveis (FIGURA 4D). Já para a área sem histórico de cultivo, a PCA mostrou que há maior correlação das variáveis com os tratamentos testando N-fertilizante e inoculado com a estirpe CIAT 899 (FIGURA 5ABC). Quando o tratamento com N-fertilizante não é considerado, a inoculação com a estirpe CPAC H12 passa a ter desempenho próximo ao da CIAT 899 (FIGURA 5D), sendo que em todos os

casos, o controle absoluto se mantém do lado oposto ao tratamento CIAT 899 (FIGURA 5ABCD).

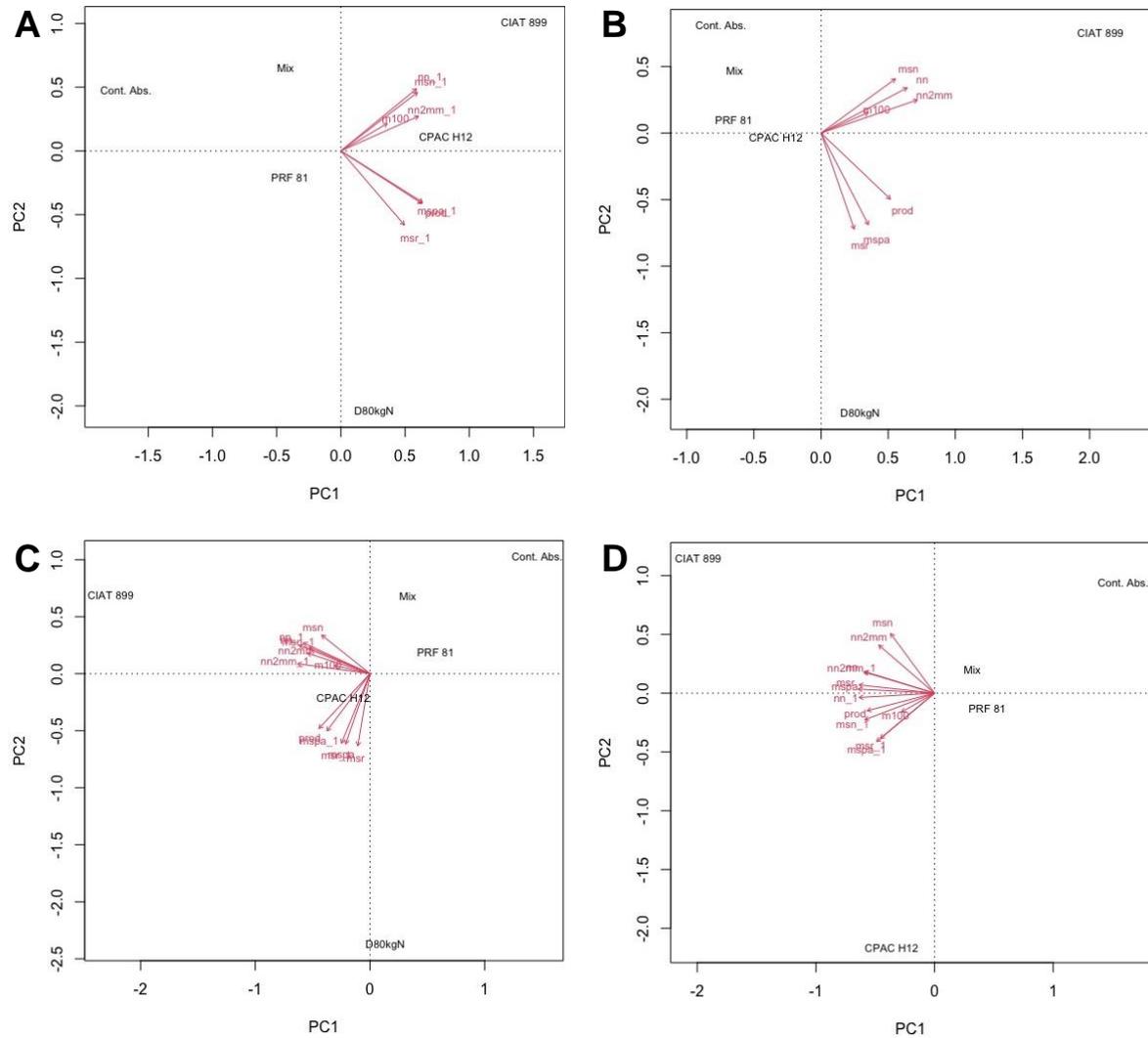
Figura 4 — Resultado da PCA com as variáveis¹ coletadas dos tratamentos² testados na área com histórico de cultivo com feijoeiro (Área 1) para **A-** primeira coleta; **B-** segunda coleta; **C-** primeira e segunda coleta e **D-** sem o tratamento com N-fertilizante.



¹ **nn2mm**: número de nódulos > 2 mm; **nn**: número de nódulos; **msn**: massa seca de nódulos; **msr**: massa seca de raiz; **mspa**: massa seca de parte aérea; **m100s**: massa de 100 sementes e **prod.**: produtividade; ² CIAT 899; CPAC H12; PRF 81; Mix (CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81); D80KgN e Cont. Abs.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 5 — Resultado da PCA com as variáveis¹ coletadas dos tratamentos avaliados² na área sem histórico de cultivo com feijoeiro (Área 2) para **A-** primeira coleta; **B-** segunda coleta; **C-** primeira e segunda coleta e **D-** sem o tratamento com N-fertilizante.



¹ **nn2mm**: número de nódulos > 2 mm; **nn**: número de nódulos; **msn**: massa seca de nódulos; **msr**: massa seca de raiz; **mspa**: massa seca de parte aérea; **m100s**: massa de 100 sementes e **prod.**: produtividade; ² CIAT 899; CPAC H12; PRF 81; Mix (CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81); D80kgN e Cont. Abs.

Fonte: Do autor (2022).

3.3 Experimento em casa de vegetação

Em casa de vegetação observou-se na primeira coleta que, a inoculação com a estirpe CIAT 899 aumentou significativamente o número de nódulo total de plantas cultivadas em solo sem histórico de cultivo com feijoeiro se comparado aos tratamentos controle (TABELA 5). A adubação com N-fertilizante afetou a nodulação negativamente somente no solo com histórico de cultivo (TABELA 5). Porém, plantas inoculadas com a estirpe CIAT 899 e não

inoculadas sem N-fertilizante apresentaram o menor acúmulo de biomassa nas raízes quando cultivadas em solo com histórico de cultivo de feijoeiro (TABELA 5). Utilizando os *primers* da Tabela 2 e os extratos de nódulos na PCR convencional, observou-se que a ocupação nodular pela estirpe CIAT 899 foi de 77% e 67% nos solos com e sem histórico de cultivo, respectivamente. Enquanto que a estirpe CPAC H12 ocupou apenas 43% e 23% dos nódulos de plantas que haviam sido inoculadas com ela e cultivadas em solo das Áreas 1 e 2, respectivamente. A ocupação nodular por parte da estirpe CIAT 899 ou CPAC H12 em plantas inoculadas com o mix de estirpes foi igual a 50% e 23% em solo das Áreas 1 e 2, respectivamente. Quanto a estirpe PRF 81, em casa de vegetação também não houve ocupação nodular por ela para nenhum dos tratamentos em que foi inoculada (TABELA 5).

Tabela 5 — Médias das variáveis número de nódulo maiores que 2 mm ($NN > 2mm$), número de nódulos totais (NN_{total}), massa seca de nódulo (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA) e ocupação nodular (ON) do feijoeiro cultivado em solos com e sem histórico de cultivo da cultura em casa de vegetação sob seis tratamentos, médias de três repetições ($n = 3$).

| Área 1 | | | | | | | | | |
|------------|-------------------|-------|-------|----------|-----------|-------------|----------------------|-----------|----|
| Fonte N | Var. | NN | NN | MSN | MSR | MSPA | Ocupação nodular (%) | | |
| | >2mm | total | mg | mg | g | CIAT 899 | CPAC H12 | PRF 81 | |
| | CIAT 899 | 16 ab | 65 ab | 41,98 a | 369,00 d | 1,31 a | 77 | nd | nd |
| | CPAC H12 | 20 ab | 50 ac | 34,55 a | 478,00 bc | 1,07 a | nd | 43 | nd |
| | PRF 81 | 25 a | 42 bc | 30,58 a | 394,00 cd | 1,09 a | nd | nd | nd |
| | Mix | 25 a | 74 a | 50,81 a | 510,00 b | 1,08 a | 50 | 50 | nd |
| | Cont. Abs. | 15 ab | 50 ac | 45,30 a | 387,33 d | 1,26 a | nd | nd | nd |
| | D80kgN | 9 b | 37 c | 24,78 a | 660,33 a | 1,56 a | nd | nd | nd |
| Área 2 | | | | | | | | | |
| Fonte N | Var. | NN | NN | MSN | MSR | MSPA | Ocupação nodular (%) | | |
| | >2mm | total | Mg | mg | g | CIAT 899 | CPAC H12 | PRF 81 | |
| | CIAT 899 | 27 ab | 97 a | 240,57 a | 502,33 b | 1,14 a | 67 | nd | nd |
| | CPAC H12 | 27 ab | 60 b | 251,74 a | 535,00 b | 1,21 a | nd | 23 | nd |
| | PRF 81 | 34 ab | 89 ab | 255,95 a | 488,33 b | 1,31 a | nd | nd | nd |
| | Mix | 21 b | 77 ab | 302,97 a | 445,00 b | 1,15 a | 23 | 23 | nd |
| | Cont. Abs. | 32 ab | 65 b | 213,29 a | 470,67 b | 1,33 a | nd | nd | nd |
| | D80kgN | 37 a | 61 b | 229,41 a | 706,33 a | 1,51 a | nd | nd | nd |

Letras iguais na coluna indica ausência de significância pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$); nd: não detectado; Mix: CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81.

Fonte: Do autor (2022).

Quanto aos dados da segunda coleta em casa de vegetação, observou-se que a inoculação com a estirpe CIAT 899 e o Mix de estirpes estimulou significativamente a formação de um maior número de nódulos totais em plantas cultivadas em solo da Área 1 em relação ao tratamento sem inoculação e dose de N-fertilizante (TABELA 6). Contudo, esse

maior número não refletiu em uma maior massa seca de nódulos. Já esta foi observada significativamente para plantas inoculadas e que receberam dose de N-fertilizante cultivadas no solo da Área 2 se comparado ao controle não inoculado e sem dose de N-fertilizante. Além disso, cabe destacar que plantas cultivadas nos solos das Áreas 1 e 2 tiveram aumento significativo na massa seca de parte aérea quando submetidas apenas aos tratamentos com dose de N-fertilizante, sendo as médias para os demais tratamentos iguais (TABELA 6).

Tabela 6 — Resultados da segunda coleta em casa de vegetação para as variáveis número de nódulo maiores que 2 mm ($NN > 2\text{mm}$), número de nódulos totais (NN_{total}), massa seca de nódulo (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA) e ocupação nodular (ON), médias de três repetições ($n = 3$).

| Área 1 | | | | | | |
|------------|------|-------|--------|-----------|------------|---------|
| Fonte N | Var. | NN | NN | MSN | MSR | MSPA |
| | >2mm | total | mg | mg | g | |
| CIAT 899 | | 83 a | 252 a | 194,85 a | 679,50 a | 1,56 b |
| CPAC H12 | | 85 a | 190 ab | 194,81 a | 629,50 b | 1,67 b |
| PRF 81 | | 99 a | 202 ab | 174,98 a | 616,00 ab | 2,04 b |
| Mix | | 95 a | 237 a | 185,80 a | 670,50 a | 1,82 b |
| Cont. Abs. | | 73 a | 146 b | 139,41 a | 463,16 ab | 1,62 b |
| D80kgN | | 70 a | 180 ab | 165,51 a | 806,00 a | 4,01 a |
| Área 2 | | | | | | |
| Fonte N | Var. | NN | NN | MSN | MSR | MSPA |
| | >2mm | total | mg | mg | g | |
| CIAT 899 | | 93 a | 269 a | 286,30 ab | 873,17 bc | 2,74 c |
| CPAC H12 | | 97 a | 296 a | 308,67 ab | 710,17 c | 3,37 bc |
| PRF 81 | | 88 a | 266 a | 336,93 ab | 945,00 b | 3,16 bc |
| Mix | | 106 a | 274 a | 420,15 a | 1.292,33 a | 3,85 b |
| Cont. Abs. | | 75 a | 217 a | 287,17 b | 574,16 c | 3,36 bc |
| D80kgN | | 89 a | 263 a | 293,31 ab | 1.248,33 a | 5,16 a |

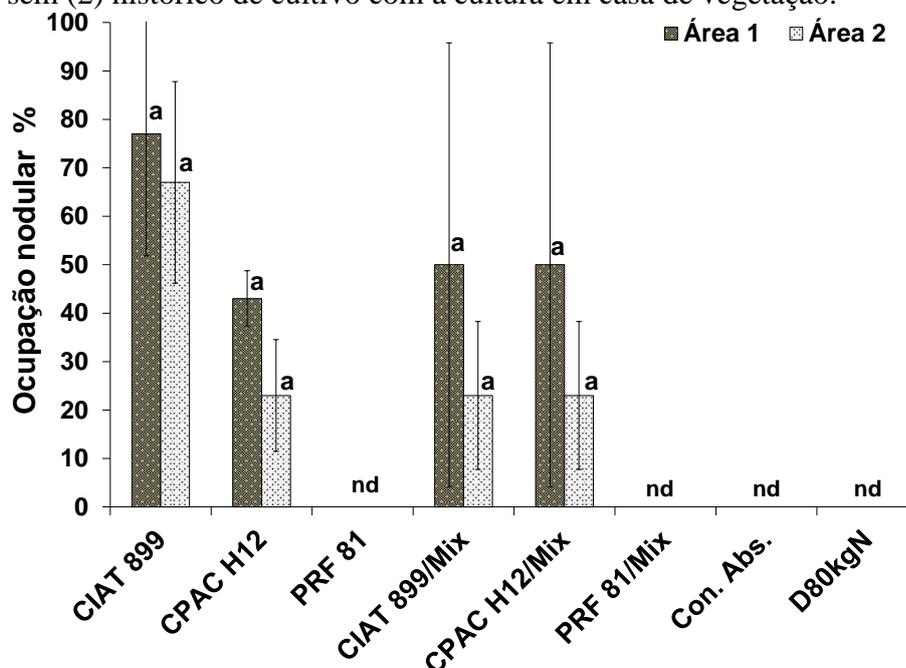
Letras iguais na coluna indica ausência de significância pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$); Mix: CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81.

Fonte: Do autor (2022).

Como podem ser comparadas nas Tabelas 3 e 4, a maioria das variáveis coletadas no experimento conduzido na área sem histórico de cultivo, teve maior rendimento quando comparada a da área que já havia sido cultivada com feijoeiro. Essa diferença também foi notada para as mesmas variáveis coletadas a partir do experimento em casa vegetação (TABELAS 5 e 6), onde o solo foi considerado também como um fator. Nesse caso, o solo sem histórico de cultivo com feijoeiro (Área 2) proporcionou significativamente pelo teste de médias Duncan ($p > 0,05$), em alguns casos, as melhores médias para as variáveis do feijoeiro, se comparado ao solo da Área 1, onde havia sido cultivado feijoeiro (APÊNDICE C). Entretanto, quando contrastadas as taxas de ocupação nodular pelas estirpes inoculadas,

em contraste aos solos das áreas avaliadas, observa-se que o histórico das áreas não influenciou de forma significativa na ocupação nodular (FIGURA 6).

Figura 6 — Comparação entre as taxas de ocupação nodular pelas estirpes CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81 inoculadas em feijoeiro cultivado nos solos das Áreas com (1) e sem (2) histórico de cultivo com a cultura em casa de vegetação.



Letras iguais nas barras dentro do tratamento indica ausência de significância pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$); Cada barra representa a observação média de 30 extratos de nódulos por tratamento; O tratamento Mix foi composto pelas estirpes CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81 (1:1:1). Os extratos de nódulos desse tratamento foram avaliados com *primers* específicos para as estirpes CIAT 899 ou CPAC H12 e PRF 81; nd: não detectado.

Fonte: Do autor (2022).

3.4 Diversidade de rizóbios nativos que nodularam o feijoeiro cultivado em solo das Áreas 1 e 2

No procedimento de análise rápida de rizóbios *in situ*, sem prévio cultivo, dos 120 nódulos para cada uma das áreas, formou-se perfil de bandas apenas para 108 e 76 extratos oriundos das Áreas 1 e 2, respectivamente. O *primer* randômico RPO1 possibilitou a amplificação de até sete produtos por extrato de nódulo avaliado, e em alguns casos apenas um (APÊNDICE D e E). O agrupamento dos perfis gerados para os extratos de nódulos para cada uma das Áreas 1 e 2 mostrou a formação de 58 e 45 perfis de bandas diferentes, respectivamente. Diante dessa informação, observa-se que a Área 2 apresentou maior diversidade de rizóbios nativos, uma vez que mais de 59% (45/76) dos nódulos apresentaram perfis diferentes se comparado aos 53% (58/108) avaliados para Área 1. Para essa, o perfil de

bandas em maior número correspondeu a 14,81% (16/108) do total gerado, seguido de outros com 9,25% (10/108) e 7,40% (8/108). Para a Área 2 o principal perfil correspondeu a 17,10% (13/76) e os outros 11,84% (9/76) e 5,26% (4/76) do total gerado (APÊNDICE D e E). Somando a porcentagem dos três perfis de banda mais presente em cada uma das áreas, 31,45% para Área 1 e 34,2% para a Área 2, observa-se que a área sem prévio cultivo com feijoeiro apresentou maior número de rizóbios nativos dominantes.

4 DISCUSSÃO

A interação simbiótica de plantas leguminosas com rizóbios vem sendo evidenciada há quase um século (BALDWIN; FRED, 1929; DUNHAM; BALDWIN, 1931; NICOL; THORNTON, 1941 *apud* ARAUJO; HUNGRIA, 1994). Desde então, mostrou-se que essa interação pode ser uma alternativa sustentável para promoção de crescimento vegetativo e produtividade de grãos como, por exemplo, para o feijoeiro, onde parte do nitrogênio requerido pela planta pode ser fornecido por rizóbios elite (HUNGRIA *et al.*, 2003). Porém, devido a diversos fatores inerentes a interação rizóbio-solo-planta, a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) no feijoeiro não pode ser relacionada diretamente à inoculação por bactérias competentes sem antes haver o monitoramento dessas bactérias nos nódulos (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2021).

É sabido que na maioria das áreas agrícolas a população de rizóbios nativos varia na ordem de 10^4 a 10^7 células g^{-1} de solo (BROCKWELL *et al.*, 1995). No presente estudo, as áreas avaliadas com e sem histórico de cultivo com feijoeiro apresentaram por meio da planta isca, siratro populações de rizóbios nativos na ordem de 10^4 e 10^5 células g^{-1} de solo, respectivamente (TABELA 1). A ordem de 10^4 células por grama de solo corresponde a 10^{13} células de rizóbios indígenas na camada superficial de solo igual a 10 cm em um hectare (BROCKWELL *et al.*, 1995). Considerando que as sementes utilizadas no presente estudo foram inoculadas para conter carga de 10^6 células e que elas foram semeadas na densidade equivalente a 300.000 plantas ha^{-1} , adicionou-se então ao sistema o equivalente a 10^{11} células ha^{-1} . Essa densidade, segundo estimativas propostas por Brockwell *et al.* (1995) é 100 e 1000 vezes menor do que a população de rizóbios nativos detectados nos solos 1 e 2 pela planta isca siratro, respectivamente. Entretanto, a população de rizóbios nativos detectados por meio da variedade de feijoeiro Pérola, alvo desse estudo, e previamente utilizada como planta isca, foi da ordem de 10^3 células g^{-1} de solo, independente dos solos (TABELA 1). Segundo Thies *et al.* (1991) 50 rizóbios nativos por grama de solo pode ser capaz de eliminar a resposta da inoculação com estirpes elite. Porém, nos trabalhos de Regus *et al.* (2017) e Westhoek *et al.* (2021) é reforçada a ideia de que as leguminosas são capazes de discriminar entre estirpes de rizóbios eficientes e ineficientes em fixar N_2 , opondo sanções pós-infecção, como por exemplo, a redução de fotoassimilados para as estirpes ineficientes. No trabalho de Silva *et al.* (2012) testando taxas de inóculo, os autores observaram que em solo com população de rizóbios nativos na ordem de 10^3 células g^{-1} , doses de inoculante acima de $6,65 \times 10^6$ células da estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. por semente, proporcionaram maior nodulação e

acúmulo de nitrogênio em *Vigna unguiculata*. Portanto, existe a possibilidade de estirpes elite adicionadas aos sistemas sobressaírem frente aos rizóbios numericamente dominantes, residentes no solo.

Com base no que foi dito e na diversidade de rizóbios nativos detectados nas Áreas 1 e 2 (APÊNDICE D e E), avaliar os ganhos fitotécnicos por parte de plantas do feijoeiro, inoculadas e cultivadas nessas áreas, sem antes fazer uma análise de ocupação nodular, poderia está superestimando os ganhos em função da inoculação com estirpes elite. Tendo em vista que rizóbios nativos podem também fornecer nitrogênio para o feijoeiro de maneira eficiente (RUFINI *et al.*, 2011). Thies *et al.* (1991) relataram que nos tratamentos inoculados houve considerável aumento da massa seca de nódulos, com 66% de ocupação nodular pela estirpe alvo e relação direta de ganhos significativos na produção se comparado ao não inoculado. Visando poder apontar esse efeito, os nódulos coletados dos experimentos desse trabalho foram separados em tamanhos maiores ou igual a 2 mm, supondo-se que eles seriam os mais ativos em fornecer nitrogênio para a planta. No entanto, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos inoculados e os controles para nódulos com essa característica e que eles estão presentes na maioria das plantas em quantidade inferior a 50% do total (TABELAS 3, 4, 5 e 6).

Com relação à taxa de ocupação nodular avaliando nódulos com aproximadamente 2 mm, observou-se que a estirpe CIAT 899 foi a mais presente nos nódulos de feijoeiro coletados em campo, ocupando 54 e 72% dos nódulos de tratamentos inoculados com ela, nas áreas com e sem histórico de cultivo com feijoeiro, respectivamente. Segundo Araújo (1994) a eficiência de uma estirpe em formar simbiose com uma leguminosa é definida quando 50% ou mais dos nódulos estão ocupados com a bactéria alvo, anteriormente inoculada com menos da metade da dose recomendada de inóculo por semente. Entretanto, não se pode dizer que a estirpe CIAT 899 foi eficiente em nodular o feijoeiro nos experimentos de campo do presente estudo. Tendo em vista que a competitividade de uma estirpe pode ser maior em função da dose do inoculante (SILVA *et al.*, 2012), a ocupação nodular torna-se uma medida indireta (ARAÚJO, 1994). A estirpe CPAC H12 também se mostrou presente em alguns nódulos, porém, em baixa porcentagem (TABELA 4 e 5). Quanto aos nódulos do tratamento Mix (CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81) observou-se baixa detecção das estirpes CIAT 899 ou CPAC H12 (TABELAS 4 e 5). Provavelmente isso ocorreu em decorrência da mistura em proporções iguais dos inoculantes, causando um efeito diluição de UFC g⁻¹ de inoculante para cada uma das estirpes no tratamento Mix. Segundo Mostasso *et al.* (2002) a coinoculação da estirpe CIAT 899 na proporção de 1:1 com a CPAC H12 e a PRF 81 mostrou que essas

estirpes ocuparam em média 53 e 52% dos nódulos das variedades avaliadas em condições de casa de vegetação. Já em condições de campo, dos quatro experimentos avaliados em que a estirpe CPAC H12 foi inoculada, nos três primeiros a ocupação nodular por ela não passou de 40% e no último chegou a 55% (HUNGRIA *et al.*, 2003). Como no presente estudo, a estirpe CIAT 899 foi mais presente nos nódulos do seu tratamento em relação as outras, é possível que os poucos nódulos testados positivos para o tratamento Mix utilizando os *primers* Ciat899G166 e Ciat899G1624 foram infectados pela estirpe CIAT 899.

Quanto à ausência da estirpe PRF 81 nos nódulos avaliados, pode ser que ela não tenha sido capaz de competir com a diversa carga de rizóbios nativos competentes em nodular o feijoeiro nas áreas em estudo (APÊNDICE D e E). Segundo Dowling e Broughton (1986) os exsudados das plantas atuam como, por exemplo, substâncias quimiotáticas que podem aumentar a população de rizóbios nativos na ordem de cem vezes na rizosfera. Os autores Leung *et al.* (1994) relatam em seu trabalho, que para a nodulação por determinada estirpe ser bem-sucedida, ela deveria estar numa concentração de 6 a 11 vezes maior do que sua concorrente. Além disso, outros eventos pré-infecção que precedem a formação do nódulo pode ter interferido na interação da estirpe PRF 81 com o feijoeiro, como por exemplo, a não adesão a determinados sítios na superfície das raízes e/ou troca de sinais moleculares entre o hospedeiro e o microssimbionte alvo (ARAÚJO, 1994). No trabalho em que foi recomendada, a estirpe PRF 81 também não foi detectada a partir dos nódulos coletados de plantas inoculadas com ela em condições de campo (HUNGRIA *et al.*, 2000). Isso porque, a técnica de sorologia utilizada para tal finalidade, não foi capaz de separá-la dos demais rizóbios nativos do solo (HUNGRIA *et al.*, 2000). Porém, em condições de casa de vegetação a estirpe PRF 81 foi detectada em até 55% dos nódulos de plantas inoculadas com ela e a estirpe CIAT 899, na proporção 1:1 (HUNGRIA *et al.*, 2000). Já no trabalho de Hungria *et al.* (2003) com reinoculação das parcelas a partir do primeiro experimento, observou-se que a estirpe PRF 81 passou a ocupar um maior número de nódulos, com taxa de ocupação nodular passando de 35% a 60% dentro de quatro ciclos produtivos. No trabalho de Raposeiras *et al.* (2006) a ocupação nodular pelas estirpes CIAT 899 e PRF 81 no primeiro e segundo experimento de campo foi em média aproximadamente de 67% e 25% e 73% e 33%, respectivamente. Quanto à taxa de ocupação nodular no primeiro experimento, para o tratamento utilizando o Mix das três, foi de 76% de CIAT 899 contra 24% de PRF 81. Esse baixo desempenho também foi observado para PRF 81 conjunta à estirpe SLA 2.2 de *Rhizobium tropici*, que ocuparam 15% e 85% dos nódulos cada uma, respectivamente. Apesar da baixa ocupação nodular da estirpe PRF 81 em feijoeiro cultivado em campo, no experimento conduzido em casa de vegetação,

para mais de um tipo de solo, a ocupação nodular pela estirpe PRF 81 chegou acima de 87% (Capítulo 2). Porém, em dois dos quatro solos avaliados não foi possível observar nodulação por parte da estirpe (Capítulo 2). Entretanto, mesmo não apresentado nódulos, a estirpe foi detectada na PCR convencional por meio de *primers* específicos nas raízes de plantas inoculadas com ela (Capítulo 2).

Ainda que não tenha sido detectada diferença significativa em termos de produtividade do feijoeiro nos experimentos de cada uma das áreas, a análise conjunta dos experimentos apresentou suporte para um efeito positivo das inoculações sobre essa produtividade. O incremento para os tratamentos inoculados com as estirpes CIAT 899 e CPAC H12, separadamente, em relação ao não inoculado e sem dose de N-fertilizante, foi em média superior em 302 e 196 kg ha⁻¹ de grãos para a área com e, 786 e 584 kg ha⁻¹ de grãos para a área sem histórico de cultivo com feijoeiro, respectivamente (TABELAS 3 e 4). Esses ganhos podem ter acontecido devido a inoculação dessas estirpes na cultura, tendo em vista que foi confirmada a presença delas nos nódulos. Porém, o tratamento com a estirpe PRF 81, ausente em todos os nódulos analisados para o seu tratamento, também apresentou incremento médio de grãos equivalente a 473 e 506 kg ha⁻¹ para as áreas com e sem histórico de cultivo com feijoeiro, respectivamente (TABELAS 4 e 5). Incrementos de produtividade, com ou sem significância, dependendo da área de cultivo, também já foram observados para tratamentos com as estirpes CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81, separadamente, em relação ao controle sem inoculação e dose de N-fertilizante (PELEGRIN *et al.*, 2009; FONSECA *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2017; MOSTASSO *et al.*, 2002). Inclusive, no trabalho de Yagi *et al.* (2015), a inoculação com a estirpe PRF 81 mostrou incremento de produtividade para sete das dez cultivares testadas, embora, não significativo em relação ao controle sem N-fertilizante. Outros experimentos realizados em campo mostram incrementos significativos ou não, na produtividade por parte da inoculação com estirpe PRF 81 em relação ao tratamento não inoculado e sem dose de N-fertilizante, bem como confirma nos nódulos, a presença dessa bactéria (HUNGRIA *et al.*, 2003). Entretanto, a ausência de significância entre os tratamentos avaliados no presente estudo pode estar relacionada à alta variação entre as médias das variáveis analisadas como, por exemplo, da produtividade em kg ha⁻¹ (APÊNDICE B).

Diante da proximidade entre as áreas (FIGURA 1), a população de rizóbios nativos na mesma ordem de grandeza (TABELA 1) bem como a adição de insumos químicos no sistema, esperava-se como contraste único o histórico de cultivo das áreas. Tendo em vista que, como relatado por diversos trabalhos, em áreas sem prévio cultivo com feijoeiro, a inoculação com estirpes elite de rizóbios favorece melhores rendimentos para o feijoeiro (VLASSAK *et al.*,

1996; VARGAS *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2015). Entretanto, houve em campo uma considerável diferença de produtividade obtida entre as Áreas 1 e 2. Tal fato pode ser explicado por fatores intrínsecos à fertilidade dos solos. Como os teores de Ca+Mg ($\text{cmol}_{\text{cdm}}^{-3}$) dos solos se mostraram dentro do adequado para o bom rendimento da cultura, não foi realizada a correção de solo das áreas. Apesar de que, a análise de solo para as duas áreas (Tabela 1) mostrava saturação por bases abaixo do adequado de 70% para maior potencial produtivo do feijoeiro (ROSOLEM; MARUBAYASHI, 1994). Como pode ser notado na Tabela 1, na Área 1, onde já havia sido cultivado feijoeiro, o pH estava no mínimo adequado e a disponibilidade de Al^+ um pouco acima da tolerável pela cultura. Isso pode ter contribuído para a menor produção na área que havia sido cultivada com feijoeiro (TABELA 4). Os autores Munns e Fox (1976) e Malavolta (1976) recomendam para a cultura do feijoeiro pH do solo na faixa entre 5,5 e 6,7. Quanto a presença de Al^+ no solo, sabe-se que o feijoeiro se desenvolve melhor em níveis inferiores a 3 ppm ou $0,034 \text{ cmolc dm}^{-3}$ (RUSCHEL *et al.*, 1968; ABRUNA *et al.*, 1975). Segundo Campanharo *et al.* (2010) o efeito de acidez no solo foi prejudicial no estágio inicial de desenvolvimento do feijoeiro, entretanto, não prejudicou a nodulação. Tendo em vista que a disponibilidade de potássio (K) e fósforo (P) poderia ser também um fator limitante para a produtividade do feijoeiro (ARAÚJO, 1994), as áreas experimentais foram supridas com esses macronutrientes conforme suas necessidades para boa produtividade da cultura (PORTZ *et al.*, 2013).

Além do ocorrido, o baixo rendimento do feijoeiro obtido na Área 1 pode ter sido em função da infestação da área com *Cyperus rotundus*. Segundo a Karavidas *et al.* (2022) a infestação da área por plantas daninhas pode comprometer a produtividade do feijoeiro em até 80%. A presença da espécie *C. rotundus* em áreas de cultivo com feijoeiro é de difícil controle até mesmo quando utilizando agentes químicos (ESQUIVEL *et al.*, 1997). A espécie *C. rotundus* além de competir por água, nutriente e luz, também apresenta efeito alelopático em outras culturas de interesse agrícolas (ANDRADE *et al.*, 2009; HENRY *et al.*, 2021). No trabalho Pessôa *et al.* (2015) é relatado que a fitomassa do feijão caupi foi fortemente afetada pela presença de uma a três plantas de *C. rotundus* no cultivo em condições de casa de vegetação. Há registro na literatura de que o extrato de *C. rotundus* causou efeito alelopático em *Phaseolus vulgaris* (LAYNEZ-GARSABALL; MÉNDEZ-NATERA, 2006). Provavelmente, o mesmo efeito foi ocasionado no feijoeiro cultivado na Área 1 em decorrência da massiva presença de *C. rotundus*, o que resultou, conseqüentemente, em menor produtividade da área. Entretanto, em casa de vegetação houve maior controle do *C. rotundus* no solo da Área 1, porém, as plantas cultivadas no solo da Área 2 continuou

apresentando os melhores rendimentos (APÊNDICE C), com maior superioridade para as médias das variáveis relacionadas à nodulação e produção vegetal em relação ao solo da Área 1. Isso mostra mais uma vez a influência que teve o efeito da fertilidade dos solos para a produtividade do feijoeiro cultivado nas áreas.

Aparentemente, a fertilidade do solo da Área 2 contribuiu também para o efeito da inoculação, como já havia sido também observado por Argaw e Muleta (2017). Neste estudo, por meio da Meta-análise, observou-se que os tratamentos inoculados proporcionaram maiores ganhos de produtividade em relação ao controle absoluto, principalmente com as estirpes CIAT 899 e CPAC H12 na Área 2 (FIGURA 3). Da mesma forma, os dados da PCA mostram que na Área 2 houve maior correlação das variáveis com os tratamentos inoculados CIAT 899 e CPAC H12, principalmente na ausência do tratamento com N-fertilizante (FIGURA 4). Como evidenciado por diversos trabalhos, a fertilidade do solo pode ser também um fator determinante para o sucesso na nodulação de rizóbios elite em leguminosas (BROCKWELL *et al.*, 1995; ELSAGAN *et al.*, 2020; THUITA *et al.*, 2018) inclusive do feijoeiro (ARGAW, 2016; CAMPANHARO *et al.*, 2010; PEREIRA; BLISS, 1987). É possível também que o maior número e diversidade de rizóbios nativos detectados na Área 2 seja em função da fertilidade apresentada por essa área (TABELA 1 e APÊNDICE E).

Como relatado por Junier *et al.* (2009) o feijoeiro é capaz de alterar a composição rizobiana do solo. No entanto, a diferença entre as fertilidades dos solos somada à infestação da por *C. rotundus* em uma das áreas avaliadas, não permitiu deduzir se o cultivo prévio de feijoeiro é um fator limitante para ocupação nodular e melhor produtividade da cultura inoculada com rizóbios elite. Apesar de que, independente do histórico das áreas avaliadas no presente estudo, não houve diferença na taxa de nodulação (FIGURA 6). Desse modo, ainda serão necessários trabalhos futuros para tirar conclusões assertivas a despeito do desempenho do feijoeiro inoculado com estirpes de rizóbios elite em área com e sem históricos de cultivo com a cultura, preferencialmente avaliando mais de um ciclo e região de cultivo.

5 CONCLUSÃO

Os *primers* validados no Capítulo 2 dessa Tese, para detectar as bactérias *Rhizobium tropici* estirpes CIAT 899 ou CPAC H12 e *R. freirei* estirpe PRF 81, são eficazes e específicos para monitorá-las em condições de casa de vegetação e campo.

A inoculação com as estirpes elite, principalmente com a CIAT 899, promoveu maior incremento de produtividade no feijoeiro em relação ao tratamento não inoculado e sem N-fertilizante.

A fertilidade dos solos e a alta população de *Cyperus rotundus* mascararam o efeito da inoculação com os rizóbios elite CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81 no feijoeiro, não permitindo correlacionar os ganhos de produção com o histórico de cultivo da área. Sendo que a área com menor infestação por *C. rotundus* e melhor fertilidade proporcionou melhores rendimentos em função da inoculação com as estirpes CIAT 899 e CPAC H12.

REFERÊNCIAS

- ABOU-SHANAB, R. A. I. et al. Response of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to inoculation with indigenous and commercial *Rhizobium* strains under organic farming systems in Minnesota. **Symbiosis**, v. 78, n. 2, p. 125–134, 2 jun. 2019.
- ABRUNA, F.; PEARSON, R.W; PEREZ, R. Lime response of corn and beans grown on typical ultisols and oxisols of Puerto Rico. In: BORNEMISZA, E.; ALVARADO, A. (Eds.). **Soil Management in Tropical America**. North Carolina State University, 1975. p.228-245.
- ANDRADE, H. M. DE; BITTENCOURT, A. H. C.; VESTENA, S. Potencial alelopático de *Cyperus rotundus* L. sobre espécies cultivadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. spe, p. 1984–1990, 2009.
- ARAÚJO, R. S. Fixação Biológica do Nitrogênio em Feijão. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismos de Importância Agrícola**. Goiânia, GO, Brasil: Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP), 1994. p. 91–120.
- ARNHOLD, E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.50, n.6, p.488-492, 2013.
- ARGAW, A. Effectiveness of *Rhizobium* inoculation on common bean productivity as determined by inherent soil fertility status. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 311–322, 2016.
- ARGAW, A.; MULETA, D. Inorganic nitrogen application improves the yield and yield traits of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) irrespective of the indigenous rhizobial population. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 34, n. 2, p. 97–104, 15 mar. 2017.
- BALDWIN, I.L.; FRED, E.B. Strain variation in the root nodule bacteria of clover, *Rhizobium trifolii*. **J. Bacteriol.**, v. 7, p.17-18, 1929.
- BATISTA, L. *et al.* Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 1, p. 11–20, 2015.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes (RAS)**. 1. ed. Brasília, DF, Brasil: MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.
- BRITO, L. F. de *et al.* Resposta do Feijoeiro Comum à Inoculação com Rizóbio e Suplementação com Nitrogênio Mineral em Dois Biomas Brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, p. 981–992, ago. 2015.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J.; THIES, J. E. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. **Plant and Soil**, v. 174, n. 1–2, p. 143–180, jul. 1995.

BROWN, P. H.; ZHAO, F.-J.; DOBERMANN, A. What is a plant nutrient? Changing definitions to advance science and innovation in plant nutrition. **Plant and Soil**, n. 0123456789, 16 out. 2021.

CAMPANHARO, M. *et al.* Acidez do solo na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro comum. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 285–290, 2010.

DOTY, S. L. *et al.* Identificação de um endofítico Rhizobium em hastes de Populus. p. 27–35, 2005.

DUNHAM, D.R.; BALDWIN, I.L. Double infection of leguminous plants with good and poor strains of rhizobia. **Soil Sci.**, v.32, p.235-249, 1931.

DOWLING, D. N.; BROUGHTON, W. J. Competition for Nodulation of Legumes. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 131–157, out. 1986.

ELSAGAN, M. A. M.; SUZAN, R. M. F.; EL-SHAZLY, M. M. Role of Rhizobium, Organic fertilizer rates and Sulfur on Soil fertility, Nitrogen Balance and productivity of Broad Bean under South Sinai Conditions. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 1, p. 762–779, 2020.

ESQUIVEL, V.; CANO, O.; LÓPEZ, E. Control químico de malezas en frijolo (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agronomía Mesoamericana**, v. 8, n. 1, p. 53–58, 1997.

FONSECA, G. G. *et al.* Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 6, p. 1778–1787, 2013.

HENRY, G.M.; ELMORE, M.T.; GANNON, T. W. Chapter 8 - Cyperus esculentus and Cyperus rotundus. (Eds): Bhagirath Singh Chauhan, **Biology and Management of Problematic Crop Weed Species**. **Academic Press**, p.151-172, 2021.

HUNGRIA, M. *et al.* Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11–12, p. 1515–1528, out. 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive Rhizobium tropici strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 2, p. 88–93, 1 dez. 2003.

Jl, Z. J. *et al.* Competition between rhizobia under different environmental conditions affects the nodulation of a legume. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 114–119, mar. 2017.

JUNIER, P. *et al.* Composition of diazotrophic bacterial assemblages in bean-planted soil compared to unplanted soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 2, p. 153–162, 2009.

- KARAVIDAS, I. *et al.* Agronomic Practices to Increase the Yield and Quality of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A Systematic Review. **Agronomy**, v. 12, n. 2, p. 271, 21 jan. 2022.
- LAYNEZ-GARSABALL, J. A.; MÉNDEZ-NATERA, J. R. Efectos de extractos acuosos del follaje del corocillo (*Cyperus rotundus* L.) sobre la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) cv. Arapatol S-15. **Idesia (Arica)**, v. 24, n. 2, p. 207–226, ago. 2006.
- LEITE, R. de A. *et al.* Co-inoculation of Rhizobium and Bradyrhizobium promotes growth and yield of common beans. **Applied Soil Ecology**, v. 172, n. November 2021, p. 104356, abr. 2022.
- LEUNG, K.; WANJAGE, F. N.; BOTTOMLEY, P. J. Symbiotic Characteristics of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii Isolates Which Represent Major and Minor Nodule-Occupying Chromosomal Types of Field-Grown Subclover (*Trifolium subterraneum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 427–433, fev. 1994.
- MALAVOLTA, E. **Manual de Química Agrícola**. Nutrição de Plantas e Fertilidade do Solo. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda., 1976. 528p.
- MARTINEZ-ROMERO, E. *et al.* Rhizobium tropici, a novel species nodulating Phaseolus vulgaris L. beans and Leucaena sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 417–426, 1991.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of Rhizobium-Phaseolus vulgaris symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 11–23, maio 2003.
- MENDOZA-SUÁREZ, M. *et al.* Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the Rhizobium-Legume Symbioses. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. August, 19 ago. 2021.
- MENDOZA-SUÁREZ, M. A. *et al.* Optimizing Rhizobium-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N₂ fixation in nodules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 18, p. 9822–9831, 2020.
- MICHIELS, J. Phaseolus vulgaris is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, n. 3, p. 193–205, ago. 1998.
- MOREIRA, L. P.; OLIVEIRA, A. P. S.; FERREIRA, E. P. DE B. Nodulation, contribution of biological N₂ fixation, and productivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculated with rhizobia isolates. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 6, p. 644–651, 20 jun. 2017.
- MOSTASSO, L. *et al.* Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 2–3, p. 121–132, jan. 2002.
- MUNNS, D. N.; FOX, R. L. Depression of legume growth by liming. **Plant and Soil**, v. 45, n. 3, p. 701–705, dez. 1976.

- NAROŻNA, D. et al. Survival and Competitiveness of Bradyrhizobium japonicum Strains 20 Years after Introduction into Field Locations in Poland. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5552–5559, 15 ago. 2015.
- NICOL, HUGH; THORNTON, H. G. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences**, v. 130, n. 858, p. 32–59, 13 ago. 1941.
- PEIX, A. et al Bacterial Associations with Legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. November 2014, p. 17–42, 2015.
- PELEGRIN, R. de et al. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 219–226, fev. 2009.
- PEREIRA, P. A. A.; BLISS, F. A. Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different levels of phosphorus availability. **Plant and Soil**, v. 104, n. 1, p. 79–84, mar. 1987.
- PERRET, X.; BROUGHTON, W. J. Rapid identification of Rhizobium strains by targeted PCR fingerprinting. **Plant and Soil**, v. 204, n. 1, p. 21–34, 1998.
- PESSÔA, U. C. M. et al Interferência de tiririca (*Cyperus rotundus* L.) e da Compactação do Solo no Crescimento do Feijão-Caupi. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 5, p. 61, 30 nov. 2015.
- PILLAI, S. D. et al. Specific detection of rhizobia in root nodules and soil using the polymerase chain reaction. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 9, p. 885–891, set. 1992.
- PORTZ, A. et al. Recomendações de adubos, corretivos e de manejo da matéria orgânica para as principais culturas do Estado do Rio de Janeiro. In: FREIRE, L. R. et al. (Eds.). **Manual De Calagem E Adubação Do Estado Do Rio De Janeiro**. 1. ed. Seropédica, RJ: Universidade Rural, 2013. v. 91p. 430.
- RAPOSEIRAS, R. et al. Rhizobium strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 439–447, 2006.
- REGUS, J. U. et al. Cell autonomous sanctions in legumes target ineffective rhizobia in nodules with mixed infections. **American Journal of Botany**, v. 104, n. 9, p. 1299–1312, 12 set. 2017.
- REVELLIN, C. et al. Long-term exposure of agricultural soil to veterinary antibiotics changes the population structure of symbiotic nitrogen-fixing rhizobacteria occupying nodules of soybeans (*Glycine max*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 9, 2018.
- RICHARDSON, A. E. et al. Differentiation of Rhizobium strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4–5, p. 515–524, 1995.

ROPER, W. R. *et al.* Rhizobium leguminosarum strain combination effects on nodulation and biological nitrogen fixation with *Vicia villosa*. **Applied Soil Ecology**, v. 156, n. January, p. 103703, dez. 2020.

ROSOLEM, C. A.; MARUBAYASHI, O. M. Nutrição e adubação do feijoeiro. **Informações Agronômicas**, n. 68, p. 1–16, 1994.

RUFINI, M. *et al.* Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 1, p. 81–88, jan. 2011.

RUSCHEL, A.P.; ALVAHYDO, R; SAMPAIO, I.B.M. Influência do excesso de alumínio no feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em solução nutritiva. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 3, p. 229-233, 1968.

SELENSKA-POBELL, S. How to monitor released rhizobia. **Plant and Soil**, v. 166, n. 2, p. 187–191, out. 1994.

SHAMSELDIN, A.; VELÁZQUEZ, E. The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Netherlands: Springer, 2020.

SILVA, M. DE F. da *et al.* Nodulação e eficiência da fixação do N₂ em feijão-caupi por efeito da taxa do inóculo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 5, p. 1418–1425, nov. 2012.

STREIT, W. *et al.* Competition for nodule occupancy on *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* and *Rhizobium tropici* strains can be efficiently monitored in an ultisol during the early stages of growth using a constitutive GUS gene fusion. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 8, p. 1075–1081, 1995.

SVENNING, M. M. *et al.* Competition for Nodule Occupancy Between Introduced Strains of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *trifolii* and its Influence on Plant Production. **Annals of Botany**, v. 88, n. 4, p. 781–787, out. 2001.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. BEN. Influence of the Size of Indigenous Rhizobial Populations on Establishment and Symbiotic Performance of Introduced Rhizobia on Field-Grown Legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 19–28, jan. 1991.

THUITA, M. *et al.* Reducing spatial variability of soybean response to rhizobia inoculants in farms of variable soil fertility in Siaya County of western Kenya. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 261, n. January, p. 153–160, jul. 2018.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two cerrados soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, n. 3, p. 228–233, 3 nov. 2000.

VESSEY, J. K. **Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers** *Plant and Soil*, 2003.

VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 1–2, p. 61–68, 1996.

WATSON, J. M.; SCHOFIELD, P. R. Species-specific, symbiotic plasmid-located repeated DNA sequences in *Rhizobium trifolii*. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 199, n. 2, p. 279–289, 1985.

WESTHOEK, A. *et al.* Conditional sanctioning in a legume-Rhizobium mutualism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 19, p. 1–8, 2021.

WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating Burkholderia species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 35–43, 2010.

WOOMER, P.L. Most probable number counts. *In*: ‘**Methods of soil analysis**. Part 2. Microbiological and biochemical properties. WEAVER, R.W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Eds.) (SSSA Book Series 5). Soil Science Society of America: Madison. 1994. p 59–79.

YAGI, R. *et al.* Nodulações e Produtividades de Grãos de Feijoeiros diante da Adubação Nitrogenada ou da Inoculação com *Rhizobium Freirei*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1661–1670, dez. 2015.

YATES, R. J. *et al.* A re-appraisal of the biology and terminology describing rhizobial strain success in nodule occupancy of legumes in agriculture. **Plant and Soil**, v. 348, n. 1–2, p. 255–267, 10 nov. 2011.

ZHANG, J. J. *et al.* Genotypic alteration and competitive nodulation of *Mesorhizobium muleiense* against exotic chickpea rhizobia in alkaline soils. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 520–524, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A — Área com histórico de cultivo de feijoeiro infestada por *Cyperus rotundus*, **A-** coleta de tiririca início de ciclo do feijoeiro comum; **B-** massa fresca de *C. rotundus* coletada em 50 m linear; **C-** área 1 infestada com *C. rotundus*; **D-** controle químico de daninhas na área 1; **E-** área 1 após controle químico e **F-** área 2 após controle químico. (continua)

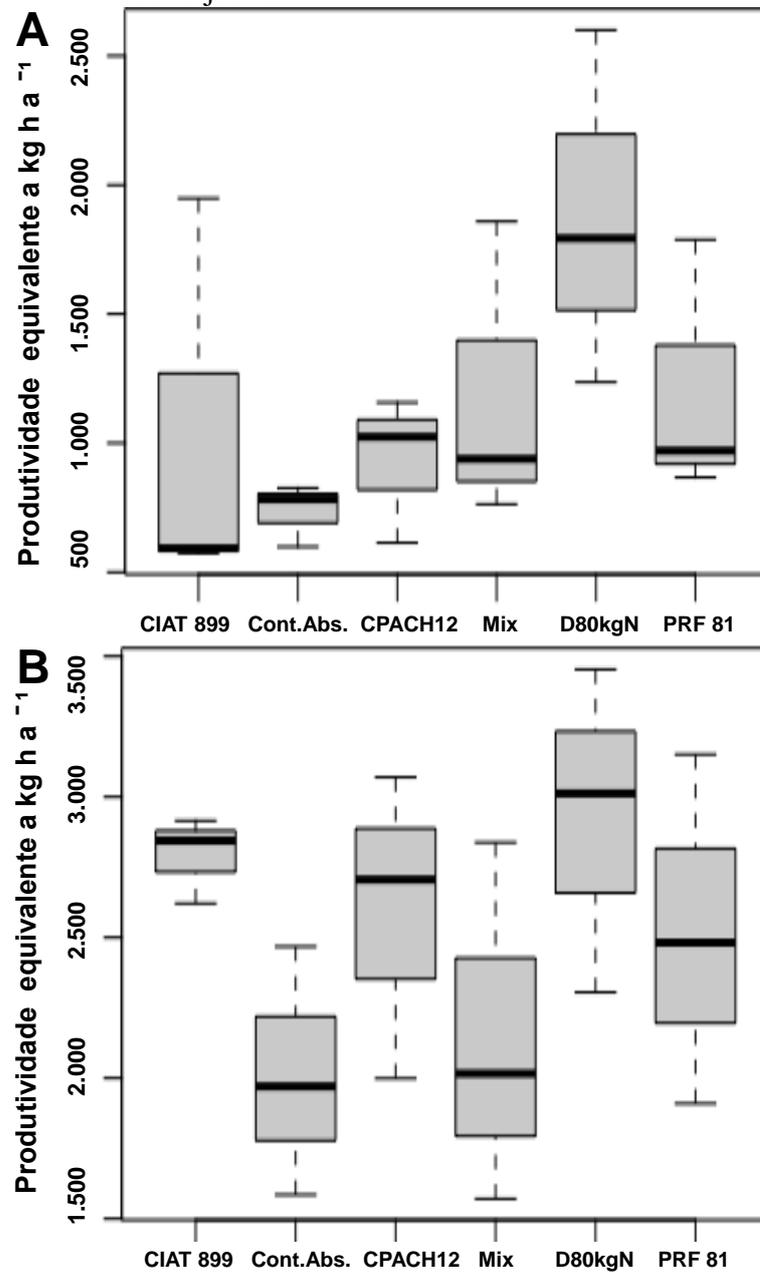


APÊNDICE A — Área com histórico de cultivo de feijoeiro infestada por *Cyperus rotundu*, **A**- coleta de tiririca início de ciclo do feijoeiro comum; **B**- massa fresca de *C. rotundus* coletada em 50 m linear; **C**- área 1 infestada com *C. rotundus*; **D**- controle químico de daninhas na área 1; **E**- área 1 após controle químico e **F**- área 2 após controle químico. (conclusão)



Fonte: Do autor (2022).

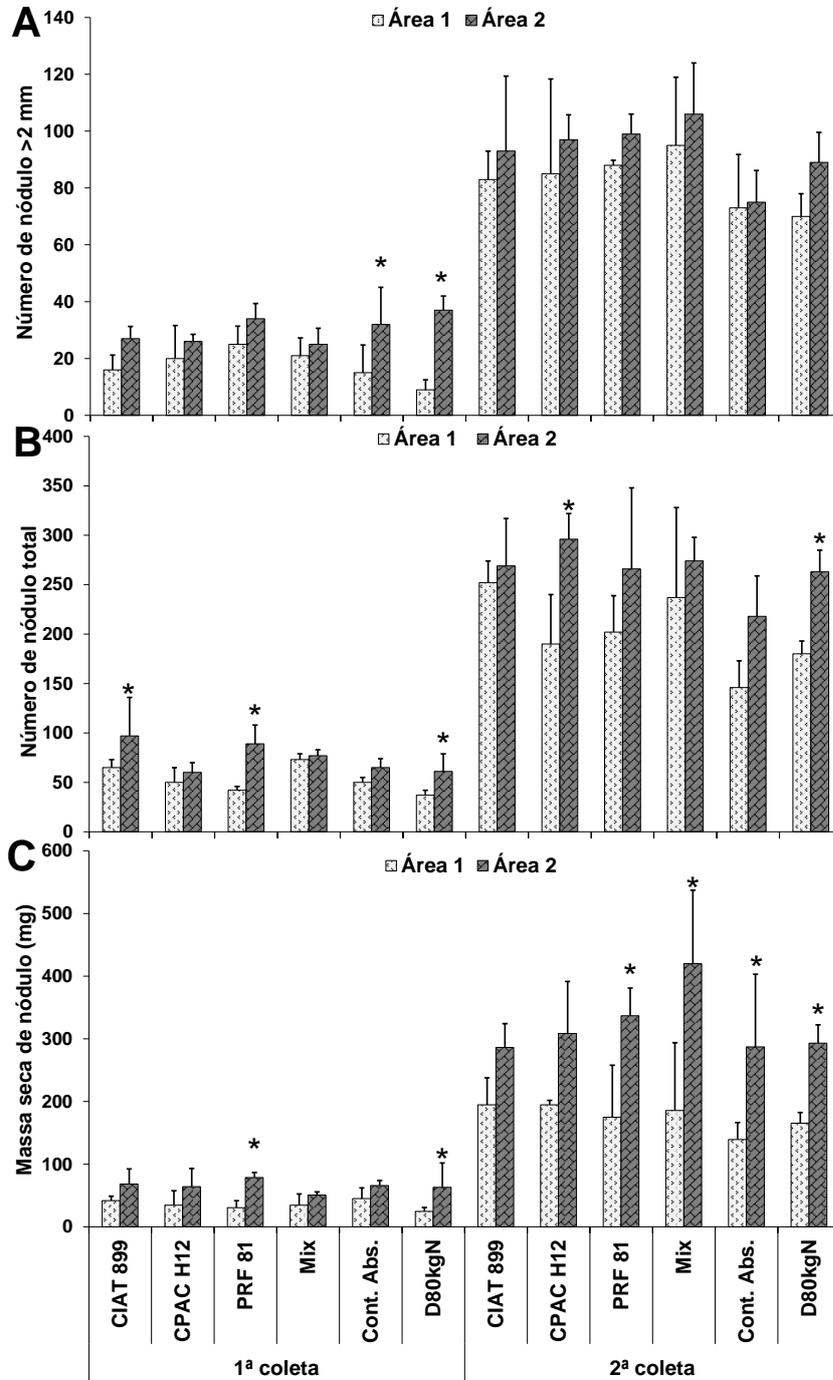
APÊNDICE B — Produtividade em grãos (kg ha^{-1}) do feijoeiro avaliado sob seis tratamentos e cultivado em áreas **A**- com histórico de cultivo de feijoeiro e **B**- sem histórico de feijoeiro.



A ANOVA apontou coeficiente de variância igual a 51% e 23% para as médias dos tratamentos representados nas Figuras A e B, respectivamente.

Fonte: Do autor (2022).

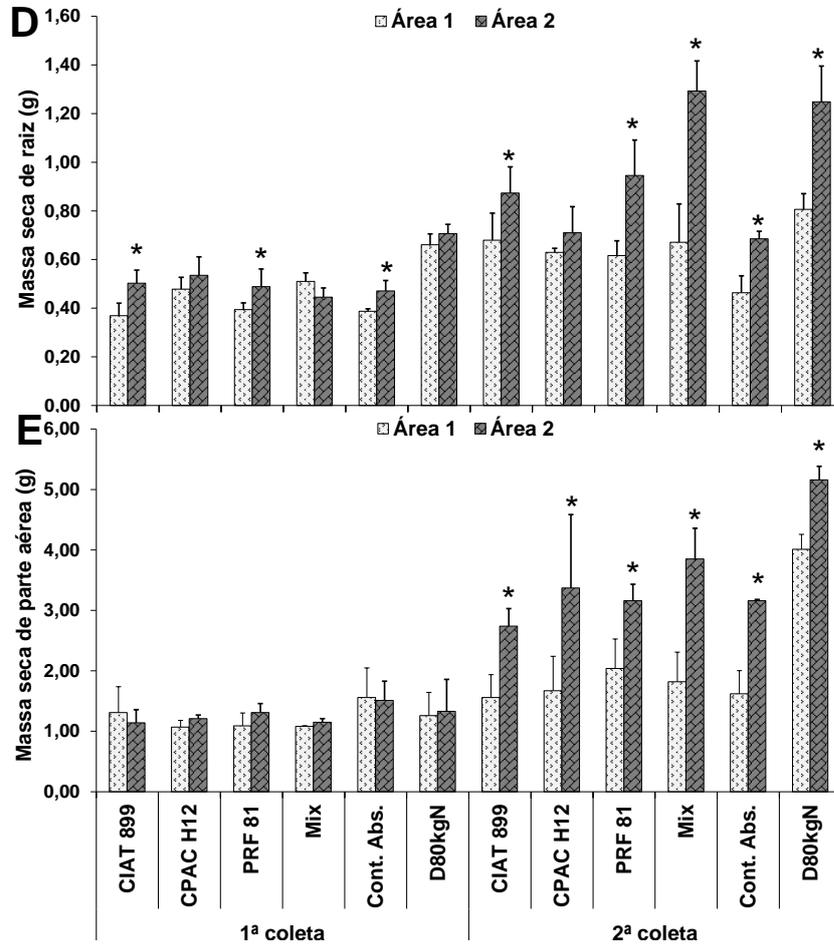
APÊNDICE C - Diferença entre as variáveis do feijoeiro, cultivado em solo das áreas 1 e 2 em casa de vegetação sob seis tratamentos e três repetições cada, coletadas aos 25 dias (1ª coleta) e 45 dias (2ª coleta) após o semeio, respectivamente. Varáveis: **A-** número de nódulo maiores que 2 mm; **B-** número de nódulos totais; **C-** massa seca de nódulo; **D-** massa seca de raiz e **E-** massa seca de parte aérea.



* significativo pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$) dentro de cada tratamento.

Fonte: Do autor (2022).

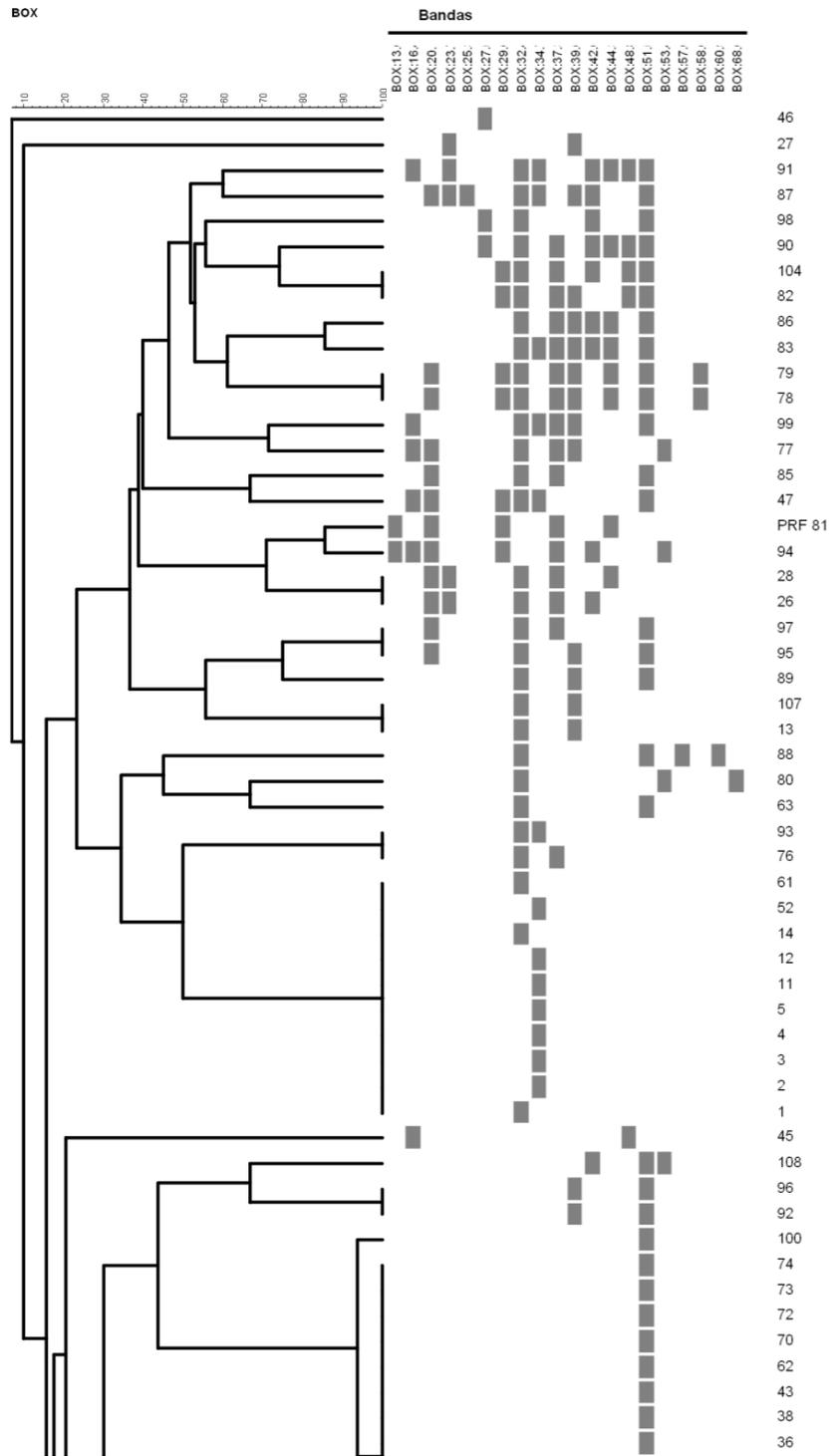
APÊNDICE C - Diferença entre as variáveis do feijoeiro, cultivado em solo das áreas 1 e 2 em casa de vegetação sob seis tratamentos e três repetições cada, coletadas aos 25 dias (1ª coleta) e 45 dias (2ª coleta) após o semeio, respectivamente. Varáveis: **A**- número de nódulo maiores que 2 mm; **B**- número de nódulos totais; **C**- massa seca de nódulo; **D**- massa seca de raiz e **E**- massa seca de parte aérea.



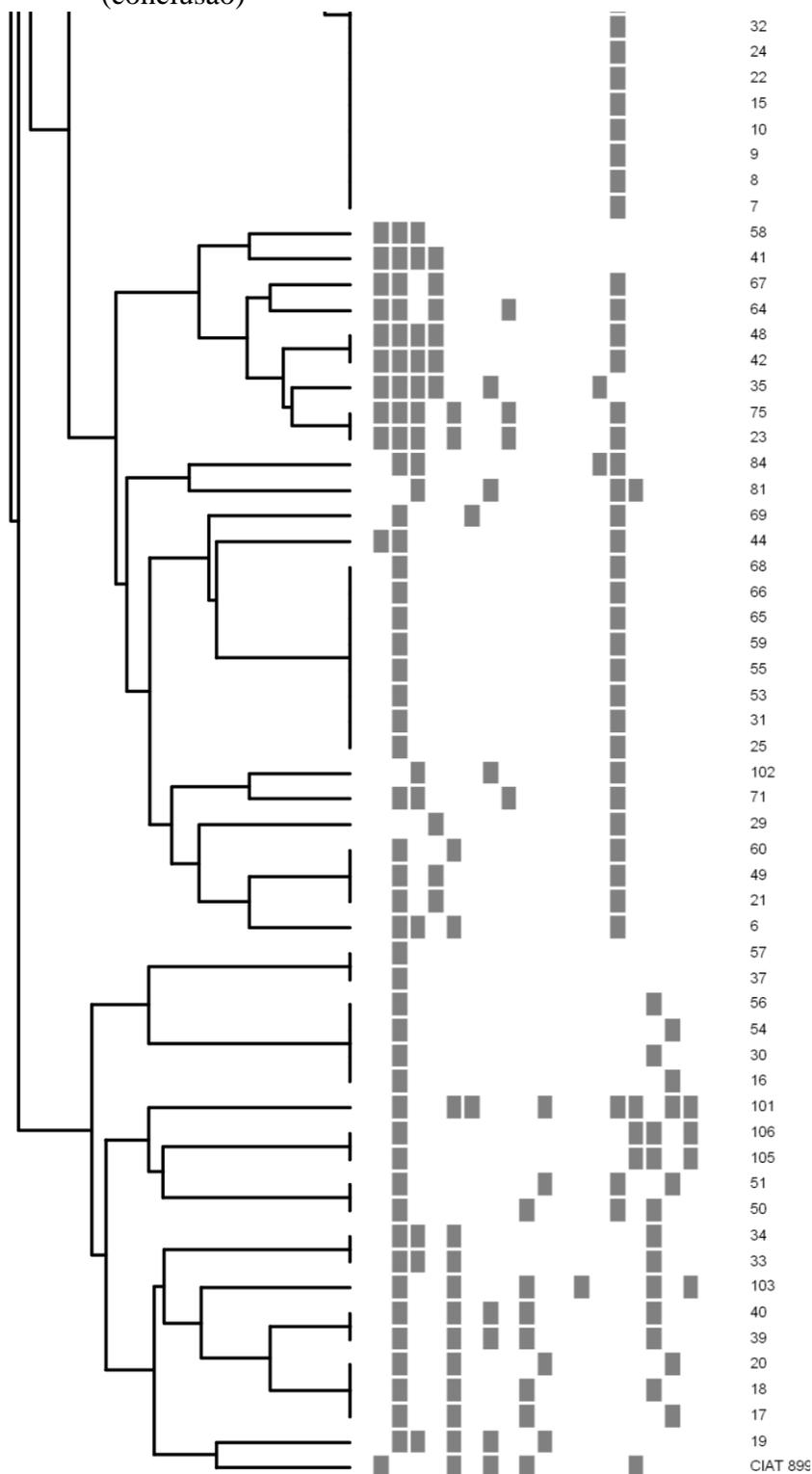
* significativo pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$) dentro de cada tratamento.

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE D — Dendrograma baseado na análise de cluster dos produtos de PCR utilizando o *primer* RPO1 e extratos de nódulos coletados na Área 1. (continua)



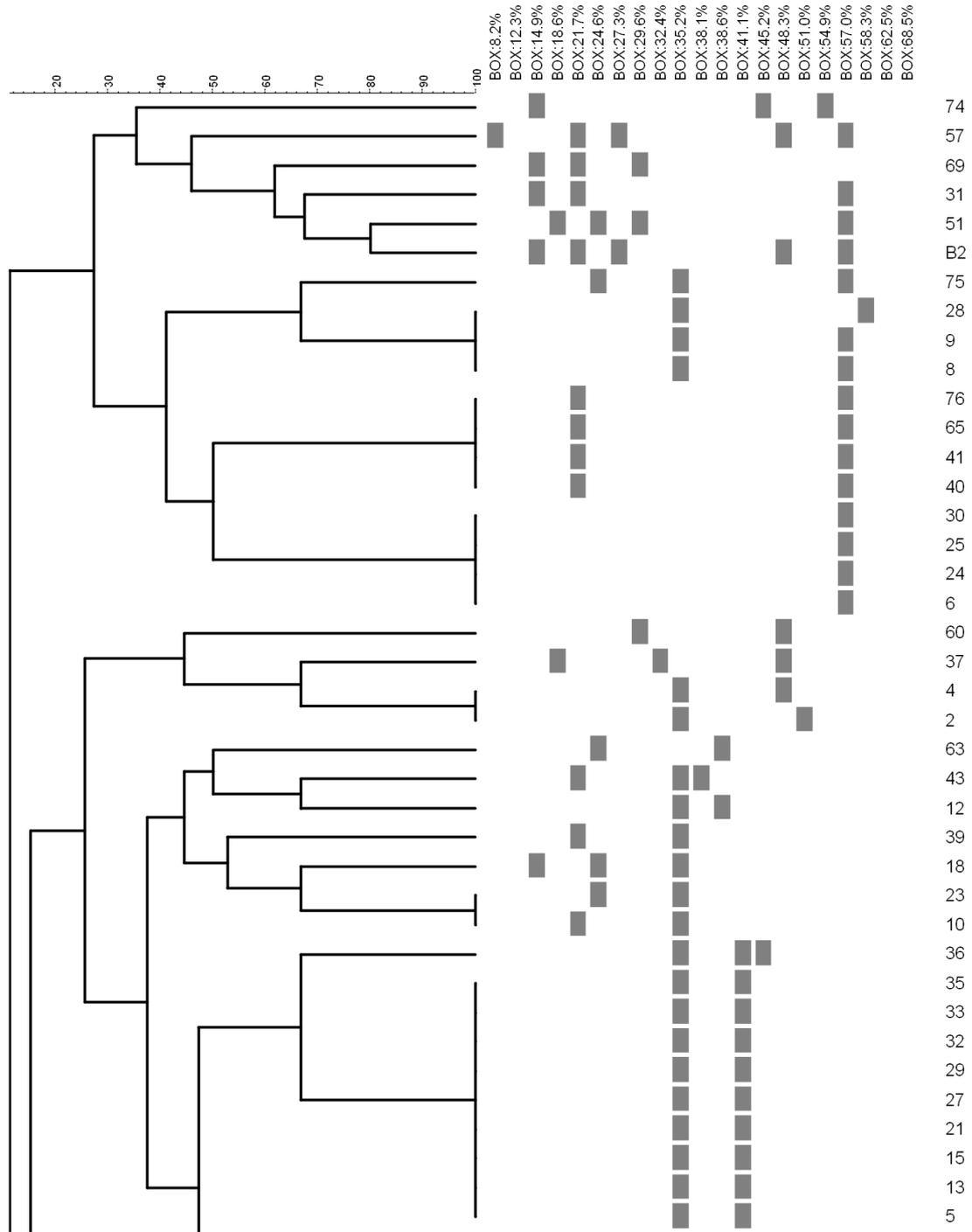
APÊNDICE D — Dendrograma baseado na análise de cluster dos produtos de PCR utilizando o *primer* RPO1 e extratos de nódulos coletados na Área 1. (conclusão)



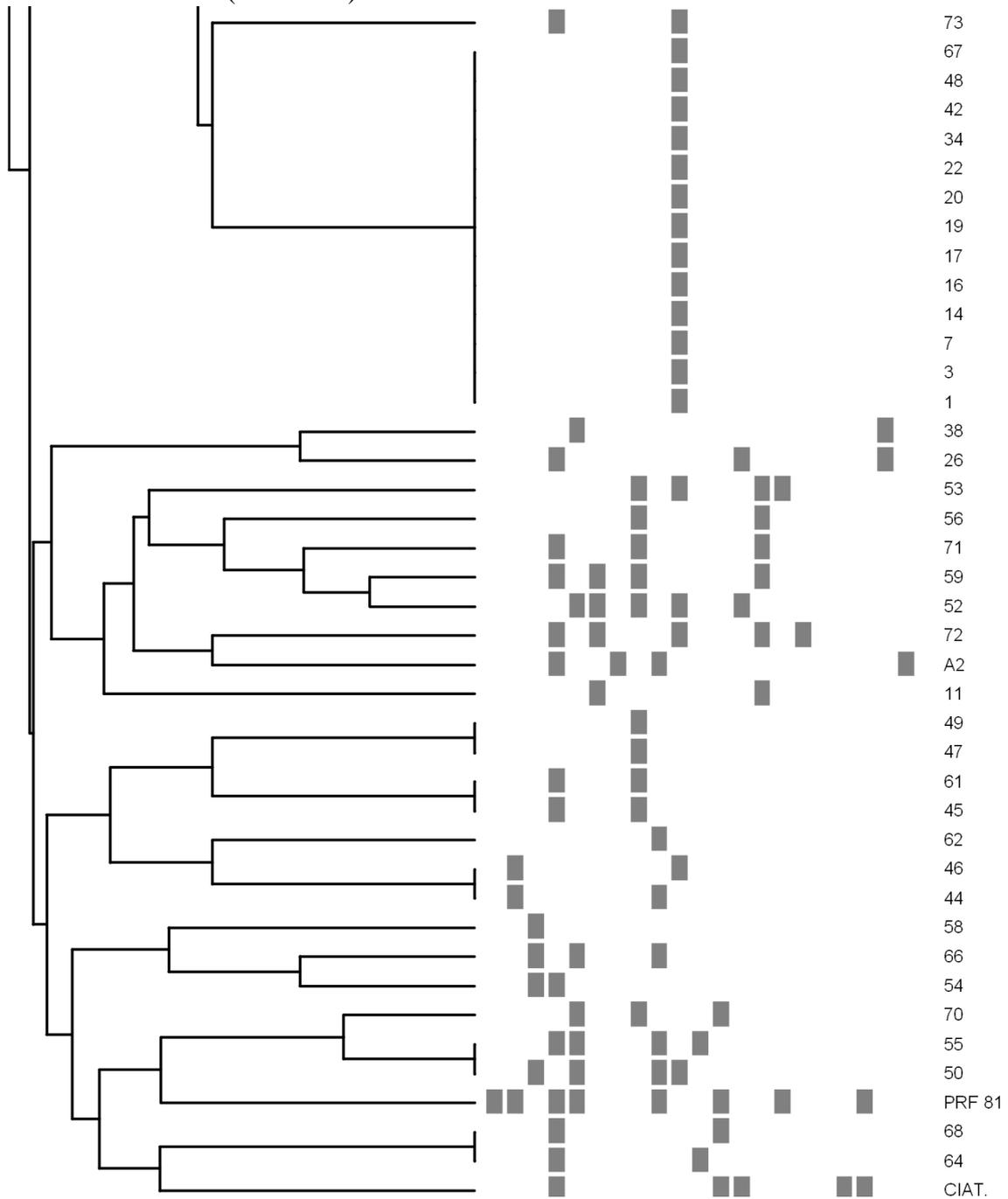
Dendrograma montado no programa BioNumerics v.7.6 utilizando o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Jaccard com níveis de otimização igual a 0,85% e tolerância de 2,0%.

Fonte: Do autor (2022).

APÊNDICE E — Dendrograma baseado na análise de cluster dos produtos de PCR utilizando o *primer* RPO1 e extratos de nódulos coletados na Área 2. (continua)



APÊNDICE E — Dendrograma baseado na análise de cluster dos produtos de PCR utilizando o primer RPO1 e extratos de nódulos coletados na Área 2. (conclusão)



Dendrograma montado no programa BioNumerics v.7.6 utilizando o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Jaccard com níveis de otimização igual a 0,85% e tolerância de 2,0%.

Fonte: Do autor (2022)

CAPÍTULO 5 MONITORAMENTO DAS ESTIRPES ELITE CIAT 899 E PRF 81 A PARTIR DE RAÍZES E SOLO RIZOSFÉRICO DE FEIJOEIRO CULTIVADO EM EXPERIMENTO DE CAMPO

RESUMO

O sucesso da inoculação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) ainda enfrenta entraves relacionados à capacidade de nodulação por parte das estirpes elite inoculadas frente aos diversos fatores bióticos e abióticos do solo, bem como a não especificidade de nodulação pela espécie *P. vulgaris*. Além disso, a persistência de rizóbios elite no solo pós-cultivo é pouco evidenciada. Devido a isso, é imprescindível que as bactérias inoculadas sejam monitoradas a partir dos nódulos e, se possível, no solo rizosférico do feijoeiro. Pensando nisso, o presente estudo avaliou em experimento de campo e casa de vegetação, a taxa de ocupação nodular do feijoeiro variedade Pérola, inoculado separadamente, e em conjunto com as estirpes CIAT 899 e PRF 81 de *Rhizobium tropici* e *R. freirei*, respectivamente. Também foi avaliada a população dessas bactérias nas raízes e solo rizosférico de feijoeiro cultivado em campo. Para tal, foram utilizados *primers* estirpes-específicos na PCR e qPCR. Os resultados mostraram que a estirpe CIAT 899 inoculada individualmente, ou em conjunto com a estirpe PRF 81, ocupou na maioria dos casos, mais de 90% dos nódulos avaliados para os experimentos de campo e casa de vegetação. Já a estirpe PRF 81 foi pouco detectada e ausente nos nódulos coletados em campo e casa de vegetação, respectivamente. Na quantificação por qPCR, para todas as coletas onde havia sido inoculada, a estirpe CIAT 899 estava presente acima de 10^5 células por grama, tanto de raiz como para o solo rizosférico. Além disso, a estirpe CIAT 899 continuou ativa no campo infectando, em média, 70% dos nódulos avaliados dos tratamentos em que foi inoculada. Os tratamentos não diferiram significativamente quanto aos parâmetros fitotécnicos, número de vagens e peso seco de 100 sementes. Porém, houve incremento significativo na produtividade em função da inoculação com as estirpes CIAT 899 e PRF 81, em relação ao tratamento não inoculado e sem N-fertilizante ($p < 0,05$).

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Rizóbios elite. Ocupação nodular. Persistência.

ABSTRACT

The success of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculation with elite strains still faces obstacles related to different soil biotic and abiotic factors and the promiscuity of this crop. In addition, the persistence of elite rhizobia in the post-cultivation soil is little evidenced. For these reasons, monitoring the inoculated rhizobia in the nodules and, if possible, in the rhizospheric soil of the common bean is essential. With this in mind, the present study evaluated, in a field experiment and a greenhouse, the nodular occupancy rate of the bean variety Pérola, inoculated with strains CIAT 899 and PRF 81 of *Rhizobium tropici* and *R. freirei* separately or in a mixture. Their populations were also evaluated in the roots and rhizospheric soil of common beans cultivated in the field. Strain-specific primers were used in PCR and qPCR. CIAT 899 occupied more than 90% of the nodules in field and greenhouse experiments, regardless of being inoculated individually or in a mixture with PRF 81. PRF 81 was absent or detected in a few nodules in the greenhouse and field, respectively. CIAT 899 was present above 10^5 cells per gram soil, both in the root and in the rhizospheric soil. In addition, CIAT 899 remained active in the field, infecting, on average, 70% of the evaluated nodules in treatments in which it was inoculated. The treatments did not differ significantly regarding phytotechnical variables, number of pods, and dry weight of one-hundred seeds. However, there was a significant increase in yield as a function of inoculation with CIAT 899 and PRF 81 compared with the uninoculated control ($p < 0.05$).

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Elite rhizobia. Nodular occupation. Persistence.

1 INTRODUÇÃO

A produção de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) pode ser melhorada com a inoculação de estirpes elite de *Rhizobium* sp. eficientes em fixar nitrogênio atmosférico e fornecê-lo à planta em forma de amônio (HUNGRIA *et al.*, 2003; SOUMARE *et al.*, 2020). Algumas dessas bactérias, como por exemplo, as estirpes CIAT 899 e PRF 81 de *Rhizobium tropici* e *R. freirei*, respectivamente, são comercializadas como inoculante para cultura do feijoeiro no Brasil (HUNGRIA *et al.*, 2003). Além disso, elas são comumente utilizadas como modelo, tal como para a seleção de novas estirpes eficientes em fixar nitrogênio atmosférico (N₂) (MERCANTE *et al.*, 2017; FACCO *et al.*, 2019), avaliação de sistemas de produção agrícola (FERNANDES *et al.*, 2015; ABOU-SHANAB *et al.*, 2019), testar o desempenho de cultivares de feijoeiro em função da inoculação com rizóbios (FERNANDES *et al.*, 2015; YAGI *et al.*, 2015), o teste da inoculação conjunta à outras bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (JESUS *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2022), ensaios relacionados à fertilidade de solo (KORIR *et al.*, 2017), dentre outros.

Em experimentos de campo, o feijoeiro inoculado com as bactérias CIAT 899 e PRF 81 pode apresentar bons incrementos de produtividade (MENDES *et al.*, 1994; PERES *et al.*, 1994; HUNGRIA *et al.*, 2003; PELEGRIN *et al.*, 2009), sendo às vezes equiparáveis a tratamentos com dose equivalente até 80 kg h⁻¹ de N-fertilizante (OTSUBO *et al.*, 2013; MERCANTE *et al.*, 2017). Entretanto, os ganhos de produtividade para o feijoeiro em função da inoculação com rizóbios elite não são sempre reproduzíveis (KANEKO *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2016). Essas controvérsias podem estar relacionadas ao fato do feijoeiro não restringir a formação de simbiose com rizóbios de outros biovars (MICHIELS *et al.*, 1998; SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020). Sabe-se também, que a população de rizóbios nativos do solo pode interferir competitivamente com estirpes elite para a nodulação do feijoeiro (DOWLING; BROUGHTON, 1986; THIES *et al.*, 1991). Além disso, as condições edafoclimáticas do solo tais como pH, temperatura, salinidade e fertilidade podem não ser favoráveis ao desenvolvimento das estirpes inoculadas (PIHA *et al.*, 1987; ZHANG *et al.*, 2020).

A persistência de rizóbios elites no solo após o cultivo do feijoeiro também é tema controverso. Nem todas as estirpes adicionadas ao sistema são capazes de persistirem (HILALI *et al.*, 1989), sendo pouco (VLASSAK *et al.*, 1996) ou satisfatoriamente detectadas a partir de plantas de feijoeiro em cultivos sucessivos sem reinoculação (TAJINI *et al.*, 2008). Entretanto, é relatado que o cultivo do feijoeiro em determinada área tende aumentar a

população de rizóbios nativos do solo (VARGAS *et al.*, 2000; VLASSAK *et al.*, 1996; RAPOSEIRAS *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2015) . Sabendo disso, são levantados questionamentos se de fato há nodulação e persistência de estirpes elite adicionadas ao sistema solo-planta.

Uma maneira de relacionar se estirpes elite inoculadas fixaram N_2 na planta é a adoção de técnicas capazes de quantificar a partir de seus tecidos o N_2 provindos da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (LARUE; PATTERSON, 1981; VÁSQUEZ-ARROYO *et al.*, 1998; IRISARRI *et al.*, 2019). Entretanto, no campo, podem existir rizóbios residentes no solo eficiente em fornecer N_2 para o feijoeiro (KAWAKA *et al.*, 2018). Dessa forma, torna-se necessário a adoção de técnicas que permitem monitorar as estirpes inoculadas. Para tal, os nódulos formados nas leguminosas podem ser analisados por diversas técnicas (MENDOZA-SUÁREZ *et al.*, 2021). Dentre elas, a de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e derivadas tem sido bastante aplicada (PILLAI *et al.*, 1992; SELENSKA-POBELL, 1994; AGUILAR *et al.*, 1998; AKIMOVA *et al.*, 2017; DIOUF *et al.*, 2019). No quesito quantificação de rizóbios no solo ou em tecidos de plantas, a utilização da PCR em Tempo Real (qPCR) também derivada da PCR convencional, se mostra como uma técnica consolidada (TRABELSI *et al.*, 2009; FURSETH *et al.*, 2010; MACDONALD *et al.*, 2011; YUDISTIRA *et al.*, 2021). Para a especificidade de ambas as técnicas, foram validados nos Capítulos 2 e 3 dessa Tese, *primers* estirpes-específicos que permitem monitorar nos nódulos e quantificar no solo, nódulo e raiz as estirpes elite CIAT 899 e PRF 81.

Como já demonstrado por Wong-Villarreal e Caballero-Mellado (2010) a avaliação de ocupação nodular com *primers* específicos por meio da PCR convencional pode informar se estirpes inoculadas estão nodulando o feijoeiro. Quanto a quantificação de rizóbios no solo, Furseth *et al.* (2010) mostraram que é possível estimar a população inoculada por meio da qPCR. Com isso, acredita-se que é possível saber se a população das estirpes alvo desse estudo é reduzida, aumentada ou estabilizada no solo, com a complementação dessas técnicas. Além disso, essas informações darão suporte para relacionar com maior exatidão os incrementos da produção vegetal do feijoeiro com a inoculação pelos rizóbios elite CIAT 899 e/ou PRF 81 e se essas bactérias persistem no solo em níveis satisfatórios para colonizar as raízes do feijoeiro num próximo cultivo.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi validar os *primers* estirpe-específicos para CIAT 899 e PRF 81 na qPCR utilizando amostras coletadas em condições ambientais. Além disso, avaliar a persistência das estirpes alvo desse estudo no solo e sua capacidade de

infecção das raízes, bem como correlacionar esses resultados com a produtividade do feijoeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estirpes utilizadas no presente trabalho

Para a aplicação em experimentos de campo e casa de vegetação utilizou-se inoculantes turfosos contendo separadamente, cada uma das bactérias *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 (SEMIA 4077) e *R. freirei* estirpe PRF 81 (SEMIA 4088) na concentração de 10^9 UFC g^{-1} , como também, para as análises moleculares, amostras do seu DNA genômico cedidas pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB).

2.2 Experimentos

Para a realização desse estudo foram montados três experimentos. Dois deles foram montados e conduzidos no mesmo período, sendo um em campo e o outro em casa de vegetação. O terceiro experimento foi montado em casa de vegetação utilizando como substrato o solo das parcelas do primeiro experimento de campo, duas semanas depois de finalizado. Antes de implantar os dois primeiros experimentos, amostras de solo (Argissolo) foram coletadas, homogeneizadas e utilizadas para análise química e quantificação das populações de rizóbios nativos pela técnica Numero Mais Provável (NMP) e a tabela estatística de Andrade e Hamakawa (1994) (TABELA 1). A correção e adubação do solo foram realizadas conforme a recomendação do manual de calagem e adubação do estado do Rio de Janeiro para a cultura do feijoeiro (PORTZ *et al.*, 2013). Todos os experimentos foram montados com a cultivar Pérola submetida aos seguintes tratamentos: inoculação com a estirpe CIAT 899; inoculação com a estirpe PRF 81; inoculação com duas estirpes CIAT 899 e PRF 81 1:1 (Mix); N-fertilizante (ureia) na dose equivalente a 40 kg ha^{-1} ; e o controle absoluto, sem inoculação e a adubação com N-fertilizante. As sementes inoculadas receberam inoculante turfoso na dose de 10^9 UFC g^{-1} para que ficassem com a carga igual a 10^6 UFC por semente.

Tabela 1 – Resultado da análise química e microbiológica do solo utilizado no experimento desse trabalho.

| Solo | pH und | Al | H+Al | Ca+Mg | K | P | C | N | SB ¹ | CEC ² | BS ³ % | Rizóbios nativos (UFC g⁻¹ solo) ⁴ |
|-------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|--|
| | | | | | | | | | | | | |
| Argissolo | 5,38 | 0,10 | 4,19 | 5,62 | 106,14 | 5,43 | 0,97 | 0,00 | 4,46 | 8,62 | 51,79 | 1,12 x 10 ² |

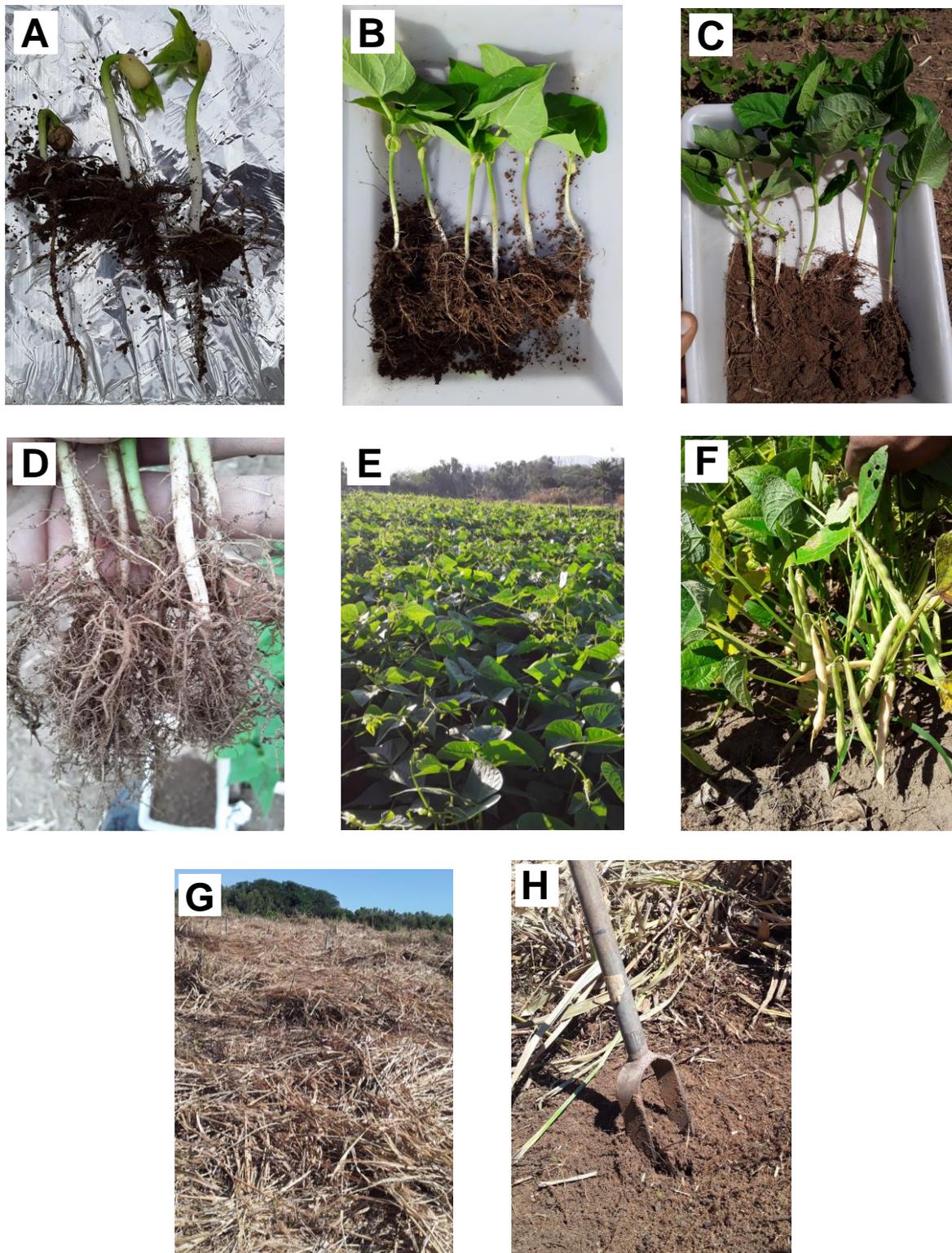
¹ Soma de Bases; ² Capacidade de troca de cátions; ³ Saturação de Bases = ((K+Ca+Mg)/Tcec)×100, onde Tcec = K+Ca+Mg+ acidez total em pH 7,0 (H+Al); ⁴ Estimado pelo método Número Mais Provável (MPN) (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994) usando como planta isca feijão comum tipo Carioca variedade Pérola. Média de três repetições (n = 3).

Fonte: Do autor (2022).

2.2.1 Experimento de campo

Em campo, os tratamentos em quatro repetições foram distribuídos em blocos casualizados. Cada uma das parcelas tinha dimensões de 4 x 5 m com oito linhas espaçadas 0,5 m entre si. Foram semeadas 15 sementes por metro linear, com potencial de germinação igual a 80%, ficando as parcelas com adensamento equivalente a 240.000 plantas por hectare. O experimento foi irrigado por um período de 2 h e turno de rega de 2 dias. Os herbicidas Flex e Fusilede 250 EW, seletivos para feijoeiro, foram aplicados na área em doses equivalentes a 1,0 e 1,2 L ha⁻¹, respectivamente. Seis plantas das extremidades, excluindo a bordadura, foram coletadas 35 dias após a semeadura (DAS) para análise do número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR) e massa seca parte aérea (MSPA). Os nódulos destacados das raízes foram contados e, 60 deles com tamanho aproximado de 2 mm, amostrados por tratamento para análise de ocupação nodular (ON). Para tal, eles foram imersos por 1 min em álcool 70%, desinfestados superficialmente por 3 min em hipoclorito de sódio 0,5%, enxaguados por cinco vezes em água destilada estéril, secos em papel toalha e armazenados a -20 °C para posteriores análises moleculares. Ainda para análises moleculares, coletou-se nos estágios fenológicos da cultura V₀₋₁ (1° dia), V₂ (10° dia), V₃ (17° dia) e V₄ (21° dia) raízes e, V₀₋₁ (1° dia), v₂ (10° dia), V₃ (17° dia), V₄ (21° dia), R₆₋₇ (52° dia), R₈₋₉ (80 ° dia) solo, este também foi coletado no 328° dia após a implantação do experimento (FIGURA 1). A parte restante dos nódulos bem como as raízes e parte aérea do feijoeiro foram desidratadas a 65 °C até peso constante para avaliação da massa seca. Quanto aos dados das variáveis: massa de 100 sementes (M100s) número de vagens (NV) e produtividade (Prod.) eles foram tomados após a colheita, realizada em 4 m lineares das quatro linhas centrais de cada parcela. Para obtenção da massa seca de 100 sementes elas foram desidratadas a 65 °C até obtenção de peso constante (BRASIL, 2009). Com isso, foi possível estimar a produtividade (kg ha⁻¹) considerando o grão com 13% de umidade relativa.

Figura 1 — Épocas de coletas das raízes e solo rizosférico do feijoeiro em campo para quantificação da população das estirpes CIAT 899 e PRF 81 inoculadas no início do ciclo da cultura: **A**- V₀₋₁; **B**- V₂; **C**- V₃; **D**- V₄; **E**- R₆₋₇; **F**- R₈₋₉; **G** e **H**- 328° dias.

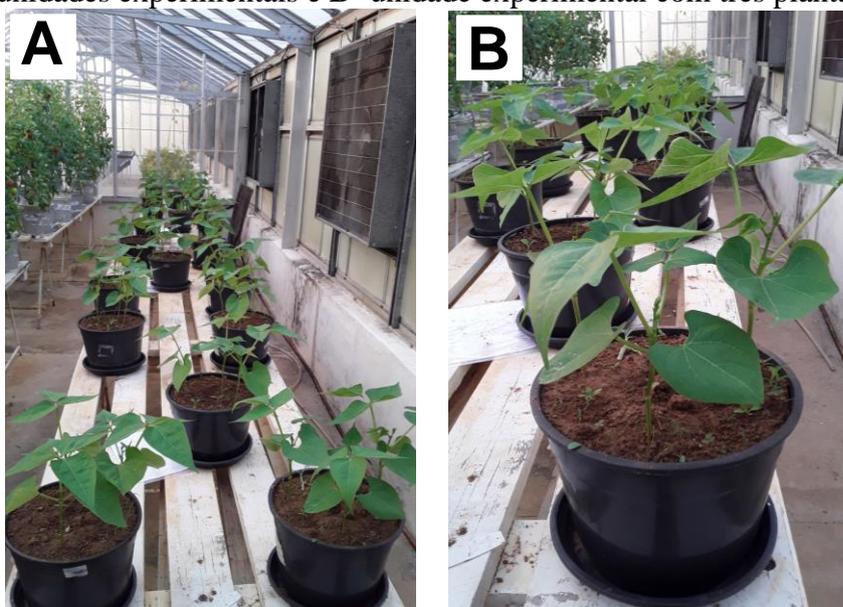


Fonte: Do autor (2022).

2.2.2 Primeiro experimento em casas de vegetação

Para esse experimento, os tratamentos citados anteriormente tiveram cinco repetições cada um, distribuídas em blocos casualizados. Foram semeadas cinco sementes por vaso de 3,7 L preenchido com solo (TABELA 1), previamente corrigido e adubado. Depois da germinação foram desbastadas duas plantas, deixando aquelas mais vigorosas (FIGURA 2). Estas receberam o mesmo volume de água até os 35 DAS onde foi realizada coleta destrutiva. Também foram avaliadas as variáveis NN, MSN, MSR, MSPA e ON. Para ocupação nodular das plantas desse experimento utilizou-se 50 nódulos de cada tratamento, preparados para a análise molecular conforme descrito anteriormente.

Figura 2 — Primeiro experimento com feijoeiro em casa de vegetação, **A**- distribuição das unidades experimentais e **B**- unidade experimental com três plantas por vaso.



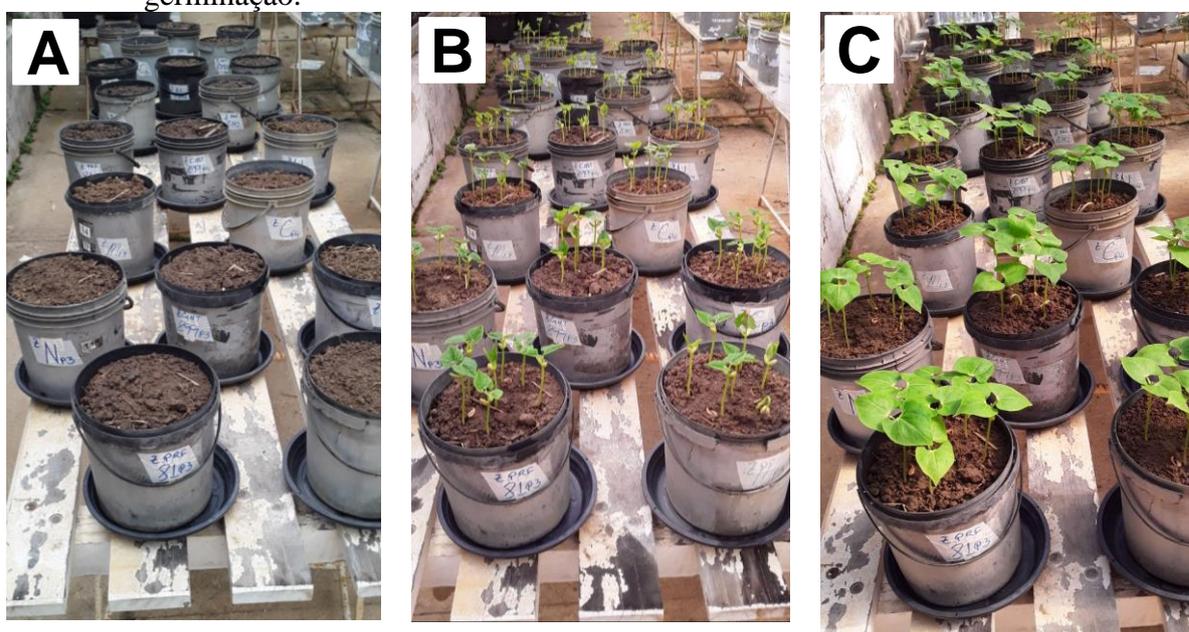
Fonte: Do autor (2022).

2.2.3 Segundo experimento em casa de vegetação

Para esse último experimento em casa de vegetação, vasos com 2,8 L foram preenchidos com solo coletado, separadamente, de cada parcela do experimento que havia sido conduzido em campo. Para tal, coletou-se o solo em três pontos da linha de semeadura e homogeneizou-o, sendo cada parcela do campo representada por uma unidade experimental ou vaso em casa de vegetação (FIGURA 3). Além disso, amostras de solos das parcelas que receberam o mesmo tratamento em campo foram misturadas e utilizadas para quantificar as

populações de rizóbios nativos por meio da técnica Numero Mais Provável (NMP) e a tabela estatística de Andrade e Hamakawa (1994). Cada vaso recebeu oito sementes sem nenhum tratamento. Após a germinação, foram desbastadas três plantas. O adensamento de cinco plantas por vaso teve como intuito induzir as raízes do feijoeiro a explorarem o maior volume de solo possível. Passados 35 DAS as plantas foram coletadas e utilizadas para análises das variáveis NN, MSN, MSR, MSPA e ON. Para análise de ocupação nodular, utilizou-se 25 nódulos coletados aleatoriamente de cada vaso.

Figura 3 — Segundo experimento com feijoeiro em casa de vegetação, **A**- distribuição dos solos de cada uma das parcelas que haviam sido cultivadas com feijoeiro em campo; **B**- feijoeiro dois dias após a germinação; **C**- feijoeiro cinco dias após a germinação.



Fonte: Do autor (2022).

2.3 Extração de DNA

Para o monitoramento das bactérias CIAT 899 e PRF 81, além do extrato de nódulos, utilizou-se o DNA isolado de raízes e solo rizosférico de feijoeiro. Para o isolamento de DNA total das raízes, elas foram desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 0,5% (v:v) por 5 min, enxaguadas por cinco vezes em água destilada estéril e enxugadas com papel toalha. Em seguida foram maceradas com pistilo e nitrogênio líquido (-172 °C) em gral, em seguida 100 mg do tecido macerado foi adicionado em microtubo de 2,0 mL estéril. Para extração do DNA total da raiz foi utilizado o tampão CTAB adaptado por Silva (2017).

Quanto ao DNA do solo rizosférico, foi isolado utilizando o kit comercial PowerSoil™ conforme recomendações do fabricante.

2.4 Avaliação de ocupação nodular utilizando PCR

A avaliação da ocupação nodular ocorreu por meio da técnica de PCR. Para isso, os nódulos de aproximadamente 2 mm que haviam sido coletados dos experimentos de campo e casa de vegetação, desinfestados e congelados, foram descongelados em gelo (4 °C) e individualmente apertados com auxílio de pinça estéril em microtubo de 0,5 mL contendo 90 µL de água ultrapura, sendo o bagaço do nódulo descartado. Para o mix de PCR adicionou-se 2,0 µL do extrato de nódulo, 1,5 µL de Tween 20 2% (v:v), 3,0 µL de buffer 5x, 0,3 µL de dNTP 10 mM, 0,15 µL de Taq Polimerase 5 U, MgCl₂, *primers* e água ultra pura para o volume final de 15,0 µL. Para detecção das estirpes alvo nos nódulos, utilizou-se dois pares de *primers* para cada uma delas, sendo eles Ciat899G144 (F/R) e Ciat899G3722 (F/R) para a CIAT 899 e Prf81G529 (F/R) e Prf81G546I (F/R) para a estirpe PRF 81 (TABELA 2). As concentrações dos *primers* e MgCl₂ bem como as condições de PCR para cada um deles são informados na Tabela 2. A Equação 1 foi utilizada para calcular a eficiência de ocupação nodular por parte de cada uma das estirpes alvo conforme Mendoza-Suárez *et al.* (2020).

$$CI = (Na/Nt) * 100 \quad (1)$$

Onde, *CI* é competitividade, *Na* é o número de nódulos ocupados pela estirpe alvo e *Nt* é o número total de nódulos analisados por planta.

Tabela 2 — Concentrações de reagentes e condições para PCR e qPCR dos *primers* utilizados no presente estudo.

| Espécie Estirpe | Reagentes | | | | Condições | |
|---------------------------------|----------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|--|---|
| | Nome do primer | Sequência (5'-3') | PCR nM | MgCl ₂ mM | qPCR nM | Desnaturação/Anelamento/ Extensão |
| <i>R. tropici</i> (CIAT 899) | Ciat899G139 F | CAGATCATCGCCAGTTTCGC | - | - | 200 | 95 °C por 2 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 30 s) x 32 ciclos |
| | Ciat899G139 R | ACCTAGAATCACATGCTCGTC | - | - | 200 | |
| | Ciat899G144 F | CGTCAGCACTGCGAAGATGC | 150 | 1,4 | - | 95 °C por 2 min (95 °C por 15s; 62 °C por 30 s; 72°C por 30 s) x 32 ciclos; 72°C por 5 min |
| | Ciat899G144 R | CGGCAGGACATGGAAACATCG | 150 | | - | |
| | Ciat899G3722 F | CCCAATGATCGGTTACAGGATGC | 150 | 1,7 | 200 | 95 °C por 2 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 30 s) x 32 ciclos |
| Ciat899G3722 R | ATCTTGTCGCACCGTCCACG | 150 | 200 | | | |
| <i>R. freirei</i> (PRF 81) | Prf81G19 F | AGGATATGGCAAAGGCAACACAG | - | - | 200 | 95 °C por 2 min (95 °C por 5 s; 62 °C por 30 s) x 32 ciclos |
| | Prf81G19 R | GCCGTCAGGTTGACCATGTG | - | - | 200 | |
| | Prf81G529 F | CGGAGGAACAAAAGCAGCG | 133 | 1,7 | - | 95 °C por 2 min (95 °C por 15 s; 62 °C por 30 s; 72 °C por 30 s) x 35 ciclos; 72 °C por 5 min |
| | Prf81G529 R | GGTCTTAAGGTTTCGAGGCG | 133 | | - | |
| | Prf81G546I F | TTGATGAGCTTCGGACTTGC | 133 | 2,5 | - | 95 °C por 2 min (95°C por 15s; 62 °C por 30 s; 72 °C por 30 s) x 35 ciclos; 72°C por 5 min |
| | Prf81G546I R | GTCCCAGAAGCATCAAGAGG | 133 | | - | |
| Prf81G561 F | GAGGTGGATCTTCTGATCG | - | - | 250 | 95 °C por 2 min (95 °C por 5 s; 63 °C por 30 s) x 32 ciclos | |
| Prf81G561 R | CTCGGGTAAGTCTCGTATC | - | - | 250 | | |
| <i>Rhizobium</i> sp. | RPO1 | AATTTTCAAGCGTCGTGCCA | 133 | 2,5 | - | 96 °C por 5 min (95 °C por 1 min; 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min) x 40 ciclos; 72 °C por 8 min |
| Gene 16S rRNA | 1055y F | ATGGYTGTCGTCAGCT | - | - | 300 | 95 °C por 2 min (95 °C por 15 s, 59 °C por 30 s) x 40 ciclos |
| | 1392 R | ACGGGCGGTGTGTAC | - | - | 300 | |

Fonte: Do autor (2022).

2.4.1 Análise das amostras de DNA isoladas de raízes e solo rizosférico utilizando qPCR

O número de cópias total para o gene 16S rRNA foi quantificado por qPCR a partir das amostras de DNA total isoladas das raízes e do solo rizosférico de feijoeiro, para tal utilizou-se os *primers* 1055y (RITALAHTI *et al.*, 2006) e 1392 (LANE, 1991). O número de cópias do fragmento de DNA alvo da estirpe CIAT 899 foi determinado pela média da quantificação na qPCR utilizando os *primers* Ciat899G139 (F/R) e Ciat899G3722 (F/R). Já a quantificação da estirpe PRF 81 ocorreu com média dos resultados obtidos pelos *primers* Prf81G19 (F/R) e Prf81G561 (F/R) na qPCR (TABELA 2). Para tal, as amostras do DNA total isolado de raiz e solo foram padronizadas para concentração final igual a 5 e 10 ng μL^{-1} , respectivamente. As amostras de DNA de cada uma das matrizes foram, separadamente, analisadas em triplicatas na qPCR. O mix para as reações foi preparado utilizando 6,5 μL SYBER Green (Promega), *primers* (TABELA 2), 5,0 μL da amostra de DNA e água ultrapura para o volume final de 15,0 μL . As condições de reação para cada par de *primer* foram preparadas conforme descrito na Tabela 2. Para a construção da curva padrão para o par de *primers* 1055yF/1392R, usou-se o produto de PCR gerado por eles, que foi purificado e quantificado por fluorometria de massa utilizando o aparelho QubitTM. O número de cópias foi calculado conforme a Equação 2, sendo a curva plotada com pontos em diluição seriada variando de 10^9 a 10^2 cópias de fragmentos de DNA alvo e o fator diluição igual a 10 vezes. As demais curvas dos *primers* desenhados para as estirpes CIAT 899 e PRF 81 foram montadas utilizando o DNA genômico dessas bactérias, separadamente, conforme o par de *primer*. O número de cópias foi calculado conforme a equação 2, e os pontos passaram por diluição de 25 a 0,00025 ng de DNA genômico equivalente a faixa de $10^{6,5}$ a $10^{1,5}$ cópias, utilizando o fator diluição igual a 10 vezes. A eficiência de amplificação de cada um dos *primers* foi calculada conforme a Equação 3. Já para calcular o número de fragmentos de DNA alvo por grama de solo ou raiz em função dos resultados obtidos para a massa de 25 e 50 ng de DNA utilizada na qPCR, respectivamente, utilizou-se a Equação 4.

$$\text{Número de cópias} = (x * 6,0221 * 10^{23}) * (N * 660 * 1 * 10^9)^{-1} \quad (2)$$

Onde, **Número de cópias**, fragmentos de DNA em função de: x , massa de dsDNA (ng); $6,0221 * 10^{23}$, constante de Avogadro; N , tamanho do genoma ou gene em pares de base (pb);

660, massa média em ng de 1 pb de DNA dupla fita; $1 \cdot 10^9$, constante usada para converter a massa do fragmento de DNA amplificado, de grama (g) para nanograma (ng).

$$E = (10^{-\left(\frac{1}{s}\right)} - 1) * 100 \quad (3)$$

Onde E é a eficiência de amplificação (%) em função de: s , inclinação da curva de calibração ou equação de regressão linear (y) que representa a concentração logarítmica do DNA padrão versus o valor de Ct (números de ciclos no ensaio de qPCR para atingir o limiar de fluorescência).

$$Nc = (A * B * C) * (D * E)^{-1} \quad (4)$$

Onde, Nc representa a quantidade de fragmentos alvo ou células g^{-1} em função de: A , número de fragmentos alvo ou células observadas para média do valor Ct na qPCR; B , concentração de DNA genômico isolado para cada amostra ($ng \mu L^{-1}$); C , volume de DNA total extraído (μL); D , massa de DNA total empregado no ensaio de qPCR (ng); e E , massa de matriz utilizada para extração de DNA total (g).

2.5 Diversidade da ocupação nodular por rizóbios nativos

Para o levantamento da diversidade de rizóbios nativos do solo pós-cultivo sucessivo com feijoeiro, na PCR convencional foi analisado separadamente o extrato de 120 nódulos, coletados de plantas cultivadas em solo derivado do tratamento controle absoluto em campo e avaliado em casa de vegetação e, como padrão o DNA das estirpes alvo CIAT 899 e PRF 81. Para tal, utilizou-se o *primer* randômico PRO1 (RICHARDSON *et al.*, 1995). Ao mix para a PCR foi adicionado 3,0 μL de buffer 5x, $MgCl_2$ (TABELA 2), 0,5 μL de dNTP 10 mM, *primer* (TABELA 2), 2,0 μL de Tween® 20 2% v:v, 0,15 μL Taq polimerase 5 U, 2,0 μL do extrato de nódulo e água ultra pura para o volume final de 15,0 μL . As condições de PCR para o *primer* PRO1 foram realizadas conforme a Tabela 2. O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 3% m:v e submetido a eletroforese (70 V 3 h⁻¹). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídeo, descorado sob agitação com água destilada por 5h e foto documentado. O perfil de bandas gerado foi empregado para análise de relação genética entre as estirpes de rizóbios nativos utilizando o programa BioNumerics v.7.6 (APPLIED MATHS, BÉLGICA). As matrizes de similaridade para a construção do dendrograma foram calculadas pelo

coeficiente de correlação de Jaccard e o agrupamento de matrizes de similaridade foi realizado pelo algoritmo Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) sendo os níveis de otimização igual a 0,85%, tolerância de 2,0 e linha de corte para 70% de similaridade.

2.6 Estatística

Os dados foram analisados quanto à distribuição normal pelo teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), homocedasticidade pelo teste de Bartlett ($p > 0,05$), Análise de Variância ANOVA ($p < 0,05$), seguida do teste de média Duncan ($p < 0,05$) utilizando o pacote easyanova (ARNHOLD, 2013) no programa R (R CORE TEAM, 2021). Entretanto, para obtenção de normalidade e homogeneidade os dados para as variáveis NN < 2mm, NN > 2mm, NN total, MSN < 2mm, MSN > 2mm e MSN total de campo foram transformados por meio da equação: $\sqrt{(\text{variável}+1)}$.

3 RESULTADOS

3.1 Experimento de campo

O feijoeiro cultivado em campo aparentemente apresentou bom desenvolvimento com a maioria das parcelas inoculadas apresentando nódulos, uniformidade das plantas e excelente número de vagens (FIGURA 4). As variáveis referentes à nodulação do feijoeiro reportam que os tratamentos inoculados com a estirpe CIAT 899 e Mix (CIAT 899 e PRF 81) contribuíram significativamente para maior média do número e massa seca de nódulos em relação ao tratamento inoculado com a estirpe PRF 81 e os controles absoluto e nitrogenado (TABELA 3). Quanto aos dados fitotécnicos, observa-se que a massa seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSPA) bem como o número de vagens (NV) não diferiram significativamente entre os tratamentos. Para massa de 100 sementes (M100s) os tratamentos inoculados e controle com dose equivalente a 40 kg ha⁻¹ de N-fertilizante apresentaram médias iguais pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$). Entretanto, a esse nível de significância, para a mesma variável, apenas o tratamento com o Mix foi diferente do tratamento sem inoculação e dose de N-fertilizante (TABELA 3). Com relação às médias de produtividade em kg ha⁻¹, observa-se que houve incremento nos tratamentos inoculados, significativamente igual ao tratamento que recebeu dose equivalente a 40 kg ha⁻¹ de N pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) (TABELA 3). O incremento de produtividade observado em campo por parte dos tratamentos inoculados com as estirpes CIAT 899, PRF 81 e Mix foi de 904, 709 e 724 kg ha⁻¹ de grãos de feijão-comum, respectivamente, em relação ao tratamento controle absoluto. A respeito da ocupação nodular, observou-se que 98% e 93% dos nódulos destacados do feijoeiro inoculado em campo com a CIAT 899 e o Mix estavam ocupados pela estirpe alvo CIAT 899, respectivamente (TABELA 3). Já a presença da estirpe PRF 81 foi muito baixa nos nódulos do feijoeiro com ela inoculado (TABELA 3).

Figura 4 — Feijoeiro em campo apresentando **A-** boa nodulação; **B-** uniformidade e **C-** considerável número de vagens.



Fonte: Do autor (2022).

Tabela 3 — Médias para as variáveis número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca parte aérea (MSPA), massa de 100 sementes (M100s), número de vagens (NV), produtividade (Prod.) e ocupação nodular (ON) para o feijoeiro cultivado em experimento de campo sob cinco tratamentos.

| Trat. | Var. | NN | NN | NN | MSN | MSN | MSN | MSR | MSPA | M 100s | NV | Prod. | Ocupação nodular (%) | |
|-------|-------------------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|---------------------|---------------------|---------|---------------------|---------------------|----------------------|--------|
| | | < 2mm | > 2mm | total | < 2mm | > 2mm | total | plant ⁻¹ | Plant ⁻¹ | 13% U | Plant ⁻¹ | (p < 0,05) | CIAT 899 | PRF 81 |
| | | und | und | und | mg | mg | mg | mg | g | g | und | kg ha ⁻¹ | | |
| | CIAT 899 | 595 a | 150 a | 745 a | 95,0 ab | 195,5 a | 290,5 a | 433 a | 5,22 a | 26,7 ab | 9 a | 2,585 a | 98 | nd |
| | PRF 81 | 30 b | 6 b | 36 b | 11,5 b | 0,0 b | 11,5 b | 443 a | 5,30 a | 27,2 ab | 9 a | 2,390 a | nd | 04 |
| | Mix | 598 a | 71 ab | 669 a | 152,4 a | 71,2 a | 223,6 a | 393 a | 4,75 a | 28,0 a | 9 a | 2,405 ab | 93 | 02 |
| | Cont. Abs. | 7 b | 3 b | 9 b | 1,4 b | 0,0 b | 1,4 b | 396 a | 4,73 a | 25,8 b | 9 a | 1,681 b | nd | nd |
| | D40kgN | 19 b | 1 b | 20 b | 2,8 b | 0,0 b | 2,8 b | 450 a | 5,40 a | 26,6 ab | 10 a | 2,558 a | nd | nd |

Para obtenção de normalidade e homogeneidade os dados das variáveis NN < 2mm, NN > 2mm, NN total, MSN < 2mm, MSN > 2mm, MSN total foram transformados por meio da equação: $\sqrt{(\text{variável}+1)}$. Médias com a mesma letra na coluna são estatisticamente iguais pelo teste Duncan ($p < 0,05$) com exceção da Prod. (produtividade) com níveis de significância indicados. nd: não detectado.

Fonte: Do autor (2022).

3.2 Primeiro experimento em casa de vegetação

No geral, os dados coletados para esse experimento reforçaram os levantados anteriormente para o experimento de campo. Como pode ser observado, utilizando o teste de médias Duncan ($p < 0,05$) as médias relacionadas à nodulação dos tratamentos inoculados foram, na maioria dos casos, estatisticamente diferentes daquelas observadas nos tratamentos controles (TABELA 4). Quanto às variáveis fitotécnicas, observou-se diferença significativa apenas para massa seca de parte aérea (MSPA) do tratamento com dose equivalente a 40 kg ha^{-1} N-fertilizante (TABELA 4). Apesar dos dados relacionados à nodulação terem sido estatisticamente iguais para os tratamentos inoculados, a estirpe PRF 81 não foi detectada nos nódulos coletados de plantas com ela inoculadas. Na ocupação nodular foi detectada apenas a estirpe CIAT 899, ocupando 94% e 40% dos nódulos destacados do feijoeiro inoculado com a estirpe CIAT 899 e o Mix, respectivamente (TABELA 4).

Tabela 4 - Médias observadas para os dados de nodulação, número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) maiores e menores do que 2 mm e dados fitotécnicos massa seca de raiz (MSR) massa seca parte aérea (MSPA) e ocupação nodular (ON) para o feijoeiro cultivado em experimento de casa de vegetação.

| Trat. | Var. | NN | NN | NN | MSN | MSN | MSN | MSR | MSPA | Ocupação nodular (%) | |
|------------|------|-------|-------|-------|---------|----------|---------|---------------------|---------------------|----------------------|--------|
| | | <2mm | >2mm | total | < 2mm | >2mm | total | plant ⁻¹ | Plant ⁻¹ | CIAT 899 | PRF 81 |
| | | und | und | und | mg | mg | mg | mg | g | | |
| CIAT 899 | | 104 a | 23 a | 127 a | 37,10 a | 34,22 a | 71,38 a | 718 a | 2,43 b | 94 | nd |
| PRF 81 | | 73 a | 21 a | 94 b | 33,30 a | 25,12 ab | 58,40 a | 600 a | 2,33 b | nd | nd |
| Mix | | 70 a | 15 ab | 85 a | 25,78 a | 19,34 ab | 45,10ab | 636 a | 2,51 b | 40 | nd |
| Cont. Abs. | | 5 b | 5 b | 10 b | 3,52 b | 8,98 b | 9,98 b | 620 a | 2,36 b | nd | nd |
| D40kgN | | 5 b | 5 b | 10 b | 1,00 b | 4,12 b | 7,64 b | 642 a | 3,10 a | nd | nd |

Médias de 4 repetições ($n = 4$) sendo que, médias com a mesma letra na coluna são estatisticamente iguais pelo teste Duncan ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor (2022).

3.3 Segundo experimento em casa de vegetação

Para esse experimento, observou-se que os solos derivados das parcelas de campo, anteriormente cultivadas com feijoeiro, havia aumentado sua população de rizóbios nativos (TABELA 5) se comparado a população quantificada inicialmente antes da montagem do experimento de campo (TABELA 1). As parcelas de campo que haviam recebido sementes de feijão-comum inoculadas apresentaram maior população de rizóbios enquanto que as testadas com N-fertilizante menor população de rizóbios (TABELA 5). Apesar disso, observa-se que não houve diferença significativa para as variáveis fitotécnicas MSR e MSPA (TABELA 5). Já para as variáveis relacionadas à nodulação, houve diferença significativa pelo teste de médias Duncan ($p < 0,05$) para a MSN < 2 mm e MSN total. Quanto à ocupação nodular, houve destaque por parte da estirpe CIAT 899. Sendo ela, detectada na porcentagem igual a 59%, 96%, 17% e 01% do total de nódulos de plantas cultivadas em solo que haviam recebido em campo tratamentos com CIAT 899, Mix, controle absoluto e com dose de 40 kg ha⁻¹ de N, respectivamente (TABELA 5). Entretanto, a estirpe PRF 81 foi detectada em apenas 04% dos nódulos de plantas cultivadas em solo inoculado com ela no campo.

Tabela 5 — Médias para os dados fitotécnicos número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca parte aérea (MSPA) e ocupação nodular (ON) para o feijoeiro cultivado em experimento de campo sob diversos tratamentos.

| Trat. ¹ | Var. | NN | NN | NN total ² | MSN | MSN | MSN total ² | MSR plant ^{-1 2} | MSPA | Ocupação nodular (%) | | Rizóbios (UFC g ⁻¹ solo) ² |
|--------------------|------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------|--------|--|
| | | < 2mm ₂ | > 2mm ₂ | | < 2mm ² | > 2mm ₂ | | | Plant ^{-1 2} | CIAT 899 | PRF 81 | |
| | | und | und | und | mg | mg | mg | mg | g | | | |
| CIAT 899 | | 25 a | 28 a | 53 a | 10,75 b | 45,85 a | 56,60 ab | 354 a | 1,33 a | 59 | nd | 1,49 x10 ⁷ |
| PRF 81 | | 54 a | 12 a | 66 a | 27,80 a | 33,82 a | 61,62 ab | 265 a | 0,97 a | nd | 04 | 1,09 x10 ⁷ |
| Mix | | 44 a | 30 a | 74 a | 16,17 ab | 26,25 a | 42,42 a | 253 a | 0,97 a | 96 | nd | 1,49 x10 ⁸ |
| Cont. Abs. | | 49 a | 17 a | 66 a | 25,62 ab | 47,05 a | 72,67 a | 310 a | 1,14 a | 17 | nd | 4,62 x10 ⁶ |
| D40kgN | | 39 a | 12 a | 51 a | 22,47 ab | 27,75 a | 50,22 ab | 355 a | 1,23 a | 01 | nd | 1,09 x10 ⁵ |

¹ Aplicados anteriormente em campo; ² Médias de 4 repetições ($n = 4$) sendo que, médias com a mesma letra na coluna são estatisticamente iguais pelo teste Duncan ($p < 0,05$); ³ Estimado pelo método Número Mais Provável (MPN) (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994) usando como planta isca feijão comum tipo Carioca variedade Pérola. Média de três repetições ($n = 3$).

Fonte: Do autor (2022).

3.4 Diversidade de rizóbios nativos que nodularam o feijoeiro

Utilizando o *primer* randômico RPO1 e 120 extratos de nódulos na PCR convencional, observou-se amplificação de apenas 94 amostras (FIGURA 5). Essas resultaram em 50 perfis diferentes, variando de 1 a 7 produtos amplificados e que foram agrupados conforme a Figura 5. O perfil predominante representou aproximadamente 13,8% (13/94) dos perfis amplificados seguidos por outros com 7,44% (7/94) e 6,38% (6/94) (FIGURA 5).

Figura 5 — Dendrograma montado a partir do perfil de bandas amplificadas na PCR utilizando o *primer* RPO1 e extrato de nódulos do feijoeiro cultivado no segundo experimento em casa de vegetação. (continua)

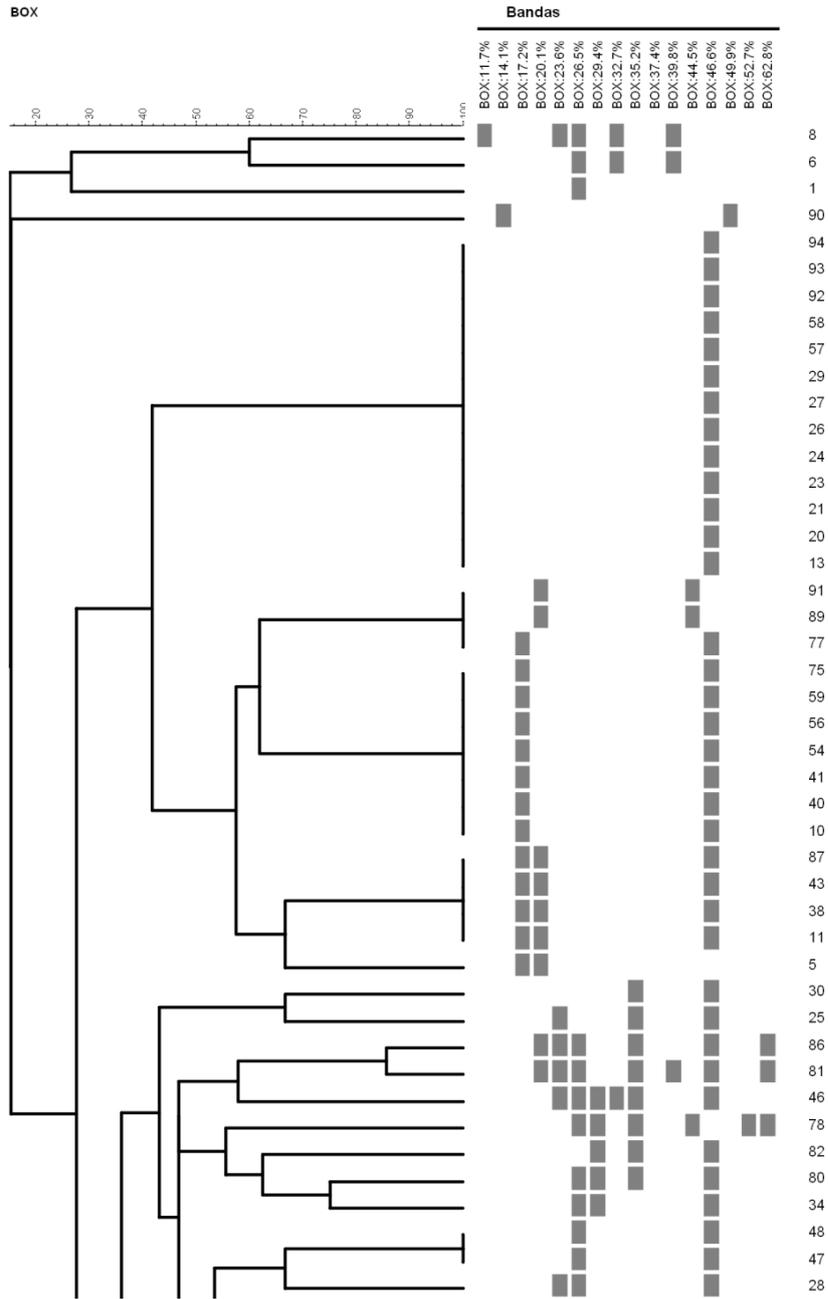
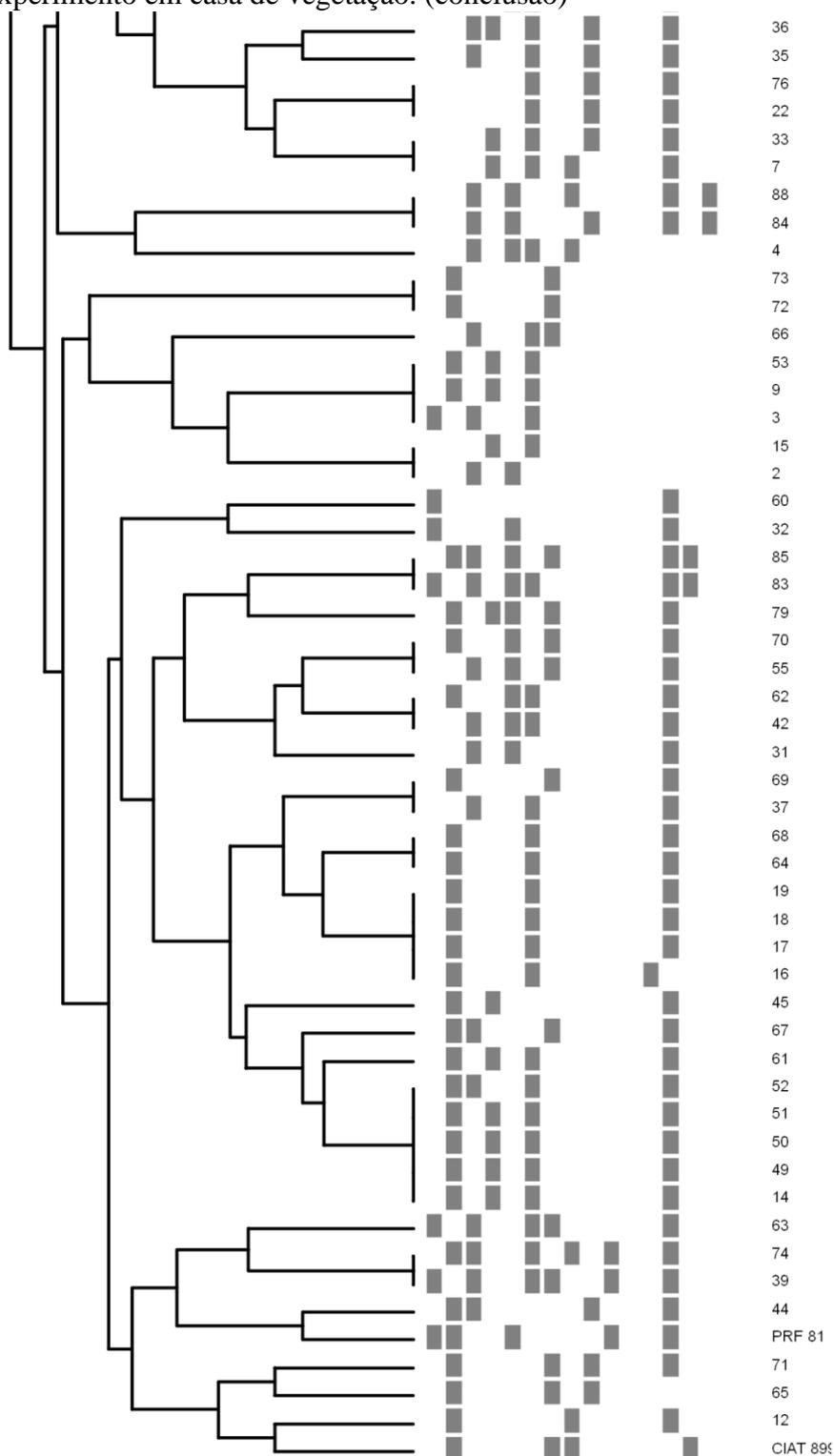


Figura 5 — Dendrograma montado a partir do perfil de bandas amplificadas na PCR utilizando o *primer* RPO1 e extrato de nódulos do feijoeiro cultivado no segundo experimento em casa de vegetação. (conclusão)



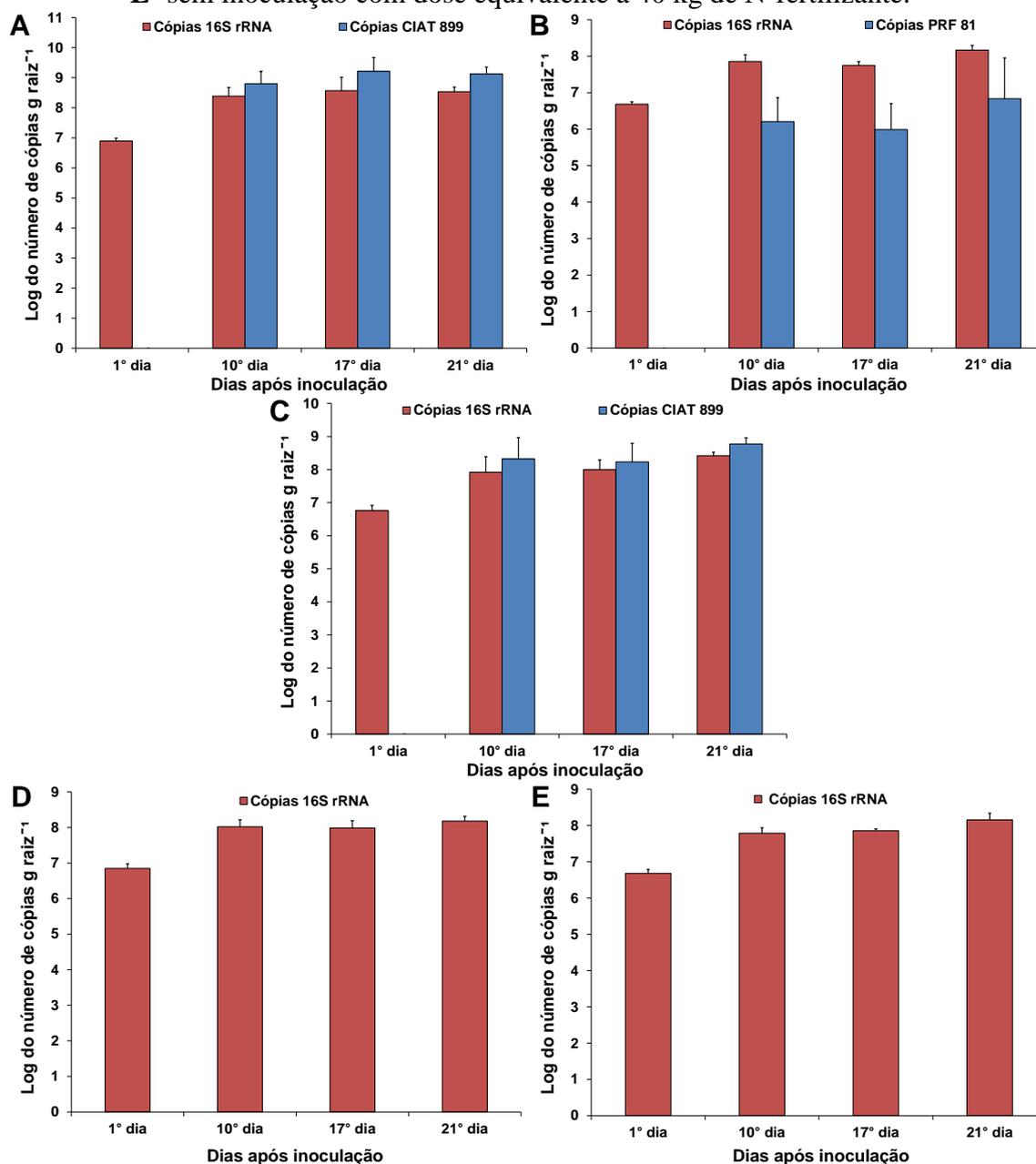
Dendrograma montado no programa BioNumerics v.7.6 utilizando o algoritmo UPGMA e coeficiente de correlação de Jaccard com níveis de otimização igual a 0,85% e tolerância de 2,0%.

Fonte: Do autor (2022).

3.5 Quantificação das estirpes CIAT 899 e PRF 81

Quanto à quantificação das estirpes CIAT 899 e PRF 81 no solo rizosférico e nas raízes de feijoeiro, observou-se que a estirpe CIAT 899 teve sua população quantificada tanto nas raízes como em solo rizosférico do tratamento onde havia sido inoculada, com exceção para a primeira coleta de raízes (FIGURAS 6 e 7). A estirpe CIAT 899 também foi quantificada a partir do solo coletado na linha de plantio da área onde haviam sido empregados tratamentos inoculados com ela, após 328 dias de sua introdução no sistema ou 248 dias após o cultivo com feijoeiro na área (FIGURA 8AC). Já a população da estirpe PRF 81 foi monitorada apenas nas últimas três coletas das raízes de plantas inoculadas somente com ela (FIGURA 6) e no 80º dia após a semeadura no solo rizosférico de plantas inoculadas com ela, individualmente e em conjunto com a estirpe CIAT 899 (FIGURA 8). Como pode ser notado nas Figuras 6 e 7 a população das estirpes CIAT 899 e PRF 81 não foram quantificadas a partir do solo rizosférico das raízes de feijoeiro cultivado nos tratamentos controles, não inoculado sem e com dose de N-fertilizante. Isso mostra que há especificidade por parte dos *primers* validados nos Capítulos 2 e 3 dessa Tese para detecção e quantificação das estirpes CIAT 899 e PRF 81. Em alguns casos, o número de cópias do gene 16S rRNA foi menor do que o número de bactérias alvo detectadas na mesma amostra (FIGURA 6AC). Isso ocorreu em função da baixa eficiência de amplificação apresentada pelos *primers* 1055y e 1392, igual a 85%, nos ensaios de qPCR em que as amostras estavam envolvidas. Enquanto que, a eficiência de amplificação dos *primers* para as estirpes CIAT 899 e PRF 81 ficaram dentro da faixa ideal entre 95% e 105%, para todos os ensaios de qPCR.

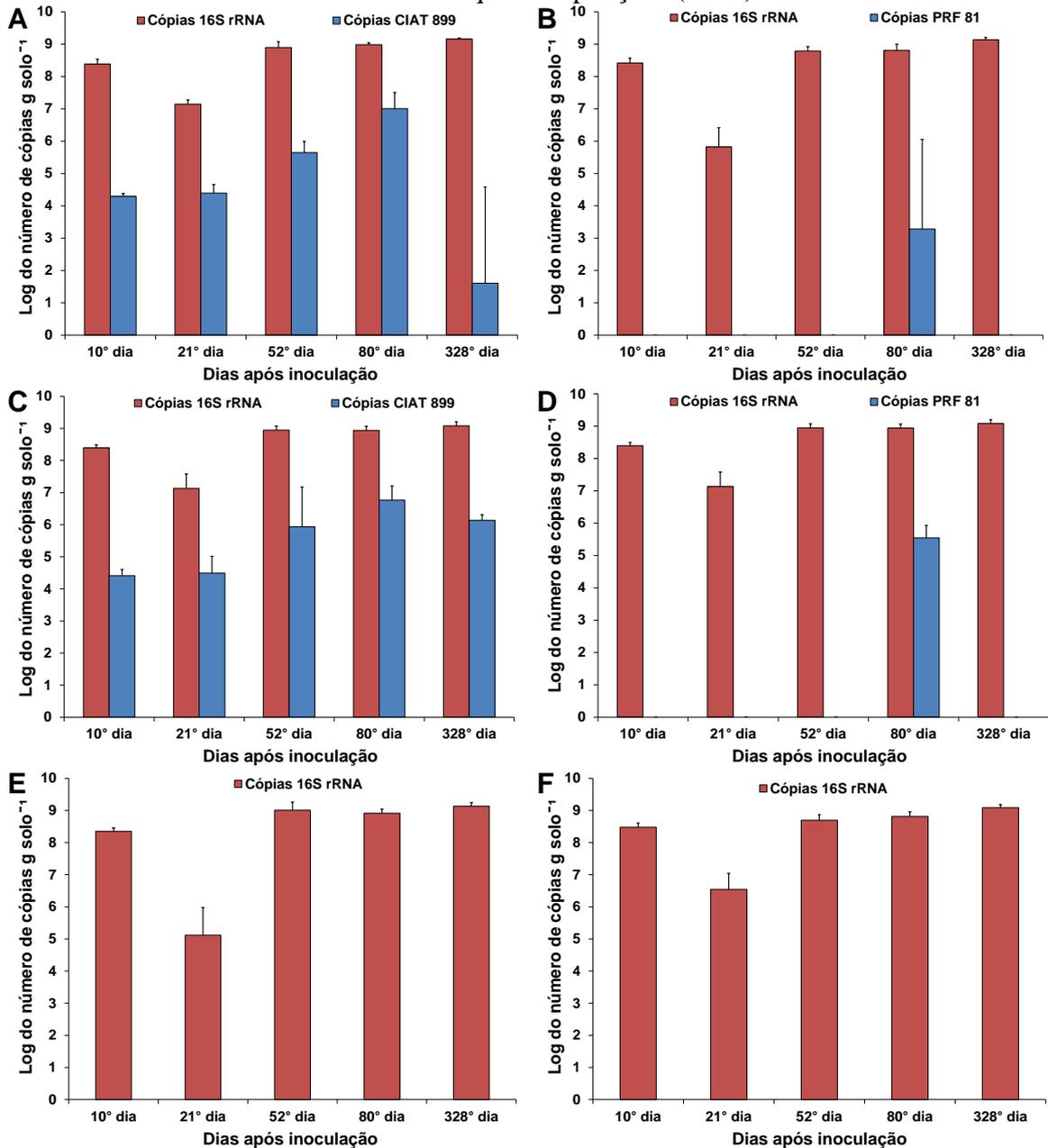
Figura 6 — Número de cópias (log) dos fragmentos de DNA único no genoma das estirpes CIAT 899 e PRF 81, e do gene 16S rRNA detectados ao longo de 21 dia nas raízes de feijoeiro cultivado em campo sob os tratamentos: **A-** inoculado com a estirpe CIAT 899, **B-** inoculado com a estirpe PRF 81, **C-** inoculado com as estirpes CIAT 899 e PRF 81; **D-** sem inoculação e dose de N, controle absoluto e **E-** sem inoculação com dose equivalente a 40 kg de N-fertilizante.



As barras em vermelho são médias de quatro repetições biológicas e três repetições técnicas. As barras em azul são médias de quatro repetições biológicas, três repetições técnicas e quantificação de dois *primers* para cada estirpe alvo.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 7 — Número de cópias (log) dos fragmentos de DNA único no genoma das estirpes CIAT 899 e PRF 81, e do gene 16S rRNA detectados ao longo de 328 dias no solo rizosférico do feijoeiro cultivado em campo sob os tratamentos: A- inoculados com a estirpe CIAT 899, B- inoculado com a estirpes PRF 81, C e D- inoculado com as estirpes CIAT 899 e PRF 81; E- sem inoculação e dose de N-fertilizante, controle absoluto e F- sem inoculação com dose equivalente a 40 kg de N-fertilizante. Médias de quatro repetições (n = 4).

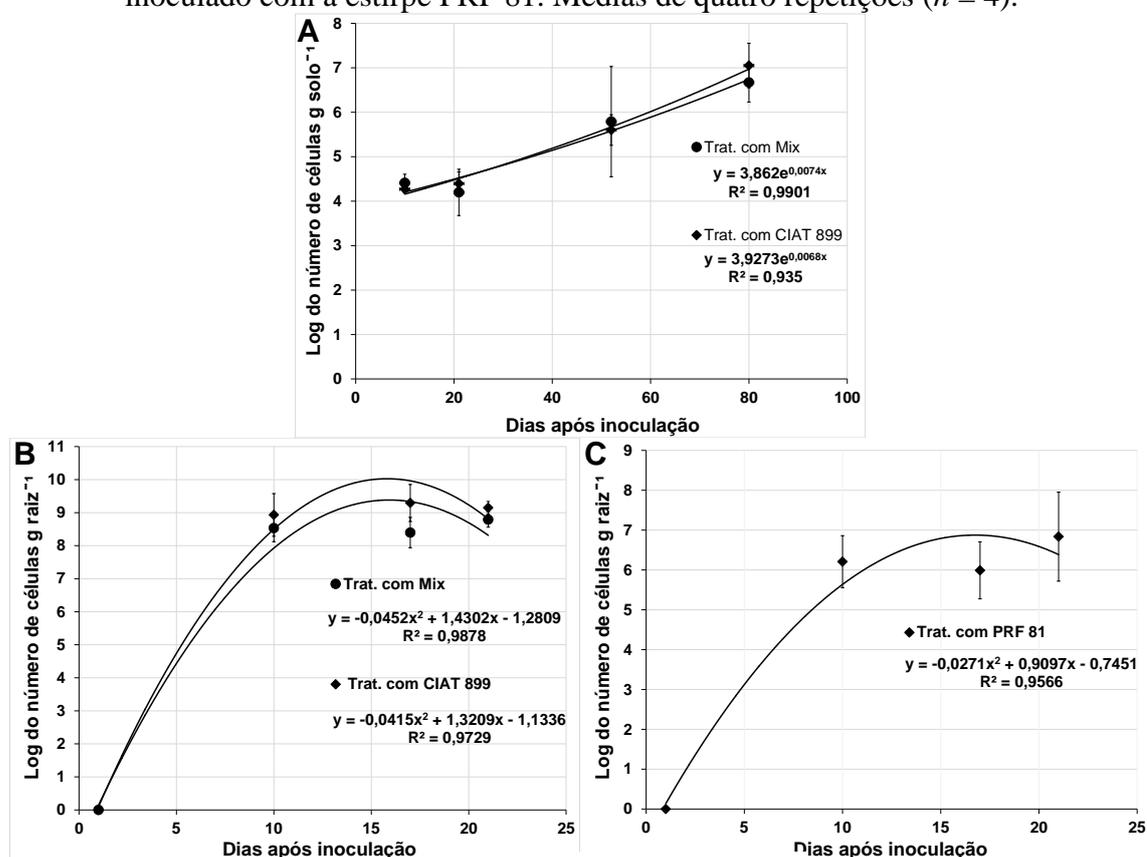


As barras em vermelho são médias de quatro repetições biológicas e três repetições técnicas. As barras em azul são médias de quatro repetições biológicas, três repetições técnicas e quantificação de dois *primers* para cada estirpe alvo.

Fonte: Do autor (2022).

A quantificação das populações bacterianas alvo do presente estudo mostra que elas têm um comportamento crescente até o final de ciclo da cultura, como pode ser observado para a estirpe CIAT 899 tanto no solo rizosférico bem como nas raízes do feijoeiro (FIGURA 8AB) e para a PRF 81 nas raízes (FIGURA 8C). O modelo matemático que se mostrou mais apropriado para representa o crescimento da estirpe CIAT 899 em solo rizosférico foi o exponencial, sendo observados coeficientes de determinação (R^2) iguais a 0,93 e 0,99, com ela inoculada individualmente ou em conjunto com a estirpe PRF 81, respectivamente (FIGURA 8A). Quanto à representação da população das bactérias CIAT 899 e PRF 81 ao longo do tempo nas raízes, o modelo matemático que mais se enquadrou foi o polinomial de segundo grau (FIGURA 8BC), sendo observados valores de R^2 acima de 0,95, tanto para a estirpe CIAT 899 inoculada individualmente com em conjunto com a estirpe PRF 81 (FIGURA 8B) e para a população da estirpe PRF 81 nas raízes de feijoeiro inoculado somente com a estirpe PRF 81 (FIGURA 8C).

Figura 8 — Comportamento populacional da estirpe CIAT 899 em experimento de campo, ao longo do tempo, avaliando: **A-** o solo rizosférico e **B-** as raízes de feijoeiro, dos tratamentos inoculados separadamente, com a estirpe CIAT 899 e Mix (CIAT 899 e PRF 81) e para a estirpe PRF 81 em: **C-** raízes de feijoeiro para o tratamento inoculado com a estirpe PRF 81. Médias de quatro repetições ($n = 4$).



Fonte: Do autor (2022)

4 DISCUSSÃO

Mesmo sabendo da promiscuidade da espécie *Phaseolus vulgaris* L. em ser nodulada por diversos rizóbios (MICHIELS, 1998; MOURA *et al.*, 2022; SHAMSELDIN; VELÁZQUEZ, 2020), da população de rizóbios nativos do solo altamente competitivos por sítios infectíveis nas raízes (THIES *et al.*, 1991; VARGAS *et al.*, 2000; VLASSAK *et al.*, 1996) e de fatores abióticos tais como o pH, a temperatura, a salinidade do solo (SOUMARE *et al.*, 2020) capazes de interferir no sucesso da nodulação por estirpes de rizóbios elite, em muitos estudos não são apresentadas informações sobre a ocupação nodular por parte das estirpes inoculadas (DE SOUZA *et al.*, 2016; FACCO *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2018). Além da persistência, ou seja, a capacidade do rizóbios inoculados em sobreviver no solo na ausência do seu hospedeiro até o próximo plantio (ARAÚJO, 1994). Sendo os estudos relacionados à interação simbiótica do feijoeiro e os rizóbios fixadores de N₂ focados na maioria das vezes em explanar os ganhos fitotécnicos que a leguminosa pode obter (CAPELESSO *et al.*, 2019; DE SOUSA *et al.*, 2020; FONSECA *et al.*, 2013; MERCANTE *et al.*, 2017; PELEGRIN *et al.*, 2009). Contudo, o presente estudo focou em detectar e quantificar as populações das bactérias CIAT 899 e PRF 81 utilizando *primers* estirpe-específicos na PCR convencional e qPCR. Dessa maneira, tornou-se possível inferir sobre os ganhos produtivos da planta em função da ocupação nodular com as estirpes CIAT 899 e PRF 81, bem como validar os *primers* desenhados para elas a partir de amostras ambientais.

Por meio dos *primers* estirpe-específicos da Tabela 1 foi possível monitorar e quantificar, respectivamente, a população da estirpe CIAT 899 a partir dos nódulos, raízes e solo rizosférico de todos os tratamentos dos quais ela foi inoculada. Em outros trabalhos o monitoramento da CIAT 899 nos nódulos de plantas de feijoeiro inoculadas também é evidenciado (ABOU-SHANAB *et al.*, 2019; HUNGRIA *et al.*, 2003; RAPOSEIRAS *et al.*, 2006) sendo ela detectada em até 100% dos nódulos avaliados (HUNGRIA; VARGAS, 2000; TAJINI *et al.*, 2008). Observou-se aqui também, que a estirpe CIAT 899 persiste no solo depois da colheita do feijoeiro (TABELA 5 e FIGURA 7AC). Supostamente podendo ter essa bactéria característica saprofítica (POOLE *et al.*, 2018), o que é desejável para que ela possa sobreviver no solo até o próximo ciclo de introdução do seu hospedeiro (ARAÚJO, 1994). Já foi relatado que uma única inoculação do feijoeiro com a estirpe CIAT 899 é suficiente para manter uma taxa de nodulação adequada durante três ciclos de crescimento (TAJINI *et al.*, 2008). Segundo Svenning *et al.* (2001) as estirpes de rizóbios da espécie *R. leguminosarum* by. trifoli designadas em seu trabalho como 8-9, 20-15 e 32-28 persistiram em grande número

no solo de campo após 1 ano, mesmo na ausência do seu hospedeiro específico, o trevo branco (*Trifolium repens* L.). A estirpe 20-15 persistiu e aumentou ao longo do período experimental de 4 anos (SVENNING *et al.*, 2001). No trabalho de Hungria *et al.* (2003), verificou-se que a reinoculação do feijoeiro com a estirpe CIAT 899 em campo aumentou sua população no solo ao longo do tempo. Essas evidências reforçam a capacidade de rizóbios elite persistirem no ambiente onde são introduzidos.

Com base nos resultados de qPCR, notou-se nesse trabalho que a população da estirpe CIAT 899 aumentou de forma exponencial no solo ao longo do cultivo de feijoeiro (FIGURA 8), chegando a ordem de 10^7 células g^{-1} de solo. Essa ordem de grandeza foi observada também para a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* estirpe USDA110 quantificada por qPCR a partir da amostra de DNA de solo (YUDISTIRA *et al.*, 2021). Como levantado por esses autores, é importante também saber se esse número de bactérias quantificadas por qPCR estarão aptas a infectar a planta hospedeira em cultivos posteriores. Isso reforçaria a capacidade saprofítica que essas bactérias podem adotar para permanecer no solo. No presente estudo a estirpe CIAT 899 chegou a ser quantificada na ordem de 10^6 células g^{-1} de solo 328 dias após sua inoculação a partir do solo coletado de parcelas inoculadas com ela (FIGURA 7C). Todavia, a dinâmica da população de CIAT 899 no solo parece ser influenciada pela população de rizóbios nativos, uma vez que num solo com maior carga desses rizóbios (10^5 UFC g^{-1}) a população da estirpe CIAT 899 tendeu a reduzir no solo ao longo das coletas em condições de casa de vegetação (Capítulo 3 dessa Tese). Entretanto, no trabalho do Capítulo 3 e nesse, verificou-se que a população das estirpes CIAT 899 e PRF 81 aumentaram nas raízes ao longo das coletas (FIGURA 8). E ao que parece, a população de rizóbios nativos do solo onde as plantas foram cultivadas, $1,12 \times 10^2$ e $9,04 \times 10^5$ UFC g^{-1} , não interferiu na infecção das estirpes elite inoculadas nesse e no trabalho do Capítulo 2 dessa Tese, respectivamente. Essa é uma evidência importante para as estirpes CIAT 899 e PRF 81, tendo em vista que dezenas de rizóbios nativos residentes no solo já são capazes de comprometer o sucesso da inoculação com rizóbios elite em leguminosas (THIES *et al.*, 1991). Como proposto por Ji *et al.* (2017) as estirpes elite CIAT 899 e PRF 81, ao que parece, são capazes de interagir com o feijoeiro desde seu estágio inicial de desenvolvimento, antes das nativas do solo entrarem em contato com a planta.

Nesse estudo, observou-se baixo desempenho da estirpe PRF 81 em nodular o feijoeiro, não só nas condições de campo como também em casa de vegetação (TABELAS 3 e 4). A ausência da estirpe PRF 81 nos nódulos de plantas inoculadas como ela, também foi observado para os nódulos avaliados a partir de experimento de campo e casa de vegetação no

trabalho que gerou o Capítulo 3 dessa Tese. Entretanto, no trabalho que originou o Capítulo 1, a estirpe PRF 81 foi detectada nos nódulos de plantas cultivadas em dois dos quatro solos diferentes avaliados. Sendo que, nas plantas que não nodularam a estirpe PRF 81 foi detectada por meio do DNA isolado das raízes utilizando *primers* estirpes-específicos na PCR convencional. Já no Capítulo 2, a estirpe PRF 81 foi quantificada nas raízes e detectada nos nódulos das plantas inoculadas com ela. Originalmente, no trabalho em que foi recomendada, a estirpe PRF 81 não foi detectada nos nódulos de plantas cultivadas em campo onde ela foi inoculada (HUNGRIA *et al.*, 2000). Isso ocorreu devido ao fato da técnica de sorologia utilizada não ter sido específica o suficiente para separar a estirpe PRF 81 de outras nativas que nodulavam o feijoeiro (HUNGRIA *et al.*, 2000). Porém, em condições de casa de vegetação a estirpe PRF 81 foi detectada em 55% dos nódulos avaliados de plantas inoculadas com ela e a estirpe CIAT 899 na proporção de 1:1 (HUNGRIA *et al.*, 2000). Além disso, a estirpe PRF 81 chegou a ser detectada em nódulos de feijoeiro cultivado em experimentos posteriores (HUNGRIA *et al.*, 2003; RAPOSEIRAS *et al.*, 2006). Inclusive, a estirpe PRF 81, dentre as estirpes CIAT 899, CPAC H12 e CPAC H20 até então pertencentes à espécie *R. tropici*, foi a que ocupou maior porcentagem de nódulos avaliados durante quatro ciclos produtivos (HUNGRIA *et al.*, 2003). Porém, Raposeiras *et al.* (2006) demonstraram que a ocupação nodular por parte da estirpe PRF 81 foi a mais baixa em relação às demais estirpes elite avaliadas. Essas controvérsias levantam questionamentos, se de fato, a estirpe PRF 81 realmente está contribuindo para a fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro em campo. Vale ressaltar, que as estirpes PRF 35 e PRF 54 geneticamente próximas a PRF 81 (*et al.*, 2007) foram desqualificadas como inoculante para feijoeiro em decorrência de suas instabilidades genéticas (HUNGRIA *et al.*, 2000). Já houve caso em que a estirpe SEMIA4064 (UMR1135) da espécie *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* originária de Minnesota, Estados Unidos, foi utilizada também como inoculante para cultura do feijoeiro no Brasil, porém, devido a problemas de instabilidade na eficiência nodular caiu em desuso (ARAÚJO, 1994).

Apesar desses contrapontos a respeito da estirpe PRF 81, o presente estudo, assim como no trabalho do Capítulo 4, mostra que houve um incremento em grãos por parte da inoculação com as estirpes PRF 81 e CIAT 899 isoladamente e em conjunto, tratamento Mix (TABELA 3). Sendo que no presente estudo, pelo teste de médias, adotando-se o nível de significância igual a 5%, a produtividade foi significativamente maior para tratamentos inoculados com as estirpes CIAT 899 e PRF 81 individualmente, e em conjunto, se comparado ao tratamento não inoculado sem dose de N-fertilizante. A população da estirpe

CIAT 899 quantificada a partir do solo rizosférico e das raízes de feijoeiro (FIGURA 8AB), bem como a alta taxa de ocupação nodular nos tratamentos em que ela foi inoculada (TABELA 3) reforçam a ideia de que houve a fixação de nitrogênio no feijoeiro em função da inoculação com ela. Isso conseqüentemente resultou numa maior produção de grãos, estatisticamente igual ao tratamento que recebeu dose equivalente a 40 kg ha⁻¹ de N-fertilizante e diferente do tratamento sem inoculação e dose de N-fertilizante. Entretanto, provavelmente, o incremento proporcionado por meio da inoculação com a estirpe PRF 81, estatisticamente igual ao da estirpe CIAT 899, seja em função de outra forma de promoção de crescimento vegetal que não a fixação de N₂. Tendo em vista que, a estirpe PRF 81 tem se mostrado presente nas raízes (FIGURA 8C), porém, ausente nos nódulos (TABELAS 3, 4 e 5). Essa hipótese tem suporte também no trabalho de Moreira *et al.* (2017) onde a inoculação com a estirpe PRF 81 em experimentos de campo favoreceu incrementos significativos em termos de produtividade, porém, a partir de plantas contendo um dos mais baixos teores de nitrogênio proveniente da FBN avaliados. E como é sabido, os rizóbios podem apresentar diversas maneiras de favorecer o crescimento vegetal em leguminosas, como por exemplo, a produção de sideróforos e fitohormônios e/ou a redução de fosfato (ELNAHAL *et al.*, 2022; NASEER *et al.*, 2019). No entanto, para mais de um experimento com feijoeiro inoculado com a estirpe PRF 81 em campo, já foi registrada baixa taxa de ocupação nodular sem efeitos positivos em termos de produtividade, massa seca de parte aérea e nitrogênio total fixado (RAPOSEIRAS *et al.*, 2006).

Como mostrado em outros trabalhos (KAWAKA; MUOMA, 2020; MWENDA *et al.*, 2018) bem como por este, o feijoeiro pode hospedar nos seus nódulos uma grande diversidade de rizóbios nativos (FIGURA 5). Ao que parece, toda essa diversidade foi estimulada a se multiplicar durante o cultivo de feijoeiro na área inicialmente com baixa população de rizóbios (TABELA 1). Isso pode ser notado comparando os dados obtidos para a variável número de nódulos (NN) dos três experimentos montados (TABELAS 3, 4 e 5), onde, para o último experimento, já não houve diferença para a variável NN de plantas cultivadas nos solos de parcelas de campo que haviam e não sido inoculadas. Essa observação é reforçada com base na população de rizóbios nativos detectados após o cultivo de feijão nas parcelas onde não havia sido inoculado (TABELA 5). O efeito de o feijoeiro aumentar a população de rizóbios nativos no solo é reportado também em outros trabalhos (VLASSAK *et al.*, 1996; VARGAS *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2015). Apesar de que, a quantificação do número de cópias do gene 16S rRNA foi estatisticamente igual para todos os tratamentos se comparado a primeira com a penúltima coleta (FIGURA 7).

5 CONCLUSÃO

Os *primers* estirpe-específicos utilizados no presente estudo foram eficazes e eficientes para detectar e quantificar na PCR e qPCR, respectivamente, as estirpes CIAT 899 e PRF 81 a partir de nódulos, raízes e solo rizóferico do feijoeiro cultivado em campo.

A estirpe CIAT 899 está presente na grande maioria dos nódulos, nas raízes e solo rizosférico do feijoeiro coletado nos tratamentos em que ela é inoculada durante e depois do cultivo, persistindo no sistema.

A população da estirpe PRF 81 é quantificável nas raízes mas pouco detectável no solo rizosférico e na maioria dos casos ausente nos nódulos do feijoeiro cultivado em campo e casa de vegetação.

A inoculação do feijoeiro com as estirpes elite CIAT 899 e PRF 81 separadamente, ou em conjunto, promoveu produtividade estatisticamente igual a aplicação da dose equivalente a 40 kg ha^{-1} com N-fertilizante e diferente do tratamento sem inoculação e o fornecimento de N-fertilizante.

REFERÊNCIAS

- ABOU-SHANAB, R. A. I. *et al.* Response of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to inoculation with indigenous and commercial *Rhizobium* strains under organic farming systems in Minnesota. **Symbiosis**, v. 78, n. 2, p. 125–134, 2 jun. 2019.
- AGUILAR, O. M. *et al.* Rapid identification of bean *Rhizobium* isolates by a *nifH* gene-PCR assay. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 13, p. 1655–1661, nov. 1998.
- AKIMOVA, E. S. *et al.* Genetic markers for search of rhizobia based on symbiotic genes. **Microbiology**, v. 86, n. 5, p. 640–646, 23 set. 2017.
- ANDRADE, D. DE S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. *In*: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. 1. ed. Brasília, DF, Brasil: EMBRAPA-CNPAF, 1994. p. 63–92.
- ARAÚJO, R. S. Fixação Biológica do Nitrogênio em Feijão. *In*: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismos de Importância Agrícola**. Goiânia, GO, Brasil: Embrapa Arroz e Feijão (CNPAF), 1994. p. 91–120.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes (RAS)**. 1. ed. Brasília, DF, Brasil: MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.
- BRITO, L. F. de *et al.* Resposta do Feijoeiro Comum à Inoculação com Rizóbio e Suplementação com Nitrogênio Mineral em Dois Biomas Brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, p. 981–992, ago. 2015.
- CAPELESSO, D.; COSTA, A. C. T. da; JÚNIOR, J. B. D. Nitrogen Fertilization and Inoculation of Seeds with *Rhizobium tropici* on the Agronomic Performance of Common Beans. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2019.
- CHUEIRE, L. M. O. *et al.* Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 5, p. 833–840, out. 2003.
- DE SOUSA, M. A. *et al.* Productivity and Economics of Inoculated Common Bean as Affected by Nitrogen Application at Different Phenological Phases. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 4, p. 1848–1858, 7 dez. 2020.
- DE SOUZA, E. M. *et al.* Inoculation of new rhizobial isolates improve nutrient uptake and growth of bean (*Phaseolus vulgaris*) and arugula (*Eruca sativa*). **Journal of the science of food and agriculture**, v. 96, n. 10, p. 3446–3453, 2016.
- DIOUF, A. *et al.* Competitiveness among *Rhizobia* for Nodulation of Introduced Leguminous Tree *Gliricidia sepium* in a Sub-Saharan Sandy Soil. **Journal of Advances in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 1–7, 2019.

- DOWLING, D. N.; BROUGHTON, W. J. Competition for Nodulation of Legumes. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 131–157, out. 1986.
- ELNAHAL, A. S. M. *et al.* **The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review.** [s.l.] Springer Netherlands, 2022. v. 162
- FACCO, C. U. *et al.* Evaluation of Rhizobia strains UFLA 02 100 and CIAT 899 in line LEP 02 11 of *Phaseolus vulgaris* L. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 4, p. 1051–1059, 12 jun. 2019.
- FERNANDES, R. C.; GUERRA, J. G. M.; ARAÚJO, A. P. Desempenho de cultivares de feijoeiro-comum em sistema orgânico de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 9, p. 797–806, set. 2015.
- FERREIRA, L. DE V. M. *et al.* Growth promotion of common bean and genetic diversity of bacteria from Amazon pastureland. **Scientia Agricola**, v. 75, n. 6, p. 461–469, dez. 2018.
- FIGUEIREDO, M. A. de *et al.* Adubações nitrogenada e molíbdica e inoculação com *Rhizobium* spp. No feijoeiro-comum em dois latossolos. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 38, n. 1, p. 85–92, 1 jan. 2016.
- FONSECA, G. G. *et al.* Resposta de cultivares de feijoeiro-comum à inoculação das sementes com duas estirpes de rizóbio. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 6, p. 1778–1787, 2013.
- FURSETH, B. J.; CONLEY, S. P.; ANÉ, J.-M. Enumeration of Soybean-Associated Rhizobia with Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2591–2596, nov. 2010.
- HILALI, A. *et al.* Competitiveness and persistence of strains of *Rhizobium phaseoli* introduced into a Moroccan sandy soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 7, n. 3, p. 213–218, 1989.
- HUNGRIA, M. *et al.* Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11–12, p. 1515–1528, out. 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 2, p. 88–93, 1 dez. 2003.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2–3, p. 151–164, mar. 2000.
- IRISARRI, P. *et al.* Selection of Competitive and Efficient Rhizobia Strains for White Clover. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. April, p. 1–11, 23 abr. 2019.

JESUS, E. DA C. *et al.* Co-inoculation of Bradyrhizobium stimulates the symbiosis efficiency of Rhizobium with common bean. **Plant and Soil**, v. 425, n. 1–2, p. 201–215, 6 abr. 2018.

JI, Z. J. *et al.* Competition between rhizobia under different environmental conditions affects the nodulation of a legume. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 114–119, mar. 2017.

KANEKO, F. H. *et al.* Mecanismos de abertura de sulcos, inoculação e adubação nitrogenada em feijoeiro em sistema plantio direto. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 125–133, 2010.

KAWAKA, F. *et al.* Genetic diversity of symbiotic bacteria nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris*) in western Kenya. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1–13, 2018.

KAWAKA, F.; MUOMA, J. Distribution and phenotypic characteristics of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulating bacteria in diverse soils. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science**, v. 70, n. 7, p. 564–571, 2020.

KORIR, H. *et al.* Co-inoculation Effect of Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Common Bean Growth in a Low Phosphorus Soil. **Frontiers in Plant Science**, v. 08, n. FEBRUARY, p. 1–10, 7 fev. 2017.

LARUE, T. A.; PATTERSON, T. G. How much nitrogen do legumes fix? **Advances in Agronomy**, v. 34, n. C, p. 15–38, 1981.

LEITE, R. de A. *et al.* Co-inoculation of Rhizobium and Bradyrhizobium promotes growth and yield of common beans. **Applied Soil Ecology**, v. 172, n. November 2021, p. 104356, abr. 2022.

MACDONALD, C. A. *et al.* Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of Rhizobium leguminosarum bacteria and discrimination between different biovars in zinc-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4626–4633, 2011.

MENDES, I. *et al.* Eficiência fixadora de estirpes de rizóbio em duas cultivares de feijoeiro. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 18, n. 3, p. 421–425, 1994.

MENDOZA-SUÁREZ, M. *et al.* Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the Rhizobium-Legume Symbioses. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. August, 19 ago. 2021.

MENDOZA-SUÁREZ, M. A. *et al.* Optimizing Rhizobium-legume symbioses by simultaneous measurement of rhizobial competitiveness and N₂ fixation in nodules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 18, p. 9822–9831, 2020.

MERCANTE, F. M.; OTSUBO, A. A.; BRITO, O. R. New Native Rhizobia Strains for Inoculation of Common Bean in the Brazilian Savanna. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, p. 1–11, 2017.

MICHIELS, J. *et al.* Phaseolus vulgaris is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, n. 3, p. 193–205, ago. 1998.

MICHIELS, J. Phaseolus vulgaris is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, n. 3, p. 193–205, ago. 1998.

MOREIRA, L. P.; OLIVEIRA, A. P. S.; FERREIRA, E. P. DE B. Nodulation, contribution of biological N₂ fixation, and productivity of the common bean (Phaseolus vulgaris L.) inoculated with rhizobia isolates. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 6, p. 644–651, 20 jun. 2017.

MOURA, F. T. *et al.* So many rhizobial partners, so little nitrogen fixed: The intriguing symbiotic promiscuity of common bean (Phaseolus vulgaris L.). **Symbiosis**, n. 0123456789, 2022.

MWENDA, G. M. *et al.* Genetic diversity and symbiotic effectiveness of Phaseolus vulgaris-nodulating rhizobia in Kenya. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 291–299, 2018.

NASEER, I. *et al.* **Rhizobial Inoculants for Sustainable Agriculture: Prospects and Applications.** [*s.l.*: *s.n.*].

OTSUBO, A. A.; BRITO, O. R.; MERCANTE, F. M. Productivity and nodulation of promising lineages of the Carioca bean group inoculated with Rhizobium tropici or supplemented with nitrogen fertilizer. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 2763–2776, 2013.

PELEGRIN, R. de *et al.* Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 219–226, fev. 2009.

PERES, J. R. R. *et al.* Efeito da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada em sete cultivares de feijão em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, n. March, p. 415–420, 1994.

PIHA, M. I.; MUNNS, D. N.; VIGNA, S. T. Sensitivity of the common bean (Phaseolus symbiosis to high soil temperature is generally weak; this may be due to the sensitivity of the symbiosis to. **Plant and soil**, v. 194, n. 2, p. 183–194, 1987.

PILLAI, S. D. *et al.* Specific detection of rhizobia in root nodules and soil using the polymerase chain reaction. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 9, p. 885–891, set. 1992.

PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MARTINS MERCANTE, F. Polyphasic characterization of Brazilian Rhizobium tropici strains effective in fixing N₂ with common bean (Phaseolus vulgaris L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1851–1864, 2007.

POOLE, P.; RAMACHANDRAN, V.; TERPOLILLI, J. Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 291–303, 2018.

PORTZ, A. *et al.* Recomendações de adubos, corretivos e de manejo da matéria orgânica para as principais culturas do Estado do Rio de Janeiro. *In: FREIRE, L. R. et al. (Eds.). Manual De Calagem E Adubação Do Estado Do Rio De Janeiro*. 1a. ed. Seropédica, RJ: Universidade Rural, 2013. v. 91p. 430.

RAPOSEIRAS, R. *et al.* Rhizobium strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 439–447, 2006.

RICHARDSON, A. E. *et al.* Differentiation of Rhizobium strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4–5, p. 515–524, 1995.

RITALAHTI, K. M. *et al.* Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple Dehalococcoides strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2765–2774, 2006.

SELENSKA-POBELL, S. How to monitor released rhizobia. **Plant and Soil**, v. 166, n. 2, p. 187–191, out. 1994.

SHAMSELDIN, A.; VELÁZQUEZ, E. The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** Springer Netherlands, 2020.

SILVA, C.G.N. **Uso da Técnica de PCR em Tempo Real para Quantificação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Tecidos de Cana-de-açúcar**. 2017. 98 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2017.

SOUMARE, A. *et al.* Exploiting Biological Nitrogen Fixation : A Route. **Plants**, p. 1–22, 2020.

SOUZA, E. de F. C. de; SORATTO, R. P.; PAGANI, F. A. Aplicação de nitrogênio e inoculação com rizóbio em feijoeiro cultivado após milho consorciado com braquiária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 370–377, abr. 2011.

SVENNING, M. M. *et al.* Competition for Nodule Occupancy Between Introduced Strains of *Rhizobium leguminosarum* Biovar trifolii and its Influence on Plant Production. **Annals of Botany**, v. 88, n. 4, p. 781–787, out. 2001.

TAJINI, F. *et al.* Response of common bean lines to inoculation: Comparison between the *Rhizobium tropici* CIAT899 and the native *Rhizobium etli* 12a3 and their persistence in Tunisian soils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 407–417, 17 mar. 2008.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. BEN. Influence of the Size of Indigenous Rhizobial Populations on Establishment and Symbiotic Performance of Introduced Rhizobia on Field-Grown Legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 19–28, jan. 1991.

TRABELSI, D. *et al.* Development of real-time PCR assay for detection and quantification of *Sinorhizobium meliloti* in soil and plant tissue. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 355–361, 2009.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two cerrados soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, n. 3, p. 228–233, 3 nov. 2000.

VÁSQUEZ-ARROYO, J. *et al.* Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v. 204, n. 1, p. 147–154, 1998.

VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 1–2, p. 61–68, 1996.

WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 35–43, 2010.

YAGI, R. *et al.* Nodulações e Produtividades de Grãos de Feijoeiros diante da Adubação Nitrogenada ou da Inoculação com *Rhizobium* Freirei. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1661–1670, dez. 2015.

YUDISTIRA, H. *et al.* qPCR assay targeting *Bradyrhizobium japonicum* shows that row spacing and soybean density affects *Bradyrhizobium* population. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 529–536, jul. 2021.

ZHANG, J. *et al.* *Rhizobia* at Extremes of Acidity, Alkalinity, Salinity, and Temperature. *In: Microbial Versatility in Varied Environments*. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 51–65.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até então, não havia na literatura, *primers* que pudessem ser utilizados em ensaios de PCR ou qPCR para o monitoramento rápido e específico das bactérias *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 ou CPAC H12 e *R. freirei* estirpe PRF 81. Entretanto, no presente estudo todos os *primers* desenhados para a estirpe CIAT 899 também são específicos para a estirpe CPAC H12. Como mostrado no Capítulo 2 **Subitem 2.5**, provavelmente a estirpe CPAC H12 é uma variante da CIAT 899, tendo em vista que as análises moleculares utilizando o DNA genômico e proteína dessas estirpes reforçaram a proximidade genética que existe entre elas. Porém, no trabalho que originou o Capítulo 3, a estirpe CIAT 899 se sobressaiu na ocupação nodular do feijoeiro em campo e casa de vegetação, se comparada à estirpe CPAC H12. Contudo, sugere-se que trabalhos futuros foquem em elucidar mais ainda a proximidade entre as estirpes CIAT 899 e CPAC H12, bem como comparar a aptidão de cada uma para nodular o feijoeiro. Pois, nos procedimentos para validação dos *primers* nesse trabalho, visando economizar, excluiu-se a estirpe CPAC H12 na maioria dos experimentos de campo e casa de vegetação.

Quanto à estirpe CIAT 899, observou-se por meio desse estudo utilizando *primers* estirpe-específicos que ela é altamente infectível nas raízes do feijoeiro, independente do solo avaliado (Capítulos 2, 3, 4 e 5). E que em todos os experimentos de campo onde ela foi inoculada (Capítulos 4 e 5) houve ganhos de produtividade em relação ao tratamento não inoculado e sem dose de N-fertilizante. Em todo o trabalho a estirpe CIAT 899 foi detectada em média, em 59% dos nódulos destacados aleatoriamente de plantas inoculadas com ela. Já a bactéria *R. freirei* estirpe PRF 81 também carece ter sua aptidão para nodular a planta de feijoeiro melhor avaliada em campo, tanto quanto à ocupação nodular, bem como aos possíveis efeitos de promoção vegetal que ela pode favorecer o feijoeiro. Uma vez que, como observado por esse trabalho, a partir dos *primers* estirpe-específicos, nota-se que ela é capaz de infectar as raízes do feijoeiro em determinados solos (Capítulo 2 e 4), porém, sem formar nódulos. Apesar disso, os tratamentos de campo inoculados com a estirpe PRF 81 apresentaram também, incrementos na produção de grãos (Capítulos 4 e 5). Uma possível forma de relacionar em trabalhos futuros os rendimentos do feijoeiro com a FBN provida pela estirpe PRF 81, CIAT 899 e/ou CPAC H12 seria avaliar a ocupação nodular por elas na planta, e dessa os teores N fixado.

Os experimentos com feijoeiro testando as estirpes alvo desse estudo serviram não só para a validação do *primers*, mas também como exemplo de sua aplicabilidade. No quesito

validação, os *primers* se mostraram altamente específicos, tendo em vista o número dos extratos de nódulos oriundos de plantas não inoculadas e cultivadas em condições de campo, não positivados em ensaios de PCR. Ou ainda, a quantidade de amostras de DNA isoladas de raízes e solo rizósferico do feijoeiro que não tiveram as estirpes alvo quantificadas na qPCR. Do ponto de vista de aplicabilidade, observou-se que é possível relacionar os ganhos de produção do feijoeiro inoculado em função da sua taxa de ocupação nodular, como por exemplo, através da grande presença e ausência nos nódulos das estirpes CIAT 899 e PRF 81, respectivamente (Capítulos 4 e 5). Além disso, verificou-se que as estirpes CIAT 899 e PRF 81 infectam as raízes do feijoeiro desde seu estágio inicial, em solo com quantidade de rizóbios nativos com até 10^5 UFC g^{-1} de solo (Capítulo 3).

Entretanto, há um potencial enorme de trabalhos que podem ser beneficiados se for utilizado como ferramenta os *primers* estirpe-específicos para as estirpes CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81 em ensaios de PCR ou qPCR. Tal como, a avaliação de ocupação nodular: (i) de plantas inoculadas com diferentes dosagens de inoculante; (ii) de plantas coinoculadas; (iii) de outras variedades de feijoeiro, até mesmo, em programas de melhoramento; (iv) de outras espécies de leguminosas, dentre outros. Ou ainda, a quantificação delas na qPCR para: (i) plotagem de curvas de crescimento microbiano testando novas fontes de carbono ou co-cultivo; (ii) novas formulações de inoculantes visando, por exemplo, o controle de qualidade; (iii) comparar suas populações em solo com diferentes graus de pH, salinidade, temperatura e populações de rizóbios nativos 3; (iv) verificar suas populações em associações com gramíneas, dentre outros. Certamente, o conjunto dessas informações fará com que o conhecimento a respeito da interação dos rizóbios elite CIAT 899, CPAC H12 e PRF 81 com o feijoeiro, seja cada vez mais elucidado.