

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EFICIÊNCIA  
SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE BACTÉRIAS  
QUE NODULAM FEIJÃO-CAUPI ISOLADAS DE  
SOLOS SOB CULTIVO AGRÍCOLA NA  
AMAZÔNIA OCIDENTAL**

**AMANDA AZARIAS GUIMARÃES**

**2009**

**AMANDA AZARIAS GUIMARÃES**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE  
ESTIRPES DE BACTÉRIAS QUE NODULAM FEIJÃO-CAUPI  
ISOLADAS DE SOLOS SOB CULTIVO AGRÍCOLA NA  
AMAZÔNIA OCIDENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profª. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

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

Guimarães, Amanda Azarias.

Diversidade genética e eficiência simbiótica de estirpes de bactérias que nodulam feijão-caupi isoladas de solos sob cultivo agrícola na Amazônia Ocidental / Amanda Azarias Guimarães. – Lavras : UFLA, 2009.

54 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Biodiversidade. 2. *Vigna unguiculata*. 3. Fixação biológica de nitrogênio. 4. BOX-PCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

**AMANDA AZARIAS GUIMARÃES**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE  
ESTIRPES BACTÉRIAS QUE NODULAM FEIJÃO-CAUPI  
ISOLADAS DE SOLOS SOB CULTIVO AGRÍCOLA NA  
AMAZÔNIA OCIDENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 15 de setembro de 2009.

Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais                      Esalq/USP

Profª. Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega      UFPI

Prof. Dr. Messias José Bastos de Andrade          UFLA

Profª. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

*A Deus, por me iluminar  
e permitir que eu  
concluísse mais uma  
etapa da minha vida.*

### **Ofereço**

*Aos meus pais, Vicente e  
Laurita, ao meu irmão Haroldo,  
símbolo de perseverança, e a  
minha avó Dalzira, pelo  
incentivo, carinho, amor  
incondicional e por estarem  
sempre presentes na minha  
vida.*

### **Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do curso.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Fátima Maria de Souza Moreira, pela oportunidade de iniciação em Microbiologia do Solo, pela orientação e por acreditar em meu trabalho.

À professora Rafaela Simão Abrahão Nóbrega, pela coorientação, participação e sugestões apresentadas.

Aos membros da banca examinadora, professor Márcio Rodrigues Lambais, professor Messias José Bastos de Andrade e Dr. Claudio Roberto Fonseca Sousa Soares, pela participação e sugestões apresentada.

A todos os professores, funcionários e amigos do Departamento de Ciência do Solo, pelo apoio, disponibilidade e a agradável convivência.

Ao projeto TSBF-CIAT/GEF-UNEP, *Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity*, pelo financiamento para a execução deste trabalho.

Aos funcionários Marlene e Manuel, pela contribuição, além do apoio, incentivo e amizade.

A Eula, funcionária do Laboratório de Biologia Molecular, pela paciência e contribuição.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo: Analuiza, Bruno, Cândido, Cleide, Fernanda, Gláucia, Jaqueline, Karina, Krisle, Leandro Marra, Leandro Mourão, Ligiane, Márcia, Maryeimy, Maurício, Michele Silva, Michele Rocha, Noely, Patrícia, Paulo, Pedro, Plínio, Priscila, Rogério, Silvia e Teotônio, pelo apoio e pela convivência.

A Jerusa, Jessé, Maíra, Paula e Wesley pelo apoio, amizade, paciência e compreensão.

A Karina, amiga/irmã, pela convivência, paciência, companheirismo e amizade de tantos anos.

A Tatiana, pela recepção em Lavras e pela amizade.

A todos meus amigos que, estando longe ou perto, sempre torceram por mim.

A toda minha família e a minha cunhada Vanessa, pelo carinho e incentivo.

**A todos, Muito Obrigada!!!**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 Floresta Amazônica como hábitat para bactérias fixadoras de nitrogênio.....	4
2.2 A fixação biológica do nitrogênio na cultura do feijão-caupi.....	8
2.3 Técnicas para avaliar a diversidade de bactérias que nodulam leguminosa (BNL).....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	12
3.1 Origem das estirpes.....	12
3.2 Caracterização cultural .....	16
3.3 Autenticação por meio da inoculação no hospedeiro de origem e eficiência simbiótica.....	16
3.4 Diversidade genética.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Características culturais .....	22
4.2 Autenticação por meio da inoculação no hospedeiro de origem e eficiência simbiótica.....	27
4.2.1 Autenticação por meio da inoculação no hospedeiro de origem .....	27
4.2.2 Eficiência simbiótica.....	29
4.4 Eficiência relativa x grupos culturais.....	34
5 CONCLUSÕES .....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
ANEXO .....	50

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Principais características culturais de 62 isolados de bactérias que estabelecem simbiose com o feijão-caupi, isoladas de amostras de solo sob cultivo agrícola na Amazônia.....	24
TABELA 2	Autenticação de 119 estirpes de bactérias quanto à nodulação de feijão-caupi, isoladas de amostras de solo sob cultivo agrícola na Amazônia.....	28
TABELA 3	Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (ER%) de 62 isolados, três controles positivos (INPA 03-11B, UFLA 03-84 e BR 3267) e dois controles negativos sem inoculação (com e sem N).....	30

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Local da realização das áreas de coleta (cidade de Benjamin Constant e comunidades indígenas, Nova Aliança e Guanabara II, no município de Benjamin Constant).....	13
FIGURA 2	Distribuição dos pontos amostrais no mapa de uso e cobertura da terra.....	13
FIGURA 3	Áreas de agricultura, com cultivos de a) mandioca, b) mandioca e banana, c) cana-de-açúcar, d) mandioca e banana e e) arroz.....	15
FIGURA 4	Visão geral do experimento de autenticação e eficiência simbiótica em casa de vegetação.....	17
FIGURA 5	Distribuição dos 119 isolados de solo sob cultivo agrícola em grupos culturais baseados no tempo de crescimento das colônias e na alteração do pH do meio: crescimento rápido e pH ácido (RA); crescimento rápido e pH neutro (RN); crescimento rápido e pH alcalino (RAL); crescimento intermediário e pH ácido (IA); crescimento intermediário e pH neutro (IN); crescimento intermediário e pH alcalino (IAL); crescimento intermediário e pH ácido ou neutro (IAN); crescimento lento e pH ácido (LA); crescimento lento e pH neutro (LN); crescimento lento e pH alcalino (LAL); crescimento lento e pH ácido ou neutro (LAN); crescimento muito lento e pH neutro (MLN).....	26
FIGURA 6	Distribuição de isolados por grupos de Eficiência Relativa (ER%).....	34
FIGURA 7	Distribuição dos isolados dos grupos culturais, crescimento rápido e pH ácido (RA); crescimento rápido e pH neutro (RN); crescimento rápido e pH alcalino (RAL); crescimento intermediário e pH neutro (IN); crescimento intermediário e pH alcalino (IAL), crescimento lento e pH ácido (LA), crescimento lento e pH neutro (LN) e crescimento lento e pH alcalino (LAL), em classes de eficiência relativa.....	36

FIGURA 8 Dendrograma de similaridade genética das estirpes de bactérias que nodulam feijão-caupi, isoladas de solo sob cultivo agrícola na Amazônia Ocidental e das estirpe tipo..... 38

## RESUMO

GUIMARÃES, Amanda Azarias. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de estirpes de bactérias que nodulam feijão-caupi isoladas de solos sob cultivo agrícola na Amazônia Ocidental.** 2009. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras<sup>1</sup>.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade genética e eficiência simbiótica de bactérias que nodulam feijão-caupi, isoladas de solos sob cultivo agrícola na Amazônia Ocidental. Os isolados do presente trabalho foram obtidos em trabalho anterior, a partir de uma coleção de 1010 isolados oriundos diferentes sistemas de uso, que incluem 158 de cultivos agrícolas. Primeiramente, esses isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio 79, para confirmar suas características culturais anteriormente descritas. Dos 158 isolados, obtiveram-se 119 em cultura pura. Experimentos de autenticação e eficiência simbiótica destes isolados foram realizados em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado e três repetições. Utilizaram-se garrafas recicladas do tipo *long neck* (500 mL), contendo solução de Hoagland diluída quatro vezes e, como planta hospedeira, feijão-caupi, cultivar BR17 Gurguéia. Os controles utilizados foram os tratamentos sem inoculação (com e sem nitrogênio mineral) e com inoculação das estirpes utilizadas em inoculantes comerciais INPA 03-11B, UFLA 03-84, BR 3267. A autenticação foi avaliada pela presença (+) ou ausência (-) de nódulos nas plantas inoculadas. A eficiência simbiótica foi avaliada, aos 35 dias após a emergência, quando determinou-se o número de nódulos, matéria seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e eficiência relativa. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias por meio do teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade. Os 62 isolados com nodulação positiva foram submetidos à análise de polimorfismo no DNA, com o objetivo de avaliar a sua diversidade, utilizando-se da técnica BOX-PCR. Foram incluídas nesta análise estirpes tipo e referência de: *Azorhizobium dobereinae* (BR 5401), *Azorhizobium caulinodans* (ORS 571<sup>T</sup>), *Cupriavidus taiwanensis* (LMG19424<sup>T</sup>), *Burkholderia sabiae* (BR3405), *Mesorhizobium plurifarium* (BR3804), *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) e *Bradyrhizobium ellkanii* (INPA 03-11B). Por meio da caracterização cultural foi possível realizar o agrupamento dos isolados; combinando-se as características culturais tempo de crescimento e

---

Comitê Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira - UFLA (Orientador),  
Rafaela Simão Abrahão Nóbrega - UFPI

alteração do pH do meio foram obtidos doze grupos diferentes. Os isolados apresentaram eficiência simbiótica variável, tendo 68% dos isolados promovido aumento estatisticamente significativo da matéria seca da parte aérea em relação ao controle sem inoculação e sem nitrogênio mineral. Encontrou-se alta diversidade genética, a 80% de similaridade. Os isolados têm similaridade menor que 65% em relação às estirpes tipo. Os resultados mostraram alta diversidade simbiótica, genética e fenotípica, em áreas de cultivo agrícola, com espécies de bactérias que nodulam feijão-caupi potencialmente novas.

## ABSTRACT

GUIMARAES, Amanda Azarias. **Genetic diversity and symbiotic efficiency of nitrogen-fixing cowpea nodulating bacteria isolated from soils under agricultural cultivation in the Western Amazon.** 2009. 54 p. Dissertation (Masters in Soil Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The objective of this study was to evaluate the genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing cowpea nodulating bacteria from agricultural soils under cultivation in the Western Amazon. These isolates were obtained in a previous work from a collection of 1010 strains, comprising different land used systems origin. First of all, they were transferred to Petri dishes containing medium 79, to check their cultural characteristics previously described. One hundred nineteen out of 158 isolates from agriculture were obtained in pure culture. Authentication and symbiotic efficiency experiments of those isolates were made in a greenhouse, with a completely randomized design and three repetitions. We used recycled "long neck" bottles (500mL) containing Hoagland solution diluted four times and cowpea as a host plant (cultivar BR17 Gurguéia). Two control treatments without inoculation (with and without mineral nitrogen) and another three positive controls with strains commercial inoculant strains INPA 03-11B, UFLA 03-84, BR 3267 were used. The authentication was evaluated through nodules presence (+) or absence (-) in inoculated plants. The symbiotic efficiency was evaluated 35 days after emergence when the nodules number, nodules dry weight, shoot dry matter weight and relative efficiency were determined. The data were subjected to analysis of variance and mean comparison by the Scott Knott test in a probability of 5%. The 62 isolates with positive nodulation were submitted to analysis of DNA polymorphism in order to assess their diversity, using the BOX-PCR technique. The following type or reference strains were included in this analysis: *Azorhizobium dobereineriae* (BR 5401), *Azorhizobium caulinodans* (ORS 571<sup>T</sup>), *Cupriavidus taiwanensis* (LMG19424<sup>T</sup>), *Burkholderia sabiae* (BR3405), *Mesorhizobium plurifarium* (BR3804), *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84), *Bradyrhizobium ellkanii* (INPA 03-11B). Through the cultural characterization it was possible to cluster the isolates, combining the cultural characteristic; time of growth and pH changing it was obtained twelve different groups. The isolates showed variable symbiotic

---

Guidance Committee: Fatima Maria de Souza Moreira - UFLA (Major Professor), Rafaela Simão Abrahão Nóbrega - UFPI

efficiency, 68% of isolates promoted statistically significant increasing in shoot dry matter weights regarding in the control without inoculation and without mineral nitrogen. It was found high genetic diversity with 80% of similarity. The isolates had similarity less than 65% to type strains. The results showed high symbiotic, genetic and phenotypic diversity, in agriculture areas, with potentially new species of bacteria.

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse pela biodiversidade da Amazônia tem crescido nos últimos anos, o que tem propiciado a identificação de novas espécies, principalmente de microrganismos. Os avanços na biologia molecular também têm contribuído significativamente para isso (Moreira & Siqueira, 2006).

Estudos de diversidade são de extrema importância para a seleção de estirpes com potencial de uso na produção de inoculantes para leguminosas de interesse agrônomo (Pereira, 2000; Lacerda et al., 2004, Soares et al., 2006).

Há, na literatura, muitos estudos sobre a diversidade da flora e da fauna na Amazônia, porém, a diversidade abaixo da superfície do solo ainda é pouco conhecida. As poucas pesquisas existentes nos ecossistemas amazônicos, considerando a grande extensão territorial, relatam a ocorrência, a densidade e a diversidade de microrganismos benéficos que se associam às plantas (Silva, 2006) e que também estabelecem simbiose, como é o caso de bactérias fixadoras de nitrogênio (Pereira, 2000; Jesus et al., 2005; Lima et al., 2005, 2009; Moreira et al., 2006; Nóbrega, 2006; Barberi, 2007).

A caracterização cultural de bactérias tem importância significativa nos estudos de diversidade, por ser uma técnica de baixo custo, fácil e rápida. Em estudos de diversidade realizados por Jesus et al. (2005) e Nóbrega (2006) foi demonstrado que o uso do método de caracterização cultural é indicado para agrupamento inicial, principalmente quando se trabalha com um número muito grande de isolados. Representantes desses grupos podem ser caracterizados com técnicas mais discriminativas, genética e fenotipicamente.

Técnicas moleculares são mais apropriadas em estudos de identificação e classificação de microrganismos, destacando-se o rep-PCR (REP, ERIC, BOX). Esta técnica possibilita a diferenciação entre espécies, subespécies e

estirpes de bactérias (Rademaker et al., 1997) e é bastante discriminatória na diversidade intraespecífica.

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] tem grande importância econômica no norte e no nordeste do Brasil, sendo muito cultivada por pequenos produtores. É uma cultura considerada rústica, por tolerar condições de estresse hídrico, altas temperaturas, baixo pH, altos teores de Al e solos com baixa fertilidade, e promíscua, por estabelecer simbiose com diferentes gêneros de bactérias (Lewin et al., 1987; Melloni et al., 2006; Moreira et al., 2008) o que deixa evidente a necessidade de novos estudos de seleção de estirpes, as quais devem ser tolerantes às condições edafoclimáticas adversas das regiões de maior produção e competitivas, além de apresentar potencial como inoculantes.

Este trabalho faz parte do projeto "Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity", coordenado pelo Tropical Soil Biology and Fertility Institute (TSBF) do CIAT, financiado pelo Global Environment Facility (GEF), implementado pelo United Nations Environment Programme (UNEP) e executado em sete países: Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Quênia, México e Uganda. No Brasil, é denominado BIOSBRASIL, coordenado pela Universidade Federal de Lavras e que tem o objetivo de promover a conscientização, o conhecimento e a compreensão da biodiversidade do solo, visando à produção agrícola sustentável em paisagens tropicais (Projeto GF/2715-02).

Nóbrega (2006), utilizando feijão-caupi como planta isca, obteve 1.010 isolados de bactérias em solos sob diferentes sistemas de uso da terra (SUT): agrofloresta (A), pastagem (P), floresta primária (FP), agricultura (AG), floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FA) e floresta primária em estágio inicial de regeneração (FI), na Amazônia Ocidental. A autora realizou a caracterização cultural de todos os isolados, observando entre eles alta diversidade fenotípica, mostrando a importância de se estudar com mais detalhes

os isolados de cada SUT. Até o momento, foram submetidos a análises mais aprofundadas os isolados do SUT FP (Nóbrega, 2006), P e FA (Neves, 2007).

Nesse contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade genética e a eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] isoladas de solos sob cultivo agrícola na Amazônia Ocidental, empregando a caracterização cultural e a técnica molecular BOX-PCR.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Floresta Amazônica como hábitat para bactérias fixadoras de nitrogênio

A Floresta Amazônica brasileira abrange os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, o que corresponde a 60% do território nacional, com 5.000.000 km<sup>2</sup>, aproximadamente (Rodrigues, 1996; Fearnside, 2002 citado por Mendonça-Santos et al., 2008).

Muitos estudos sobre a diversidade da fauna e flora da Amazônia são encontrados na literatura, porém, pouco se sabe sobre a microbiota do solo. Os trabalhos que vêm sendo realizados têm demonstrado alta diversidade de procariotos nos solos da região amazônica (Moreira, 1991; Borneman & Triplett, 1997; Pereira, 2000; Jesus et al., 2005, 2009; Lima et al., 2005, 2009; Nóbrega, 2006).

Moreira (1991) caracterizou 700 isolados de três locais diferentes do Brasil, incluindo a Amazônia. Entre estes, foram selecionados, para estudos comparativos de proteínas totais, 171 isolados, representantes dos grupos culturais. A análise dos perfis de proteínas por SDS-PAGE mostrou alta diversidade fenotípica entre os isolados (Moreira et al., 1993). Com isso, posteriormente, foi realizado, por Moreira et al. (1998), o sequenciamento do gene rDNA 16S de 44 isolados, representantes dos grupos proteicos. Como resultados, estes autores obtiveram 15 sequências diferentes, com possibilidade de 6 novas espécies. A partir deste trabalho, foram descritas espécies como *Mesorhizobium plurifarum* (Lajudie et al., 1998) e *Azorhizobium dobereiner* (Moreira et al., 2006).

Borneman & Triplett (1997), avaliando a diversidade microbiana de solos da Amazônia em áreas de pastagem e floresta, observaram sequências de

bases de DNA não conhecidas de procariotos não cultiváveis e que não podem ser classificadas em nenhum filo de Bacteria, principalmente em área de floresta. Comprovou-se, portanto, a grande diversidade de microrganismos na floresta Amazônica e que ainda são desconhecidos, por não serem cultiváveis em meios de culturas usados atualmente.

Jesus et al. (2005) verificaram alta diversidade fenotípica em solos sob três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental (cultivo de mandioca, cultivo de pupunheira e floresta de terra firme). Estes autores obtiveram 257 isolados, os quais formaram 63 grupos culturais com 80% de similaridade.

Em estudos realizados por Lima et al. (2005), verificou-se elevada diversidade fenotípica (SDS-PAGE de proteína total) entre 46 estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de diferentes sistemas de uso da terra (monocultura, capoeira, pastagem, floresta e sistema agroflorestal) na Amazônia (Acre e Rondônia), utilizando siratro como planta isca. Essas estirpes também apresentaram alta diversidade de eficiência simbiótica em feijão-caupi.

Lima et al. (2009) avaliaram o efeito de diferentes SUT (A, P, FP, AG, FA e FI), na Amazônia Ocidental, sobre a ocorrência, a densidade, a diversidade e a eficiência de bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de nodular raízes de siratro (*Macropodium atropurpureum*). Os autores verificaram a presença de bactérias capazes de nodular siratro em solos de todos os SUT, tendo o sistema A apresentado maior densidade e diversidade. Em relação à eficiência simbiótica, os isolados apresentaram baixa, média e alta eficiência na fixação de nitrogênio, independente do SUT.

Nóbrega (2006), estudando a ocorrência e a diversidade fenotípica de bactérias que nodulam feijão-caupi nos diferentes SUT (A, P, FP, AG, FA e FI), obteve 1.010 isolados de bactérias. Esses isolados foram agrupados de acordo com suas características culturais, obtendo-se 130 grupos culturais. Posteriormente, a autora realizou um experimento de autenticação por meio da

inoculação no hospedeiro original, incluindo todos os isolados de FP e representantes dos grupos culturais de cada SUT, totalizando 197 isolados. Dentre estes, 125 nodularam e 72 não nodularam feijão-caupi. Dos isolados autenticados, realizou-se a análise dos perfis de proteínas por SDS-PAGE de 114. A 87,5% de similaridade, os 114 isolados autenticados e as estirpes tipo formaram 116 grupos proteicos. Portanto, por meio da caracterização cultural e pela análise de proteínas totais (SDS-PAGE), a autora verificou alta diversidade fenotípica dos isolados. Além disso, observou que o SUT afeta a diversidade de bactérias.

Em continuidade ao trabalho de Nóbrega (2006), foram avaliadas a eficiência e a diversidade de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio capazes de nodular o feijão-caupi, isoladas de solos sob floresta secundária e pastagem na Amazônia Ocidental (Neves, 2007). A autora verificou eficiência simbiótica variável e diversidade fenotípica elevada com base nos perfis de proteínas totais, nos dois SUT. Foi realizado também o sequenciamento parcial do gene rDNA 16S de 66 isolados destes SUT, observando-se a existência de gêneros de bactérias nodulíferas e não-nodulíferas.

Barberi (2007) verificou baixa ocorrência e eficiência simbiótica de bactérias que nodulam feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) na mesma área amostral dos trabalhos desenvolvidos por Nóbrega (2006); Neves (2007) e Lima et al. (2009). Entre os SUT avaliados, a FP apresentou menor porcentagem de isolados com capacidade nodulífera, corroborando os resultados encontrados por outros autores (Magalhães et al., 1982; Bonetti et al., 1984; Pereira, 2000; Jesus et al., 2005; Nóbrega, 2006; Lima et al., 2009).

A floresta primária é considerada um sistema em equilíbrio, onde há disponibilidade de nutrientes para plantas em níveis adequados, inclusive nitrogênio. Silva & Dobereiner (1982) sugerem que a fixação biológica de nitrogênio é um processo de adaptação para situações em que o nitrogênio é

considerado fator limitante, sendo a nodulação maior em áreas de cultivo do que áreas em equilíbrio.

Jesus et al. (2009), analisando a comunidade bacteriana do solo pela técnica de T-RFLP , clonagem e sequenciamento do gene rDNA 16S em seis SUTs diferentes, verificaram alta diversidade das comunidade. Em solos sob o SUT pastagem, observaram-se comunidades com maior diversidade. O autor observou que a diversidade das comunidades estava relacionada com fatores edáficos, corroborando resultados encontrados por Pereira (2000), o qual, avaliando o efeito do sistema de manejo na diversidade de rizóbios no solo, também observou maior diversidade cultural em áreas de pastagem.

Estudos recentes têm demonstrado grande diversidade e densidade de bactérias que nodulam leguminosas na região amazônica, o que justifica estudos mais detalhados desses microrganismos.

## 2.2 A fixação biológica do nitrogênio na cultura do feijão-caupi

O feijão-caupi, também conhecido como feijão-de-corda, feijão-miúdo, ou feijão-macassar, é uma leguminosa de origem tropical bem adaptada às condições edafoclimáticas do semi-árido brasileiro, sendo resistente às condições de estresse hídrico, altas temperaturas, baixo pH, altos teores de Al e solos com baixa fertilidade. É muito cultivado nas regiões norte e nordeste do país, por pequenos produtores, como cultura de subsistência (Freire Filho, 2005).

Apesar de apresentar significativa importância sócio-econômica para aquelas regiões, o rendimento médio de grãos do feijão-caupi é relativamente baixo (300 a 400 kg ha<sup>-1</sup>), devido à disponibilidade insuficiente de nutrientes minerais nos solos cultivados, especialmente do N (Frota & Pereira, 2000). Diante disso, tem-se a fixação biológica de nitrogênio (FBN) como a melhor alternativa para o fornecimento de N à cultura, a qual é uma tecnologia eficiente e de baixo custo, que permite maior sustentabilidade ao sistema agrícola.

O processo de FBN é reconhecidamente eficiente em feijão-caupi, de forma que o uso de inoculantes com estirpes eficientes pode dispensar a utilização de outras fontes de N e proporcionar altos níveis de produtividade (Lacerda et al., 2004; Soares et al., 2006). A cultura nodula bem com diferentes gêneros de bactérias que nodulam leguminosas (BNL), tais como *Bradyrhizobium* spp., *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Burkholderia* spp., *Azorhizobium* spp. e *Mesorhizobium* spp. (Rumjanek, et al., 2005; Zilli et al., 2006; Moreira et al., 2008), sendo considerada uma planta promíscua (Lewin et al., 1987; Melloni et al., 2006; Nóbrega, 2006).

Essa característica faz com que a cultura seja indicada para estudos de diversidade e eficiência simbiótica. Melloni et al. (2006) verificaram que o feijão-caupi capturou maior número de isolados do que feijão comum, 420 e 328 isolados, respectivamente, em área de mineração de bauxita.

Gualter et al. (2008) não verificaram diferença significativa entre os tratamentos com e sem inoculação em relação ao número e à massa seca de nódulos, na avaliação aos 35 dias após a emergência. Estes autores relataram que este fato resultou da presença de rizóbios nativos na área de experimentação, corroborando os resultados de Xavier et al. (2006), os quais avaliaram a nodulação de *Bradyrhizobium* spp. em feijão-caupi em comparação ao rizóbio nativo, comprovando a falta de especificidade da cultura.

Atualmente, existem, no mercado, três estirpes recomendadas, pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE), como inoculantes para feijão-caupi: UFLA 03-84 (SEMIA 6461, BR3302) (*Bradyrhizobium* sp.), INPA 03-11B (SEMIA 6462, BR 3301) (*Bradyrhizobium elkani*) (Lacerda et al., 2004; Soares et al., 2006) e BR 3267 (SEMIA 6463) (*Bradyrhizobium japonicum*) (Martins et al., 2003). A vantagem dessas estirpes, e das recomendadas para a soja, em relação às recomendadas para feijão (*Phaseolus vulgaris*), é o fato de que os genes *nod* e *nif* estão presentes no cromossomo e não nos plasmídeos, tornando as características de nodulação e fixação biológica de nitrogênio mais estáveis. A estirpe INPA 03-11B mantém a sua eficiência desde 1980, quando foi isolada, assim como as estirpes recomendadas para soja BR 29 e SEMIA 587, as quais são utilizadas desde 1979 (Moreira et al., 2008).

### **2.3 Técnicas para avaliar a diversidade de bactérias que nodulam leguminosa (BNL)**

Atualmente, apenas 12 gêneros foram descritos: *Rhizobium* (Frank, 1889), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Allorhizobium* (Lajudie et al., 1998), *Burkholderia* (Moulin et al., 2001), *Methylobacterium* (Sy et al., 2001), *Devosia* (Rivas et al., 2002), *Ralstonia*

(Chen et al., 2001), *Ochrobactrum* (Trujillo et al., 2005), *Blastobacter* (*Bradyrhizobium*) (Berkun & Eardly, 2002) e *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2005).

Técnicas como a caracterização cultural permitem avaliar a diversidade fenotípica dos microrganismos. A avaliação da diversidade em meios de cultura é muito utilizada por ser de fácil execução e de baixo custo. Profissionais experientes são capazes de identificar, com certa precisão, o gênero de uma bactéria, ao avaliarem suas características culturais. Porém, estima-se que apenas 1% dos microrganismos seja cultivável em meio de cultura (Moreira & Siqueira, 2006), o que torna limitante esta técnica. Este não é um problema enfrentado por BNL até o momento, e todas apresentam crescimento em meio de cultura (Moreira et al., 2008), facilitando o estudo de diversidade desses microrganismos.

A diversidade genética pode ser determinada por técnicas como: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo pelo tamanho dos fragmentos de restrição); tRNA - PCR ou ITS (amplificação e análise de regiões espaçadoras inter-tRNA ou inter-regiões dos genes rRNA 16S-23S); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados); hibridização DNA-DNA, diversidade e filogenia dos genes *nodC* e *nifH*; RAPD (polimorfismo de fragmentos de DNA amplificados ao acaso) e AP-PCR (PCR arbitrariamente iniciado); rep-PCR (elementos repetitivos de DNA genômico) (Harrison et al., 1992; Moreira et al., 1993; Odee et al., 1997; Radermaker et al., 1997; Vinuesa et al., 1998; Parker & Lunk, 2000; Laguerre et al., 2001; Lima et al., 2005).

Entre as técnicas citadas acima, o rep-PCR tem apresentado grande potencial no estudo de diversidade de microrganismos, inclusive na caracterização de estirpes de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>. De acordo com Louws et al. (1999), os marcadores rep-PCR são baseados em sequências repetitivas

conservadas e dispersas no genoma bacteriano. Essa técnica é chamada geralmente de *fingerprinting* (impressão digital), que significa que o padrão formado, de uma determinada estirpe, é único e específico, permitindo sua discriminação dos demais que compõem comunidades e agrupá-las em grupos de similaridade (Moreira et al., 2008).

Estudos sobre a diversidade de BNL podem trazer benefícios para o sistema agrícola, pois, por meio destes, podem ser descobertas novas espécies com potencial para inoculante para culturas de interesse agrônômico (Moreira et al., 1993; Pereira, 2000; Lacerda et al., 2004; Soares et al., 2006) como o feijão-caupi.

Resultados de trabalhos têm demonstrado grande diversidade de bactérias que nodulam leguminosas (BNL) em diferentes sistemas de uso na Amazônia (Moreira et al., 1993; Jesus et al., 2005; Nóbrega, 2006; Barberi, 2007; Lima et al., 2009). Estes mesmos autores observaram que áreas de cultivo agrícola apresentam maior ocorrência e diversidade de isolados que nodulam as espécies vegetais siratro, feijão e feijão-caupi, mostrando a possibilidade de haver novas espécies na área em estudo.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Origem das estirpes**

A área de estudo do projeto BiosBrasil está localizada entre as coordenadas geográficas 4°21' e 4°26' Sul e 69°36' e 70°1' Oeste, no estado do Amazonas, município de Benjamin Constant, onde são encontradas comunidades indígenas como as de Nova Aliança e Guanabara II, situadas a aproximadamente 1.100 km a oeste de Manaus, no Alto Solimões (Figura 1) (Fidalgo et al., 2005).

As áreas foram divididas em 6 janelas, sendo 1 e 2 em Guanabara II; 3, 4 e 5 em Nova Aliança e 6 na cidade de Benjamin Constant. A caracterização dos sistemas de uso da terra (SUTs) nos pontos amostrais foi realizada por Fidalgo et al. (2005), quanto à cobertura vegetal e ao uso atual, classificando-os como: floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI); floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FA); floresta primária (FP); agricultura (AG); agrofloresta (A) e pastagem (P) (Figuras 1 e 2).

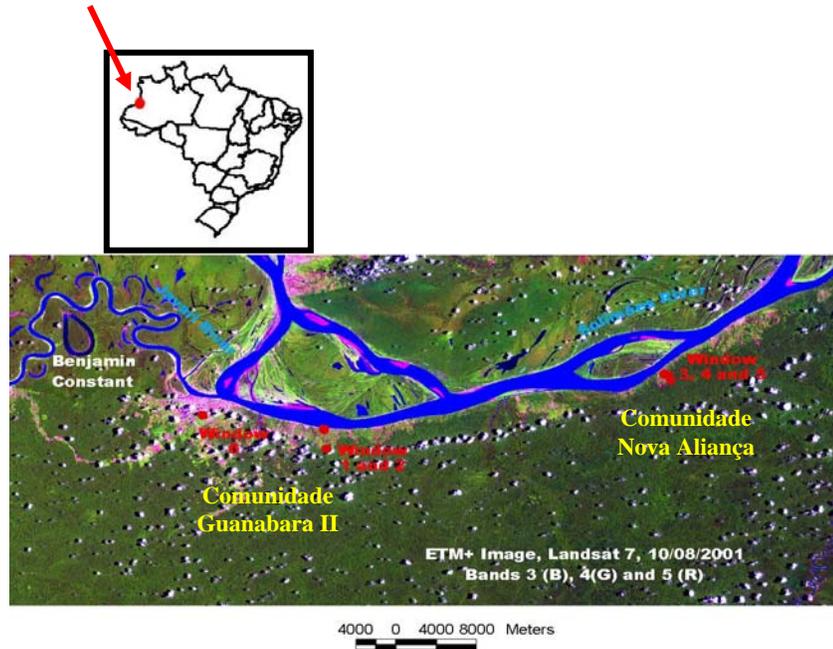


FIGURA 1 Local da realização das áreas de coleta (cidade de Benjamin Constant e comunidades indígenas, Nova Aliança e Guanabara II, no município de Benjamin Constant).

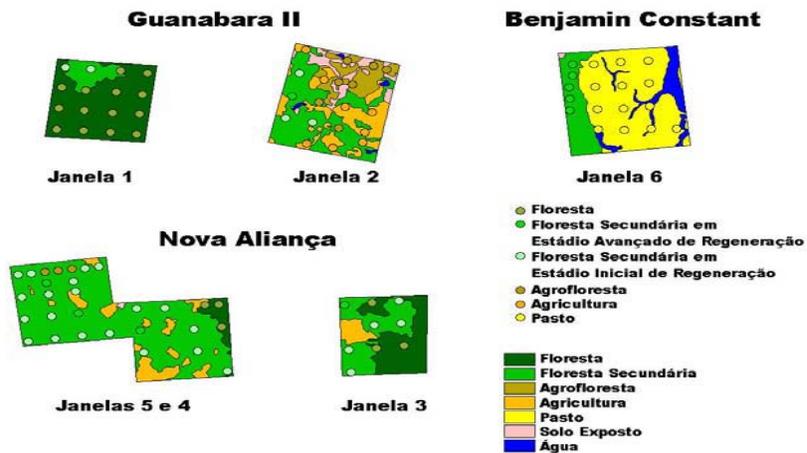


FIGURA 2 Distribuição dos pontos amostrais no mapa de uso e cobertura da terra.

Em março de 2004, foram coletadas as amostras de solos na camada de 0-20 cm, para as análises química, física e biológica, totalizando 98 pontos, sendo 30 amostrados na FI, 10 na FA, 17 na FP, 13 em P, 18 em AG e 10 em A (Figura 2). A amostragem de solo foi realizada de acordo com as normas padronizadas para todos os países envolvidos no projeto (Fidalgo et al., 2005).

Em trabalho realizado por Nóbrega (2006), utilizando feijão-caupi como planta isca, realizou-se o isolamento e a caracterização cultural de 217 isolados oriundos da FI, 206 da P, 188 da A, 158 da AG, 137 da FA e 104 da FP, totalizando 1.010 isolados, que foram identificados e armazenados em tubos de plástico com tampas de rosca e em meio líquido, acrescido de glicerol 20%, à temperatura de -80°C. A identificação dos isolados é referente ao ponto amostrado (Anexo 1), à repetição do vaso Leonard utilizado no experimento e ao número do nódulo isolado na planta. No presente trabalho, as estirpes em estudo foram isoladas de amostras de solo sob cultivo agrícola (Figura 3).



a)



b)



c)



d)



e)

FIGURA 3 Áreas de agricultura, com cultivos de a) mandioca, b) mandioca e banana, c) cana-de-açúcar, d) mandioca e banana e e) arroz.

### **3.2 Caracterização cultural**

Neste trabalho, para confirmar as características culturais das estirpes de BNL, estas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura com manitol, extrato de levedura (79) e azul de bromotimol, a pH 6,8 (Fred & Waksman, 1928). A caracterização cultural foi realizada por meio da avaliação das características principais, como modificação do pH do meio (ácido, alcalino ou neutro), conforme Moreira (1991); da taxa de crescimento medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (rápido - 2 a 3 dias; intermediário - 4 a 5 dias; lento - 6 a 10 dias; muito lento >10 dias); produção de goma (escassa, pouca, moderada, abundante) e coloração das colônias. As características obtidas foram comparadas com aquelas descritas anteriormente por Nóbrega (2006).

### **3.3 Autenticação por meio da inoculação no hospedeiro de origem e eficiência simbiótica**

Com base em resultados de experimentos iniciais, realizou-se a autenticação de 119 isolados, pois não foi possível recuperar os 158 isolados obtidos por Nóbrega (2006). O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Microbiologia do Solo do DCS/UFLA, por 35 dias (5 de novembro a 10 de dezembro de 2008), com o objetivo de avaliar a capacidade nodulífera e a eficiência simbiótica destes isolados na planta hospedeira feijão-caupi.



FIGURA 4 Visão geral do experimento de autenticação e eficiência simbiótica em casa de vegetação.

Para o cultivo do feijão-caupi (cultivar BR17 Gurgueia), utilizaram-se garrafas do tipo *long neck* (500 mL), revestidas com papel alumínio e preenchidas com solução nutritiva de Hoagland diluída quatro vezes. Nos tratamentos inoculados e no controle sem inoculação e sem nitrogênio mineral, utilizou-se a solução de Hoagland com baixa concentração de nitrogênio ( $5,25 \text{ mg L}^{-1}$ ), considerada dose *start* para o processo de fixação biológica de nitrogênio. Em 4L de água destilada foram adicionados os seguintes volumes (mL) das soluções estoque  $0,4$  de  $\text{CaN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $236,16 \text{ g L}^{-1}$ );  $0,1$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ( $115,03 \text{ g L}^{-1}$ );  $0,6$  de  $\text{KNO}_3$  ( $101,11 \text{ g L}^{-1}$ );  $2,0$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $246,9 \text{ g L}^{-1}$ );  $3,0$  de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ( $87,13 \text{ g L}^{-1}$ );  $10$  de  $\text{CaH}_4\text{P}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$   $12,6 \text{ g L}^{-1}$ ;  $200$  de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $1,72 \text{ g L}^{-1}$ ;  $1$  de  $\text{FeCl}_3$   $10 \text{ g L}^{-1}$ ;  $1$  de micronutrientes ( $\text{H}_3\text{BO}_3$   $2,86 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $2,03 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $0,08 \text{ mg L}^{-1}$  e  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ ).

No controle sem inoculação e com nitrogênio, utilizou-se a solução de Hoagland completa, com  $52,5 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrogênio. Para a preparação desta solução, em 4 L de água destilada, foram adicionados os seguintes volumes de solução estoque (mL)  $4,0$   $\text{CaN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $236,16 \text{ g L}^{-1}$ );  $1,0$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$   $115,03 \text{ g L}^{-1}$ ;  $6,0$  de  $\text{KNO}_3$   $101,11 \text{ g L}^{-1}$ ;  $2,0$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $246,9 \text{ g L}^{-1}$ ;  $1,0$  de  $\text{FeCl}_3$   $10 \text{ g L}^{-1}$ ;  $1,0$  de micronutrientes ( $\text{H}_3\text{BO}_3$   $2,86 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $2,03 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   $0,08 \text{ mg L}^{-1}$  e  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Em cada garrafa foram colocadas duas fitas de papel filtro, com 2 cm de largura e comprimento igual à altura da garrafa, as quais serviram de suporte para as raízes, além de promover a subida da solução nutritiva por capilaridade. Posteriormente, todas as garrafas foram autoclavadas por 40 minutos, à pressão de  $1,5 \text{ kg/cm}^2$ , a  $127^\circ\text{C}$ .

As sementes de feijão-caupi, cultivar BR17 Gurgueia, foram submetidas a um processo de desinfestação superficial com álcool 98% (30 segundos),

hipoclorito de sódio 2% (2 minutos), lavagens sucessivas em água destilada estéril (6 vezes) e deixadas submersas por uma hora em água destilada estéril. Para a germinação, elas foram colocadas em placas de Petri contendo papel filtro e algodão umedecido como suporte, previamente esterilizadas, por 24 horas, em câmara de crescimento, a 28°C.

O experimento foi constituído por 124 tratamentos com três repetições analíticas, em delineamento inteiramente casualizado, sendo 119 com inoculações das estirpes isoladas por Nóbrega (2006), 3 controles positivos com inoculação das estirpes referência INPA 03-11B, UFLA 03-84 e BR 3267, recomendadas como inoculantes para feijão-caupi pelo Ministério de Agricultura e Pecuária (MAPA) e dois controles negativos sem inoculação (com e sem nitrogênio mineral).

Os inoculantes foram preparados em tubos de vidro com meio líquido 79, aos quais se adicionou uma alçada de células bacteriana e, em seguida, foram deixados sob agitação, por 4 dias, a 28°C, para crescimento. Em cada tratamento inoculado foi adicionado 1 mL do inoculante sobre a semente. Nos controles sem inoculação, foi adicionado apenas 1 mL de meio líquido 79, sem inóculo.

Para avaliar a eficiência simbiótica das estirpes, ao final dos 35 dias, as plantas foram coletadas para determinar a matéria seca da parte aérea (MSPA), o número de nódulos (NN) e a matéria seca de nódulos (MSN). Após o destacamento manual e a contagem dos nódulos das raízes, estas e a parte aérea da planta foram acondicionados em sacos de papel e levados para estufa de circulação forçada (65°C a 70°C) até massa constante, para a determinação da massa seca. A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada segundo a fórmula:  $ER = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ com N}) \times 100$ , em que ER é a eficiência relativa, MSPA inoculada é a matéria seca da parte aérea da planta com inoculação e MSPA com N é a matéria seca da parte aérea da planta com N mineral.

Os dados MSN e NN foram transformados a raiz quadrada das médias, seguindo a normalidade. Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do programa SISVAR versão 4.0 (Ferreira, 2000). Os efeitos dos tratamentos foram estudados pelo agrupamento de médias por meio do teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A distribuição dos isolados, nos diferentes grupos culturais e classes de eficiência relativa, foi estudada graficamente, mediante emprego de estatística descritiva.

### 3.4 Diversidade genética

A diversidade genética das estirpes foi avaliada entre os 62 isolados que promoveram a nodulação em feijão-caupi, utilizando-se BOX-PCR. Na análise genética, foram incluídas estirpes tipo: *Azorhizobium dobereineriae* (BR 5401), *Azorhizobium caulinodans* (ORS 571<sup>T</sup>), *Cupriavidus taiwanensis* (LMG19424<sup>T</sup>), *Burkholderia sabiae* (BR3405), *Mesorhizobium* (BR3804), *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) e *Bradyrhizobium ellkanii* (INPA 03-11B).

Para a extração do DNA bacteriano, colônias isoladas das bactérias foram transferidas para microtubos de 2 mL contendo 1 mL de água ultrapura estéril, aquecidas por 10 minutos a 95°C e, em seguida, colocadas no gelo.

A reação de amplificação (25 µL) foi realizada com os seguintes volumes (µL): 9,45 de água ultrapura estéril; 1,25 de dNTPs (100mM); 5,0 de tampão Gitschier 5X; 0,4 de BSA (20mg mL<sup>-1</sup>); 2,5 de DMSO (100%); 1,0 *primer* BOX (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994) (0,3 µg µL<sup>-1</sup>); 0,4 de Taq (5U µL<sup>-1</sup>); 5,0 de DNA. A amplificação consistiu de: um ciclo de desnaturação inicial, a 95°C, por 7 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C e 8 minutos a 65°C; um ciclo de extensão final, a 65°C, por 16 minutos e manutenção, a 4°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 90 V, em gel de agarose a 1,5%, de 20 x 20 cm, em

tampão TAE 0,5 X, por 15 horas, em temperatura ambiente. Utilizou-se como peso molecular o marcador 100 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado.

A diversidade genética das estirpes foi analisada pela observação da presença ou da ausência de bandas polimórficas no gel. Para a presença ou a ausência das bandas, atribuíram-se, respectivamente, os valores 1 e 0, para a construção de uma matriz. Os dados da matriz foram agrupados utilizando-se o algoritmo *Unweighted Pairgroup Mean Arithmetic Method* (UPGMA) e o coeficiente de Jaccard do programa NTSYS-pc, versão 2.0 (Rohlf, 1997).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Características culturais

Dos 158 isolados caracterizados por Nóbrega (2006), verificaram-se a pureza e a viabilidade de 119. Destes, os isolados 26B1, 26B3, 21B4, 32C1, 32A10 e 28B3 apresentaram características diferentes às observadas anteriormente (Nóbrega, 2006), alteração essa que pode estar relacionada à época de avaliação, pois condições diferentes de temperatura podem afetar o desenvolvimento das bactérias. Os isolados 18C3, 19AC2, 28B6, 28B10, 32A4 e 32C5 apresentaram variação na mudança de pH do meio de cultura, modificando de ácido para neutro ou de neutro para ácido, característica típica do gênero *Burkholderia*, podendo indicar a presença de bactérias deste gênero na área. Na época em que Nóbrega (2006) avaliou as características culturais dos isolados, ainda não se tinha conhecimento de que bactérias do gênero *Burkholderia* poderiam alterar o pH do meio de cultura para ácido ou mantê-lo neutro.

Na Tabela 1 encontram-se as características culturais dos 62 isolados autenticados (dados apresentados em item posterior). Do total de isolados com capacidade de estabelecer simbiose com feijão-caupi, 17,75% apresentaram crescimento rápido e acidificaram o meio (RA) e 8,06% tiveram crescimento rápido e não alteraram o pH do meio (RN). Esses dois grupos podem apresentar estirpes pertencentes aos gêneros *Rhizobium* (Frank, 1889), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988; Lajudie et al., 1994), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997) ou *Allorhizobium*. Os isolados 6,45%, de crescimento intermediário e que não alteram o pH do meio (IN), podem ser do gênero *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997); os 9,68% que apresentaram crescimento intermediário e alcalinizaram o meio (IAL) podem indicar presença de bactérias do gênero *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988) e, por fim, 20,97% dos isolados são de crescimento lento e alcalinizam o meio (LAL) e, provavelmente, pertencem ao gênero

*Bradyrhizobium* (Jordan, 1984). Porém, para afirmar que as estirpes em estudo pertencem às estes gêneros, outras análises devem ser realizadas.

TABELA 1 Principais características culturais de 62 isolados de bactérias que estabelecem simbiose com o feijão-caupi, isoladas de amostras de solo sob cultivo agrícola na Amazônia.

Isolados	TC	pH	Goma	Cor	Isolados	TC	pH	Goma	Cor
18A3	R	N	P	C	21C7	L	AL	M	C
18A5	I	AL	P	C	21C8	I	AL	M	A
18A6	I	AL	P	C	26B1	I	N	P	B
18A8	R	A	M	A	26B3	I	N	P	C
18A9	R	A	A	A	27A3	L	N	M	C
18B1	L	AL	M	C	27C6	R	A	M	A
18B2	L	AL	M	C	27C7	R	AL	E	I
18B5	R	A	M	C	27C9	I	N	P	A
18B6	L	N	P	A	28A3	I	N	M	A
18C1	R	AL	M	C	28A6	I	A	A	A
18C3	R	A/N	M	A	28A9	L	A	M	C
18C6	L	AL	M	C	28B3	R	AL	P	B
18C7	L	AL	M	C	28B5	L	A	A	C
18C9	L	N	M	C	28B6	L	N	P	C
18C10	I	AL	P	C	28B10	L	N	P	B/C
19AA2	R	A	M	A	32A1	R	A	P	C
19AB3	L	AL	P	B	32A3	L	N	P	C
19AB5	L	N	P	C	32A4	R	N	P	A
19AB7	R	A	A	A	32A5	L	N	P	A
19AC2	R	A/N	M	A	32A6	L	N	P	B
19A6B	R	A	A	A	32A8	L	N	P	C
19B3	R	N	P	B	32A10	R	AL	E	I
19B8	L	AL	E	A	32B1	L	N	M	B
19B9	L	AL	M	C	32B2	R	A	M	A
19B10	L	AL	M	C	32B5	L	N	P	A
19C4	R	A/N	P	B	32B6	L	N	P	A
19C9	R	A/N	P	B	32B7	L	A	M	A
21B2	I	AL	P	C	32C1	R	A	A	A
21B4	I	A/N	P	B	32C5	R	N	M	A
21C4	R	A	A	A	49B1a	I	AL	P	A
21C6	ML	N	E	A	49B1b	R	N	P	A

(TC) Tempo de crescimento: (R) rápido, (I) intermediário, (L) lento, (ML) muito lento; pH do meio: (A) ácido, (N) neutro, (AL) alcalino; Goma: (A) abundante, (M) moderado, (P) pouco, (E) escasso; Cor: (C) creme, (A) amarela, (B) branca e (I) incolor.

Combinando-se as características tempo de crescimento e alteração do pH do meio, entre os 62 isolados que nodularam o feijão-caupi, foram encontrados 12 grupos culturais, os quais foram divididos em de crescimento rápido e com capacidade de acidificar o meio (RA) (11 isolados); crescimento rápido e que não alteraram o pH do meio (RN) (5 isolados); crescimento rápido, com capacidade de alcalinizar o meio (RAL) (4 isolados); crescimento rápido, que podem ou não alterar o pH do meio para ácido (RAN) (4 isolados); crescimento intermediário, com capacidade acidificar o meio (IA) (1 isolado); crescimento intermediário, que não alteraram o pH do meio (IN) (4 isolados); crescimento intermediário, que alcalinizaram o meio (IAL) (6 isolados); crescimento intermediário, que podem ou não alterar o pH do meio para ácido (IAN) (1 isolado); crescimento lento, que acidificaram o meio (LA) (3 isolados); crescimento lento, que não alteraram o pH do meio (LN) (13 isolados); crescimento lento, que alcalinizaram o meio (LAL) (9 isolados) e crescimento muito lento, que mantém o pH do meio (MLN) (1 isolado) (Figura 5). Os isolados que não nodularam plantas de feijão-caupi formaram menor número de grupos culturais (7), predominando isolados de crescimento rápido e que acidificam o meio. Essa diversidade cultural encontrada entre as BNL comprova o caráter promíscuo do feijão-caupi em relação à nodulação, corroborando os resultados encontrados por outros autores (Lewin et al., 1987; Melloni et al., 2006; Nóbrega, 2006).

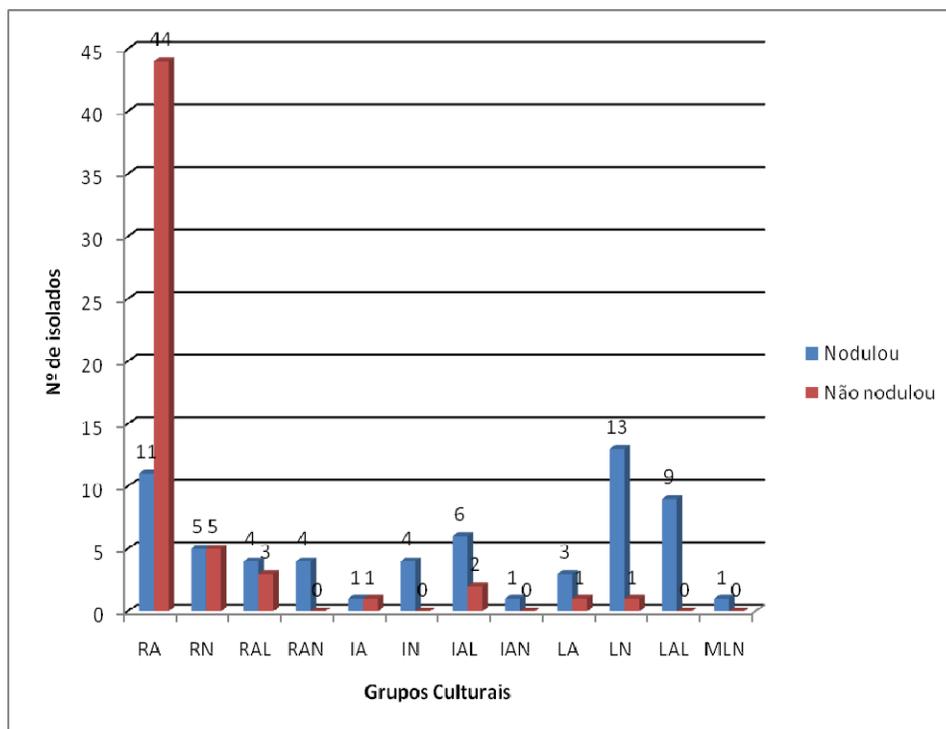


FIGURA 5 Distribuição dos 119 isolados de solo sob cultivo agrícola em grupos culturais baseados no tempo de crescimento das colônias e na alteração do pH do meio: crescimento rápido e pH ácido (RA); crescimento rápido e pH neutro (RN); crescimento rápido e pH alcalino (RAL); crescimento intermediário e pH ácido (IA); crescimento intermediário e pH neutro (IN); crescimento intermediário e pH alcalino (IAL); crescimento intermediário e pH ácido ou neutro (IAN); crescimento lento e pH ácido (LA); crescimento lento e pH neutro (LN); crescimento lento e pH alcalino (LAL); crescimento lento e pH ácido ou neutro (LAN); crescimento muito lento e pH neutro (MLN).

## **4.2 Autenticação por meio da inoculação no hospedeiro de origem e eficiência simbiótica**

### **4.2.1 Autenticação por meio da inoculação no hospedeiro de origem**

No experimento de autenticação, foram avaliados 119 isolados, dos quais 62 foram autenticados, ou seja, apresentaram nodulação positiva (Tabela 2). Os controles sem inoculação e sem N mineral não apresentaram nodulação, comprovando que não houve contaminação do experimento, o que tornou possível a autenticação e a avaliação da eficiência simbiótica destes isolados. As altas temperaturas registradas no período em que o experimento foi instalado, com média diária em torno de 33°C, podem ter afetado a infecção de alguns isolados (Moreira & Siqueira, 2006). Com isso, pode-se inferir que os isolados com nodulação positiva são tolerantes à alta temperatura, sendo este um fator positivo, uma vez que os mesmos se encontram em estágios de seleção para estirpes eficientes para feijão-caupi, na qual um dos objetivos é obter estirpes que sejam competitivas em condições de estresse. No entanto, outros testes devem ser realizados nos isolados que não nodularam nessas condições, para constatar ou não sua incapacidade de nodular.

Dentre os isolados que não estabeleceram simbiose com feijão-caupi, a maioria foi isolada da janela Guanabara II, nos pontos 19 e 19A.

TABELA 2 Autenticação de 119 estirpes de bactérias quanto à nodulação de feijão-caupi, isoladas de amostras de solo sob cultivo agrícola na Amazônia

<b>Isolados</b>	<b>Nodulação</b>	<b>Isolados</b>	<b>Nodulação</b>	<b>Isolados</b>	<b>Nodulação</b>
18A3	+	19A5	-	27C5b	-
18A4	-	19A9	-	27C6	+
18A5	+	19A10	-	27C7	+
18A6	+	19A6B	+	27C8	-
18A8	+	19B1	-	27C9	+
18A9	+	19B3	+	27C10	-
18A10	-	19B5	-	28A3	+
18B1	+	19B5b	-	28A5	-
18B2	+	19B6	-	28A6	+
18B3	-	19B8	+	28A8	-
18B4	-	19B9	+	28A9	+
18B5	+	19B10	+	28A10	-
18B6	+	19C2	-	28A12	-
18B9	-	19C4	+	28B3	+
18C1	+	19C5	-	28B5	+
18C2	-	19C7	-	28B6	+
18C3	+	19C8	-	28B9	-
18C4	-	19C9	+	28B10	+
18C6	+	21B2	+	32A1	+
18C7	+	21B4	+	32A3	+
18C8	-	21B9	-	32A4	+
18C9	+	21B10	-	32A5	+
18C10	+	21C1	-	32A6	+
19AA1	-	21C2	-	32A8	+
19AA2	+	21C4	+	32A9	-
19AA4	-	21C5	-	32A10	+
19AA5	-	21C6	+	32B1	+
19AA8	-	21C7	+	32B2	+
19AA9	-	21C8	+	32B5	+
19AA7	-	21C9	-	32B6	+
19AB3	+	21C10	-	32B7	+

...Continua...

TABELA 2, Cont.

<b>Isolados</b>	<b>Nodulação</b>	<b>Isolados</b>	<b>Nodulação</b>	<b>Isolados</b>	<b>Nodulação</b>
19AB5	+	26B1	+	32C1	+
19AB7	+	26B3	+	32C2	-
19AB8	-	27A1	-	32C5	+
19AB9	-	27A3	+	32C9	-
19AC1	-	27A4	-	49B1a	+
19AC2	+	27A6	-	49B1b	+
19AC6	-	27C1	-	72C1	-
19A2	-	27C2	-	72C2	-
19A4	-	27C5a	-		

Sinal positivo (+): presença de nódulos nas plantas de feijão-caupi.

Sinal negativo (-): ausência de nódulos nas plantas de feijão-caupi.

#### **4.2.2 Eficiência simbiótica**

A análise de variância detectou efeito significativo dos tratamentos sobre número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (ER%). Os valores médios encontram-se na Tabela 3.

TABELA 3 Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (ER%) de 62 isolados, três controles positivos (INPA 03-11B, UFLA 03-84 e BR 3267) e dois controles negativos sem inoculação (com e sem N).

Isolados	NN	MSN	MSPA	ER
		mg planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>	%
18B5	13 e	14,00 c	0.08 h	8 h
18C7	26 d	6,33 d	0.11 h	13 h
28B10	8 f	2,67 e	0.123 h	13 h
32A10	27 d	21,33 b	0.13 h	13 h
28B3	10 f	5,67 d	0.13 h	13 h
18A9	3 g	6,67 d	0.14 h	15 h
18C6	9 f	5,67 d	0.15 g	16 g
18A5	24 d	2,33 e	0.17 g	17 g
21C8	27 d	14,00 c	0.17 g	17 g
26B1	30 d	8,67 d	0.17 g	18 g
19AB5	16 e	1,00 e	0.18 g	19 g
21C4	17 e	19,00 c	0.22 g	24 g
21B4	16 e	16,00 c	0.25 g	26 g
27C9	27 d	12,33 c	0.25 f	26 f
32A5	43 c	33,00 b	0.25 f	26 f
27C6	9 f	5,67 d	0.25 f	26 f
19B9	37 c	7,00 d	0.25 f	27 f
18C10	31 d	13,00 c	0.27 f	29 f
SN	0 h	0,00 g	0.27 f	29 f
18C3	10 f	10,67 c	0,28 f	29 f
28A6	39 c	26,00 b	0.29 e	30 e
19B10	56 b	41,67 a	0.29 e	31 e
UFLA 03-84	46 b	56,00 a	0.30 e	31 e
18B2	47 b	40,67 a	0.30 e	32 e
32B7	60 b	45,67 a	0.31 e	32 e
19AA2	38 c	12,00 c	0.31 e	32 e
27A3	6 f	16,00 c	0.31 e	33 e

...Continua...

TABELA 3, Cont.

Isolados	NN	MSN	MSPA	ER %
		mg planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>	
19AC2	41 c	38,00 b	0.32 e	33 e
18A3	47 b	43,00 a	0.32 e	33 e
21C7	35 c	39,67 b	0.32 e	34 e
21B2	16 e	9,00 d	0.32 e	34 e
28B5	37 c	36,00 b	0.33 d	35 d
32A3	64 a	24,00 b	0.33 d	35 d
32A4	48 b	37,67 b	0.33 d	35 d
28A3	40 c	19,00 c	0.34 d	35 d
32B2	44 c	29,00 b	0.34 d	36 d
19AB7	31 d	28,00 b	0.35 d	37 d
19AB3	41 c	31,67 b	0.35 d	37 d
32B1	69 a	64,67 a	0.35 d	37 d
32C5	55 b	44,67 a	0.36 d	37 d
49B1b	52 b	54,67 a	0.36 d	38 d
18B6	47 b	35,67 b	0.36 d	38 d
INPA 03-11B	71 a	51,00 a	0.36 d	38 d
18A8	45 b	40,00 a	0.36 d	38 d
32C1	36 c	53,00 a	0.36 d	38 d
19B3	41 c	38,67 b	0.37 c	39 c
32B6	41 c	32,00 b	0.38 c	40 c
18B1	34 c	46,67 a	0.38 c	40 c
18C9	54 b	42,33 a	0.38 c	40 c
32B5	53 b	32,33 b	0.38 c	40 c
32A8	46 b	44,00 a	0.39 c	41 c
18C1	63 a	40,00 a	0.39 c	41 c
32A6	37 c	44,67 a	0.39 c	41 c
19B8	51 b	51,00 a	0.39 c	41 c
19A6B	43 c	27,00 b	0.40 b	42 b
19C4	70 a	45,00 a	0.41 b	43 b

...Continua...

TABELA 3, Cont.

Isolados	NN	MSN	MSPA	ER
		mg planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>	%
32A1	31 d	40,00 a	0.41 b	43 b
49B1a	47 c	54,00 a	0.41 b	43 b
21C6	65 a	53,00 a	0.42 b	44 b
19C9	55 b	43,67 a	0.42 b	44 b
18A6	41 c	43,00 a	0.42 b	44 b
28B6	48 b	56,67 a	0.42 b	44 b
26B3	39 c	29,00 b	0.43 b	45 b
27C7	57 b	41,33 a	0.44 b	46 b
28A9	46 b	41,33 a	0.45 b	48 b
BR 3267	74 a	55,00 a	0,45 b	48 b
CN	0 h	0,00 g	0,95 a	100,00 a
CV %	9,20	15,45	8,5	9,37

\*Letras iguais na mesma coluna pertencem ao mesmo grupo, a 5 % de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Os isolados 18C1, 32A3, 21C6, 32B1 e 19C4 apresentaram maior número de nódulos, agrupando-se junto às estirpes referência UFLA 03-11b e a BR 3267 (Tabela 3). Esses isolados apresentaram ER% variável, mostrando que maior número de nódulos nem sempre representa maior produção de matéria seca da parte aérea. A maioria desses isolados apresentou crescimento rápido ou lento, e apenas um teve crescimento muito lento.

A maioria do isolados que apresentou maior MSN foi eficiente no processo de FBN. No entanto, alguns isolados, como a recomendada UFLA 03-84, apresentaram maior MSN, porém, baixa eficiência.

O valor médio da matéria seca da parte aérea (MSPA) do controle sem inoculação e sem N foi de 0,28 g e do controle com N foi de 0,95 g. Neves (2007), em experimento de autenticação em garrafas *long neck* (500 mL), utilizando a cultivar BR17 Gurguéia, obteve valores inferiores aos mencionados, para ambas as testemunhas. Esta autora encontrou variação das médias entre

0,04 g a 0,09 g para a testemunha sem inoculação e sem N e entre 0,498 g e 0,705 g para a controle com N. Porém, a autora utilizou solução de Jensen, e não de Hogland, o que deve ter afetado os resultados. Nenhuma das estirpes inoculadas apresentou MSPA próxima à do controle com N (Tabela 3), nem mesmo as estirpes recomendadas pelo MAPA, UFLA3-84, UFLA03-11b (Lacerda et al., 2004; Moreira, 200-) e BR3267 (Martins et al., 2003). Em estudos realizados por Nóbrega (2006), avaliando a ocorrência e a eficiência simbióticas de populações de diferentes SUT, foram encontrados resultados semelhantes aos citados acima. As plantas inoculadas, inclusive as inoculadas com as estirpes referência, não alcançaram valores de MSPA próximos ao controle nitrogenado.

Dos isolados avaliados, 68% forneceram incremento de MSPA em relação ao controle sem N, agrupando-se às estirpes recomendadas, o que pode significar a presença de estirpes com potencial agrônômico entre os isolados estudados. Os outros 30% não diferiram significativamente ou apresentaram valores MSPA inferiores ao do controle sem inoculação e sem N (Tabela 3).

A ER% encontrada para os isolados em estudo, incluindo as estirpes referência (INPA 03-11B, UFLA3-84 e BR3267), ficou abaixo daquele apresentado pelo controle nitrogenado. A ER% dos isolados foi classificada, de acordo com os grupos identificados pelo teste de Scott-Knott (Tabela 3), em: eficiente (grupo “b”), eficiência intermediária (grupos “c” e “d”), baixa eficiência (grupo “e”) e ineficiente (grupos “f”, “g” e “h”). Estes últimos representaram 30% dos isolados estudados e não diferiram significativamente ou apresentaram valores inferiores ao controle sem inoculação e sem N. Os demais isolados se agruparam às estirpes referência UFLA 03-84 (grupo e), INPA 03-11B (grupo d) e BR 3267 (grupo b) (Figura 6).

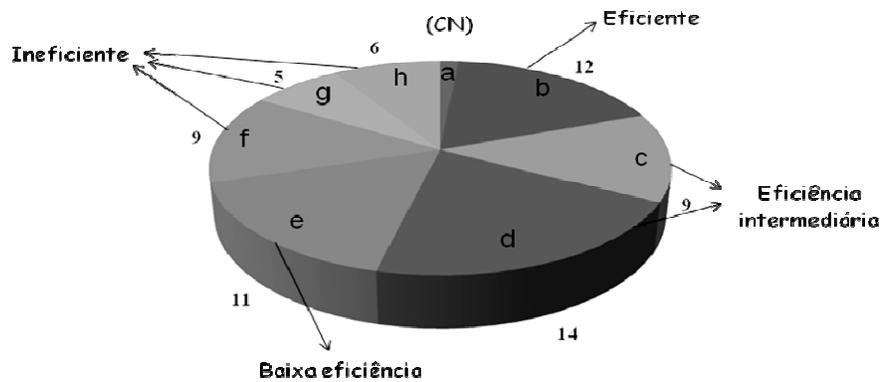


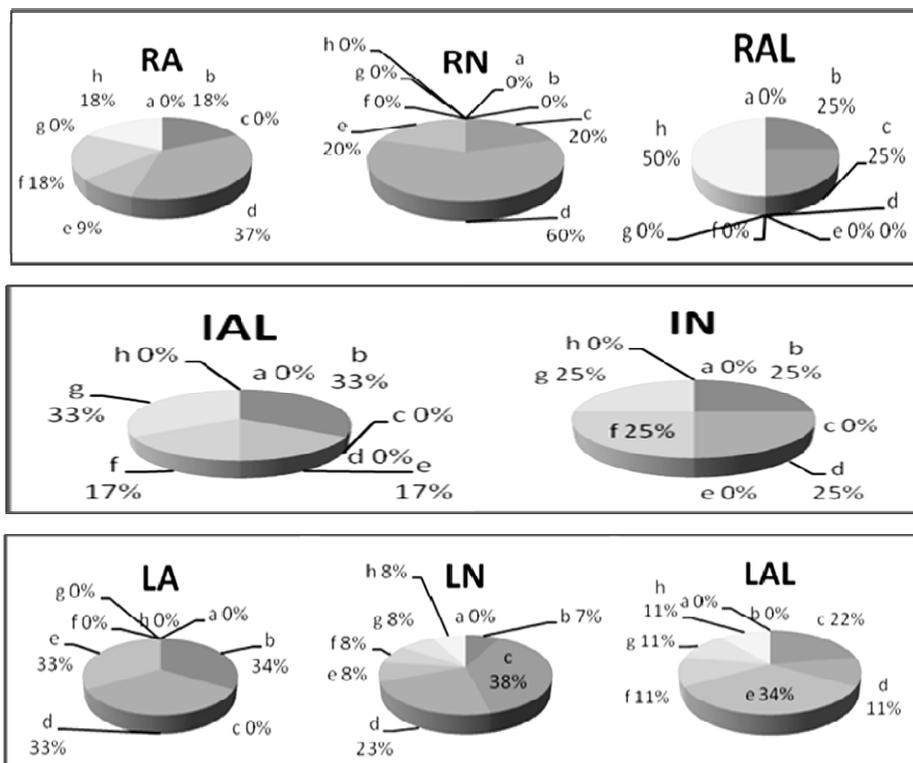
FIGURA 6 Distribuição de isolados por grupos de Eficiência Relativa (ER%).

Os resultados de ER% encontrados para os tratamentos com inoculação, inclusive com as estirpes recomendadas INPA3-11-b, UFLA3-84 e BR 3267, podem estar relacionados às altas temperaturas diárias registradas no período em que o experimento foi instalado. Segundo Moreira & Siqueira (2006), plantas adubadas com N apresentam maior tolerância aos estresses abióticos em relação às plantas cuja aquisição desse nutriente se origina da fixação biológica de nitrogênio.

#### 4.4 Eficiência relativa x grupos culturais

Os grupos culturais apresentaram isolados com ER% variável (Figura 7), à exceção dos grupos IA, IAN e MLN, os quais tiveram apenas um isolado cada. O isolado deste último grupo foi classificado dentre os de maior ER% (grupo “b” na análise estatística). O isolado do grupo IAN apresentou eficiência muito baixa, assemelhando-se ao controle sem inoculação e sem N. Os maiores grupos culturais formados foram RA e LN, os quais apresentaram representantes nos diferentes grupos de ER%. O grupo cultural RA foi formado com representantes classificados nos grupos “b”, “d”, “e”, “f” e “h”, tendo 36,36% dos isolados sido considerados ineficientes e o restante se agrupou às estirpes recomendadas como inoculante para feijão-caupi, mostrando que pode haver,

entre os isolados estudados, estirpes com potencial para inoculante. O grupo LN apresentou menor número de isolados ineficientes (23,08%), quando comparado ao grupo RA, com predominância de isolados de eficiência intermediária (Figura 7), o que também pode indicar estirpes com potencial para inoculante.



LEGENDA	
a	→ Controle com N
b	→ Estirpes Eficientes
c, d	→ Estirpes de Eficiência Intermediária
e	→ Estirpes de Baixa eficiência
f,g,h	→ Estirpes Ineficientes

FIGURA 7 Distribuição dos isolados dos grupos culturais, crescimento rápido e pH ácido (RA); crescimento rápido e pH neutro (RN); crescimento rápido e pH alcalino (RAL); crescimento intermediário e pH neutro (IN); crescimento intermediário e pH alcalino (IAL), crescimento lento e pH ácido (LA), crescimento lento e pH neutro (LN) e crescimento lento e pH alcalino (LAL), em classes de eficiência relativa.

#### **4.5 Diversidade genética**

Técnicas moleculares de *fingerprinting*, utilizando *primers* com oligonucleotídeos específicos, como a sequência BOX, que codificam regiões altamente conservadas e repetidas, têm sido cada vez mais empregadas em estudos de diversidade genética (Rademaker et al., 1997).

As 62 estirpes que estabeleceram simbiose com feijão-caupi foram submetidas à análise genética por meio da técnica BOX-PCR. As estirpes 18B5, 19AA2, 19AC2, 19A6b, 19AB7, 21 C6, 32B2 e 32C1 não apresentaram boa amplificação do DNA e não foram incluídas no agrupamento (Figura 8). De acordo com Judd et al. (1993), isso pode ocorrer com estirpes e oligonucleotídeos específicos.

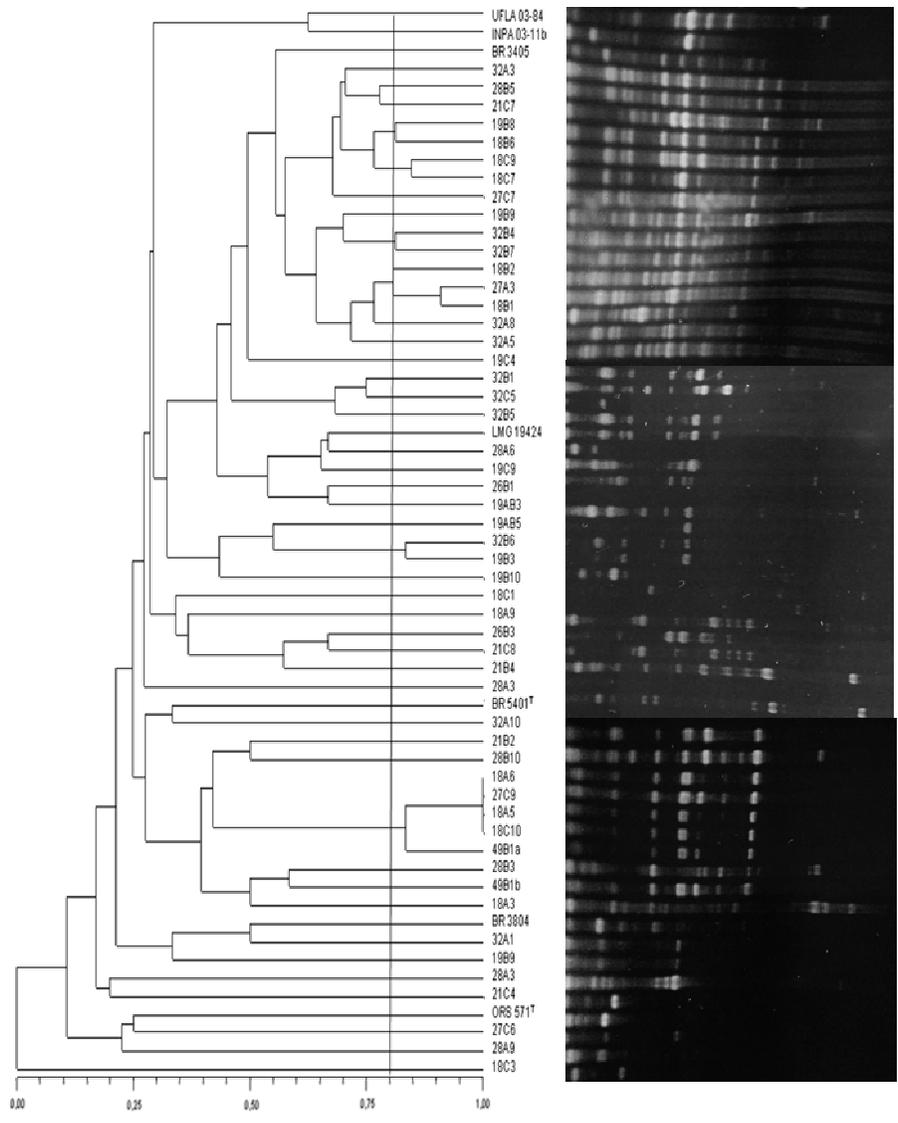


FIGURA 8 Dendrograma de similaridade genética das estirpes de bactérias que nodulam feijão-caupi, isoladas de solo sob cultivo agrícola na Amazônia Ocidental, e das estirpes tipo.

Observou-se alta diversidade genética entre as estirpes avaliadas, corroborando os resultados encontrados por Nóbrega (2006), que observou elevada diversidade fenotípica ao avaliar as características culturais de 1.010 isolados de diferentes STU, na Amazônia. A mesma autora também observou alta diversidade fenotípica ao analisar perfis de proteínas de 197 isolados.

Pesquisadores observaram maior diversidade em áreas de cultivo agrícola em relação à floresta primária (Jesus et al., 2005; Nóbrega, 2006; Barberi, 2007; Lima et al., 2009), o que pode ser justificado pelo desequilíbrio de nitrogênio em áreas de cultivo (Silva & Dobereiner, 1982).

A 80% de similaridade, foram formados 49 grupos (Figura 5), tendo a maioria sido constituída por apenas uma estirpe, apresentando similaridade menor 65% com as estirpes tipo utilizadas para comparação: BR 5401 (*Azorhizobium dobereineriae*), ORS 571<sup>T</sup> (*Azorhizobium caulinodans*), LMG19424<sup>T</sup> (*Cupriavidus taiwanensis*), BR3405 (*Burkholderia sabiae*), BR3804 (*Mesorhizobium*), UFLA 03-84 (*Bradyrhizobium* sp.) e INPA 03-11B (*Bradyrhizobium ellkanii*).

As estirpes 18A6, 18A5, 18C10 e 27C9 apresentaram 100% de similaridade (Figura 8). Destas, as que foram coletadas no ponto 18 apresentaram características culturais iguais (tempo de crescimento intermediário e pH neutro) e a que foi coletada no ponto 27 apresentou crescimento intermediário e pH alcalino, diferenças quem podem estar relacionadas ao ambiente. Essas estirpes apresentaram eficiência simbiótica variável.

A estirpe 18C3 se destacou por não ter agrupado a nenhuma outra estirpe, nem mesmo a baixa similaridade, ou seja, ela foi considerada totalmente diferente das outras. Porém, quando foi realizado o agrupamento por meio da caracterização cultural, apresentou características semelhantes às das estirpes 19AC2, 19C4 e 19C9, as quais pertencem ao grupo cultural RAN. Em relação à

fixação biológica de nitrogênio, a estirpe 18C3 se mostrou ineficiente, não diferindo significativamente do controle sem inoculação e sem N mineral.

Lima et al. (2009), avaliando a diversidade genética de bactérias que nodulam plantas de siratro isoladas de diferentes SUTs na Amazônia, observaram maior diversidade genética nos SUT Agricultura e Agrofloresta, sendo a primeira, a mesma área que deu origem às estirpes do presente trabalho. Nessa área, Lima et al. (2009) encontram diferentes gêneros, tais como: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Burkholderia*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Lima et al. (2009) e Jesus et al. (2009) mostraram que a conversão de áreas de floresta em pastagem e em áreas de cultivo não reduziram a diversidade genética, demonstrando a resiliência das comunidades bacterianas.

A diversidade fenotípica e genética encontrada na área de estudo, utilizando plantas de siratro (Lima et al., 2009), feijão (Barberi, 2007) e feijão-caupi (Nóbrega, 2006; Neves, 2007) mostra a possibilidade de identificar novas estirpes, com potencial para inoculante, além de comprovar que plantas de feijão-caupi apresentam caráter promíscuo, sendo ideal para uso como planta isca em estudos de diversidade (Moreira et al., 2008).

## 5 CONCLUSÕES

Há evidências de que, entre os isolados avaliados, existam espécies de bactérias nodulíferas que ainda não foram descritas.

Áreas de cultivo agrícola na Amazônia Ocidental apresentam alta diversidade simbiótica, fenotípica e genética de estirpes que nodulam feijão-caupi.

A técnica molecular BOX-PCR mostrou-se mais indicada que a caracterização cultural para estimar a diversidade de estirpes, por possibilitar maior discriminação entre estirpes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBERI, A. **Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental.** 2007. 132 p.  
Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BERKUN, P. van; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificand* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1132-1136, Mar. 2002.

BONETTI, R.; OLIVEIRA, L. A.; MOREIRA, F. M. S. População de *Rhizobium* spp e ocorrência de micorriza VA em cultivos de essências florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 137-142, jun. 1984.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Whashington, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, July 1997.

CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, Sept. 2001.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 38, n. 4, p. 392-397, Oct. 1988.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 89-98, Jan. 1988.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FIDALGO, E. C.; COELHO, M. R.; ARAÚJO, F. O.; MOREIRA, F. M. S.; SANTOS, H. G.; SANTOS, M. L. M.; HUISING, J. **Levantamento do uso da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto “Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity: phase 1”**, Município de Benjamin Constant (AM). Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. 54 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 71). Disponível em: <<http://www.biosbrasil.ufla.br>>. Acesso em: 28 jul. 2009.

FRANK, B. Ueber dies pilzsymbiose der leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Stuttgart, v. 7, p. 332-346, 1889.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill Book, 1928. 143 p.

FREIRE FILHO, F. R. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Avanços tecnológicos feijão-caupi**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 29-75.

FROTA, A. B.; PEREIRA, P. R. Caracterização da produção de feijão-feijão-caupi na região Meio-Norte do Brasil. In: CARDOSO, M. J. (Org.). **A cultura do feijão-caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. p. 9-25. (Circular Técnica, 28).

GUALTER, R. M. R.; LEITE, L. F. C.; ALCANTARA, R. M. C. M.; COSTA, D. B. Inoculação e adubação mineral em feijão-caupi: efeitos na nodulação, crescimento e produtividade. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 4, p. 469-474, dez. 2008.

HARRISON, S. P.; MYTTON, L. R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 10, p. 1009-1015, Oct. 1992.

JARVIS, B. D. W.; BERKUM, P. van; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium cicer*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshansense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 47, n. 3, p. 895-898, July 1997.

JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **International Society for Microbial Ecology**, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, Sept. 2009.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORETINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, ago. 2005.

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn, 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. D. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. London: Williams and Wilkins, 1984. p. 234-244.

JUDD, A. K.; SCHNEIDER, M.; SADOWSKY, M. J.; BRUIJN, F. J. Use of repetitive sequences and the polymerase technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 6, p. 1702-1708, June 1993.

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 51, n. 293, p. 67-82, jan. 2004.

LAGUERRE, G.; BARDIN, M.; AMARGER, N. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hybridization. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, n. 12, p. 1142-1149, Dec. 2001.

LAJUDIE, P. de; WILLENS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; LINDSTROM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 48, n. 2, p. 369-382, Apr. 1998.

LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, Z. A.; WONG, C. H.; NELSON, L.; MANEN, J. F.; STANLEY, J.; DOWLING, D. N.; DÉNARIE, J.; ROUGHTON, W. J. Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 8, n. 6, p. 447-459, Nov. 1987.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 319, n. 1/2, p. 127-145, June 2009.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, nov. 2005.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. de. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, June 1999.

MAGALHÃES, F. M. S.; MAGALHÃES, L. M. S.; OLIVEIRA, L. A.; DOBEREINER, J. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais nativas da região de Manaus-AM. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n. 3, p. 509-514, jul. 1982.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, n. 6, p. 333-339, Oct. 2003.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 230-243, maio 2006.

MENDONÇA-SANTOS, M. L.; SANTOS, H. G.; COELHO, M. R.; BERNARDI, A. C. C.; MACHADO, P. L. O. A.; MANZATTO, C. V.; FIDALGO, E. C. C. Solos e ocupação das terras na Amazônia Brasileira. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Ed. UFLA, 2008. 768 p.

MOREIRA, F. M. S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica.** 1991. 152 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.

MOREIRA, F. M. S. **Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para produção de inoculantes comerciais.** Lavras: UFLA, 200-. 6 p.  
Disponível em: <<http://www.dcs.ufla.br/links/artigocaupi.pdf>>. Acesso em: 13 jul. 2009.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; YOUNG, J. P. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 3, p. 197-206, Apr. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v. 16, n. 1, p. 135-146, Apr. 1993.

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brasil. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 889-895, July 1998.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros.** Lavras: Ed. UFLA, 2008. 768 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems.** Cambridge: CABI, 2006. 280 p.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOLVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 6850, p. 948-950, June 2001.

NEVES, A. A. O. **Eficiência e diversidade de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob floresta secundária e pastagem na Amazônia Ocidental.** 2007. 92 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NÓBREGA, R. S. A. **Efeito de sistemas de uso da terra na Amazônia sobre atributos do solo, ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp].** 2006. 188 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ODEE, D. W.; SUTHERLAND, J. M.; MSKSYISNI, E. T.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. I. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 188, n. 1, p. 65-75, Jan. 1997.

PARKER, M. A.; LUNK, A. Relationships of Bradyrhizobia from *Platypodium* and *Machaerium* (Papilionoideae: tribe Dalbergiatae) on Barro Colorado Island, Panama. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, Basingstoke, v. 50, n. 3, p. 2279-2285, May 2000.

PEREIRA, E. G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.** 2000. 93 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; BRUIJN, F. J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKKERMANS, A. D. L. de; BRUIJN, F. J. **Molecular microbiol ecology manual.** Dordrecht: Kluwer, p.1-26, 1997.

RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; WILLENS, A.; VIZCAÍNO, N.; SUBBA-RAO, N.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. D.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5217-5222, Nov. 2002.

RODRIGUES, T. E. Solos da Amazônia. In: ALVAREZ, V. H.; FONTES, L. E. F.; FONTES, M. P. F. (Ed.). **Os solos nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentável.** Viçosa, MG: UFV/SBCS/DPS, 1996. p. 251-260.

ROHLF, F. J. **NTSYSpc**: numerical taxonomy and multivariate analyses system. Version 2.0. New York: Exeter, 1997. CD-ROM.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; SILVA, P. H. S. da; VIANA, F. M. P. (Org.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**, 2005. p. 279-335.

SILVA, E. M. R.; DOBEREINER, J. O papel das leguminosas no reflorestamento. In: SEMINÁRIO SOBRE PERSPECTIVAS E ATUALIDADES FLORESTAIS, 7., 1982, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Associações Biológicas entre Espécies Florestais e Microrganismos para o Aumento da Produtividade Econômica do Reflorestamento, 1982. p. 33-52.

SILVA, K. **Densidade e caracterização de bactérias diazotróficas associativas oriundas de diferentes sistemas de uso da terra na região Amazônica**. 2006. 83 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG): I, Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 795-802, set./out. 2006.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOUR, P.; GARCIA, N.; WILLENS, A.; LAJUDIE, P. de; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 214-220, Jan. 2001.

TRUJILLO, M. E.; WILLENS, A.; ABRIL, A.; PLNCHUELO, A.; RIVAS, R.; LUDEÑA, D.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupine*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, Mar. 2005.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, F.; VIZCAÍNO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F. *Phylobacterium trifolii* sp.nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 55, n. 5, p. 1985-1989, Sept. 2005.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.

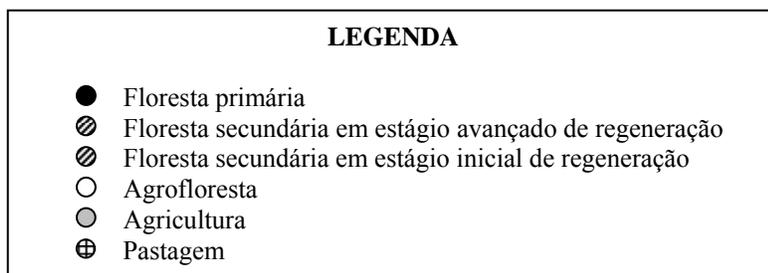
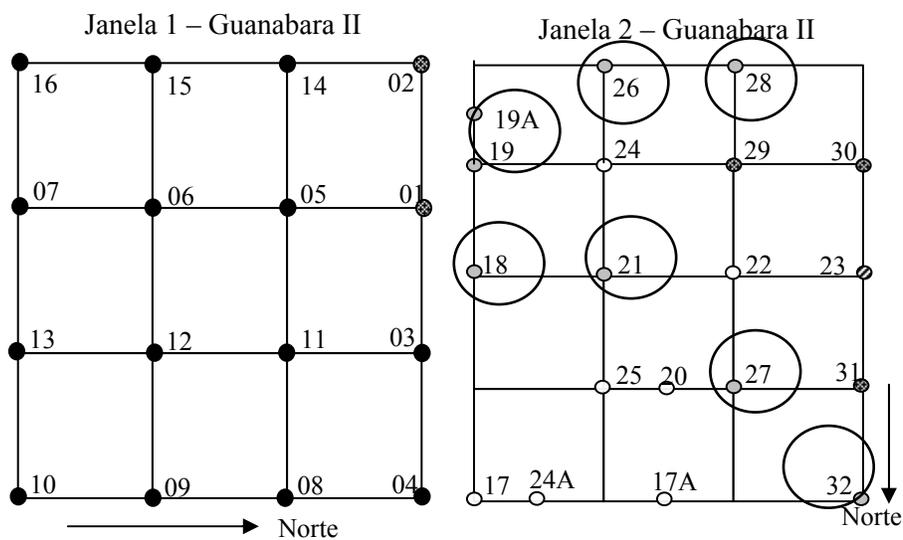
VINUESA, P.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic wood legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of gene encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 6, p. 2096-2104, June 1998.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. A.; RUMJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 1, p. 25-33, mar. 2006.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 811-818, maio 2006.

## ANEXO

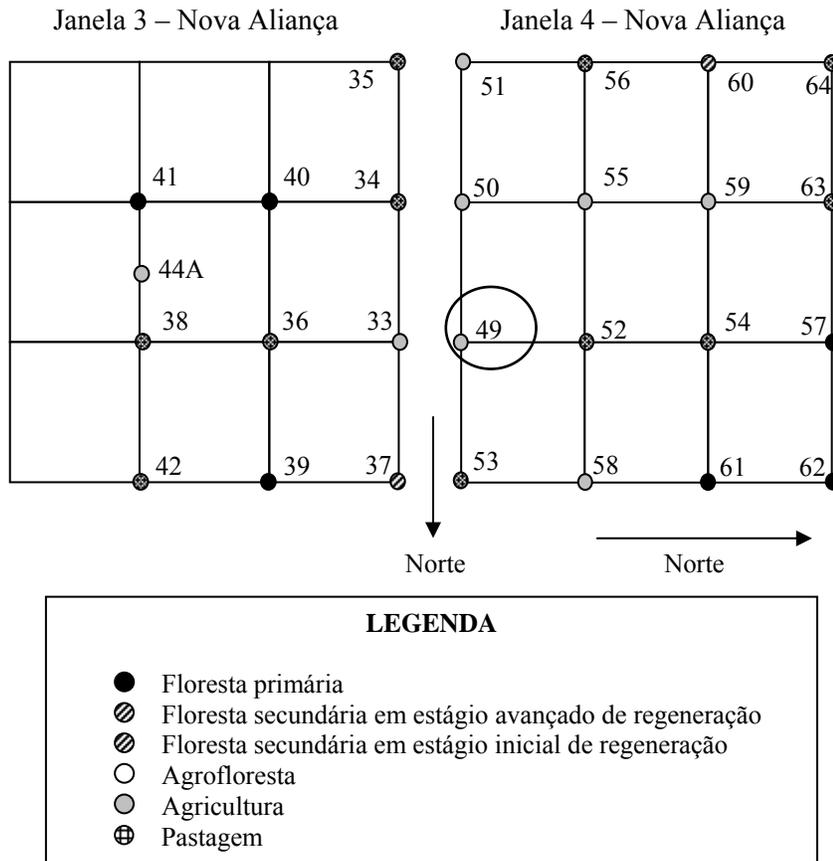
FIGURA 1 Croqui de campo das áreas amostradas, janelas 1e 2.



\*Os pontos de amostragem de solo estão equidistantes entre si 100m, na maioria dos casos. No entanto, para uma melhor amostragem das áreas, essa distância foi alterada sempre que considerado conveniente.

\*\*Pontos circulos correspondem ao local de coleta das amostras de solos de onde foram isoladas as estirpes em estudo.

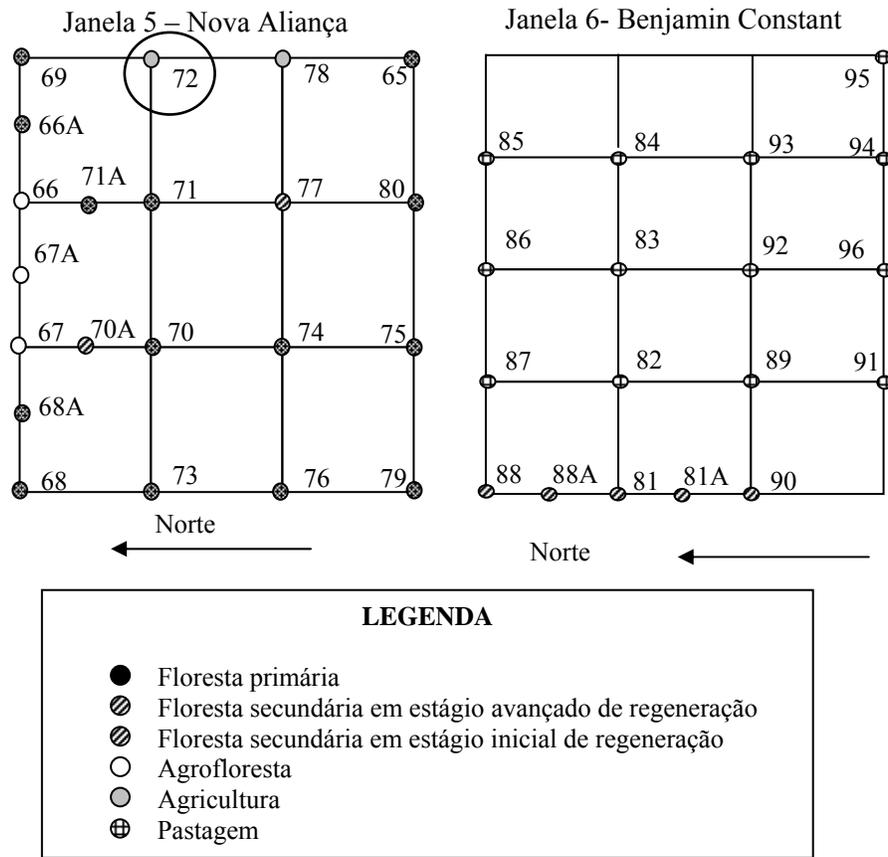
FIGURA 2 Croqui de campo das áreas amostradas, janelas 3 e 4



\*Os pontos amostrados estão equidistantes entre si 100m, na maioria dos casos. No entanto, para uma melhor amostragem das áreas, essa distância foi alterada sempre que considerado conveniente.

\*\*Pontos circulos correspondem ao local de coleta das amostras de solos de onde foram isoladas as estirpes em estudo.

FIGURA 3 Croqui de campo das áreas amostradas, janelas 5 e 6



\*Os pontos de amostragem de solo estão equidistantes entre si 100m, na maioria dos casos. No entanto, para uma melhor amostragem das áreas, essa distância foi alterada sempre que considerado conveniente.

\*\*Pontos circulados correspondem ao local de coleta das amostras de solos de onde foram isoladas as estirpes em estudo.

TABELA 1 Quadro de ANOVA, avaliando a variável NN (Com transformação: Raiz quadrada de x)

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
TRAT	66	727,594778	11,024163	38,213	0,0000
Erro	132	38,081165	0,288494		
Total	198	765,675942			

CV= 9,20%

TABELA 2 Quadro de ANOVA, avaliando a variável MSN (Com transformação: Raiz quadrada de x)

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
TRAT	66	772,679945	11,707272	18,650	0,0000
Erro	131	82,235218	0,627750		
Total	200	854,915162			

CV= 15,45%

TABELA 3 Quadro de ANOVA, avaliando a variável MSPA (Sem transformação)

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
TRAT	66	2,93860	0,044513	59,135	0,0000
Erro	134	0,100867	0,000753		
Total	200	3,038726			

CV= 8.5%

TABELA 4 Quadro de ANOVA, avaliando a variável ER% (Sem transformação)

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
TRAT	66	32689,568683	495,296	49,063	0,0000
Erro	134	1352,756533	10,095198		
Total	200	34042,325216			

CV= 9,37%