

**EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE  
RIZÓBIOS SELECIONADOS E  
DIVERSIDADE DAS POPULAÇÕES  
NATIVAS QUE NODULAM O FEIJOEIRO-  
COMUM EM FORMIGA - MG**

**CLÁUDIA DE OLIVEIRA GONÇALVES NOGUEIRA**

2005

**CLÁUDIA DE OLIVEIRA GONÇALVES NOGUEIRA**

**EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE RIZÓBIOS SELECIONADOS E  
DIVERSIDADE DAS POPULAÇÕES NATIVAS QUE NODULAM  
O FEJJOEIRO-COMUM EM FORMIGA-MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof. Fátima Maria de Sousa Moreira

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFPA

Nogueira, Cláudia de Oliveira Gonçalves,  
Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações  
nativas que nodulam o feijoeiro-comum em Formiga-MG / Cláudia de Oliveira  
Gonçalves Nogueira. -- Lavras : UFLA, 2005.  
66p. : il..

Orientadora: Fátima Maria de Sousa Moreira.  
Dissertação (Mestrado) – UFLA.  
Bibliografia.

1. Eficiência. 2. Diversidade. 3. FBN. 4. Rizóbio. 5. Feijão. 6. *Phaseolus vulgaris*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.652894

**CLÁUDIA DE OLIVEIRA GONÇALVES NOGUEIRA**

**EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE RIZÓBIOS SELECIONADOS E  
DIVERSIDADE DAS POPULAÇÕES NATIVAS QUE NODULAM  
O FELJOEIRO-COMUM EM FORMIGA-MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 06 de junho de 2005

Prof. Dr Eustáquio Sousa Dias

UFLA

Prof. Dr. Messias José Bastos Andrade

UFLA



Prof. Dra Fátima Maria de Sousa Moreira  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS- BRASIL

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Biologia, ao Departamento de Ciência do Solo, a FAPEMIG e ao CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Marcelo, meu marido, pelo apoio incondicional.

A Carolina, Mariana e Marcela, minhas filhas, que souberam entender minhas ausências assumindo responsabilidades que não eram delas, para que eu pudesse realizar este trabalho.

À professora Fátima Maria de Souza Moreira, pela orientação, paciência e compreensão.

Ao professor Messias José Bastos de Andrade, pela co-orientação, pela amizade e pelo suporte nos ensaios de campo e por ser um exemplo de Mestre.

Aos doutorandos Adriana, Rafaela, Alexandre e Éderson, que sempre se dispuseram a discutir minhas dúvidas com a maior presteza.

Aos colegas de mestrado Márcio, Miriam, Euziclei, Val, Jaíne, Vítor, Aramália, Claudineli, Alexandre, e principalmente, ao Helson, que se tornou um irmão por adoção.

Aos alunos de iniciação científica, Paulo Ademar e João Paulo, pela ajuda no campo.

À professora Rosane Schuan, pela oportunidade no Departamento de Biologia

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia do Solo, Manoel e Marlene, pelo apoio.

Ao proprietário da fazenda Ponte Alta, Sr Paulo Rodrigues Nunes.

A Michele Rocha, a Magda Aparecida Melo, secretária do curso de Pós-Graduação, pela amizade e atenção, enfim, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **DEDICATÓRIA**

Ao Marcelo, Carolina, Mariana e Marcela. À Dona Naná, minha mãe, meus quinze irmãos, aos amigos Georges, Maria Helena e Marilda e aos meus alunos do UNIFOR-MG. Dedico.

## SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 Referencial teórico.....	3
2.1 Fixação biológica de nitrogênio.....	3
2.2 Diversidade e ocorrência de organismos fixadores de nitrogênio.....	6
2.3 Importância da seleção de bactérias que nodulam feijoeiro.....	7
2.4 Diversidade de rizóbios que nodulam feijoeiro.....	8
2.5 Caracterização fenotípica.....	10
2.6 Atividade agrícola da cidade de Formiga, MG.....	13
2.7 A área selecionada para os experimentos de campo.....	15
2.8 A cultura do feijoeiro na Fazenda Ponte Alta.....	15
3 Material e métodos.....	16
3.1 Eficiência agrônômica de estirpes selecionadas de bactérias que nodulam feijoeiro e resposta a adubação com molibdênio.....	16
3.2 Diversidade das populações nativas.....	21
3.2.1 Captura de rizóbios nativos.....	21
3.2.2 Caracterização cultural dos isolados obtidos.....	21
3.2.3 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	22
3.3 Contagem e eficiência de populações nativas.....	23
3.4 Análises estatísticas.....	25
4. Resultados e discussão.....	26
4.1 Eficiência de estirpes selecionadas de bactérias que nodulam o feijoeiro.....	26



4.2 Efeito da aplicação foliar do Mo no feijão inoculado com a estirpe UFLA 02-100.....	33
4.3 Caracterização cultural dos isolados nativos.....	37
4.4 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos isolados obtidos.....	39
4.5 Ensaio na casa de vegetação: densidade e eficiência de populações de rizóbios nativos que nodularam o feijoeiro na área do experimento.....	44
5 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
ANEXOS.....	59

## RESUMO

NOGUEIRA, Cláudia de Oliveira Gonçalves. **Eficiência Agronômica de Rizóbios Seleccionados e diversidade das Populações Nativas que Nodulam o Feijoeiro-comum em Formiga- MG.** 84p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, MG\*.

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), além de ser um dos principais constituintes da dieta do brasileiro, é excelente fonte de proteínas e produto agrícola de grande importância econômico-social. A simbiose desta leguminosa com bactérias fixadoras de nitrogênio pode aumentar os níveis de produtividade, substituir fertilizantes nitrogenados e diminuir os custos de produção. O objetivo deste trabalho foi: 1) avaliar a eficiência agronômica de estirpes previamente seleccionadas em simbiose com feijoeiro no campo, comparadas à estirpe atualmente recomendada para produção do inoculante comercial para a cultura; 2) estudar a influência da aplicação foliar de Mo quando se inocula as sementes do feijoeiro com o rizóbio; 3) avaliar a diversidade, a densidade e a eficiência das populações nativas que nodulam o feijão na área do estudo. A diversidade fenotípica da população nativa foi avaliada de acordo com características culturais e por meio de análise de proteína total por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Verificou-se que a inoculação com as estirpes UFLA 02-100, UFLA 02-127 promoveu rendimento de grãos semelhante à testemunha que recebeu nitrogênio mineral e à estirpe tipo BR 322<sup>T</sup>. O Mo influenciou apenas a eficiência relativa da produção da matéria seca quando associado a estirpe UFLA 02-100. Com relação aos perfis protéicos, vinte dos cinquenta isolados das plantas que receberam N mineral (40%) se agruparam a 80% de similaridade com a estirpe tipo de *Rhizobium tropici* BR 322<sup>T</sup>, dezesseis dos cinquenta isolados de plantas que não receberam N mineral (32%) se agruparam a 80% de similaridade com a estirpe UFLA 02-86 e quinze dos cinquenta isolados de plantas que não receberam N mineral (12%) se agruparam a 80% de similaridade com a estirpe UFLA 02-68. Cerca de 50% dos isolados não foi similar a nenhuma espécie conhecida.

---

\*Comitê orientador: Fátima Maria de Sousa Moreira - UFLA (orientadora), Messias José Bastos de Andrade - UFLA (co-orientador).

## ABSTRACT

NOGUEIRA, Cláudia de Oliveira Gonçalves. Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native populations able to nodulate beans in Formiga, Minas Gerais. 2005. 84p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG\*.

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the major complement of the Brazilian diet, besides, it is an excellent source of protein and agricultural product of great social-economic importance. Symbiosis of beans and nitrogen fixing bacteria can increase yields replacing nitrogen fertilizers and decreasing yield costs. The aim of this work was: 1- evaluated the efficiency of strains previously selected in symbiosis with bean in the field, compared to the strain recommended to production of commercial inoculant; 2 - evaluated the foliar application of Mo when the seeds are inoculated with rhizobia; 3- evaluated the diversity of native populations nodulating beans in the experimental area. The phenotypic diversity of native population was evaluated according to cultural characteristics and through analysis of total protein by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). It was observed that inoculation with strains UFLA 02-100 and UFLA 02-127 increased yields similar to control that received mineral N and the BR 322<sup>T</sup>. The Mo influenced only the relative efficiency of plant dry matter when applied in inoculated plants whith strain UFLA 02-100. In relation to protein profiles, twenty from fifty isolates of plants which receive mineral N grouped at 80% of similarity with strain *Rhizobium tropici* BR 322<sup>T</sup>, sixteen from fifty isolates of plants which didn't receive N mineral grouped at 80% of similarity with strain UFLA 02-86 and fifteen from fifty isolates which didn't receive mineral N group themselves to 80% of similarity with strain UFLA 02-68. At most 50% of all isolates were not similar to any known species.

---

\*Advising Committee: Fátima Maria de Sousa Moreira – UFLA (Adviser), Messias José Bastos de Andrade - UFLA.

# 1 INTRODUÇÃO

O feijão é uma leguminosa que constitui importante fonte de proteínas na dieta do brasileiro, sendo responsável por 20% a 28% das proteínas ingeridas pela população (Chueire et al, 2003). Além disso, é um alimento rico em carboidrato e ferro.

Além de sua relevância na dieta diária do brasileiro, o feijão é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social no Brasil e na América Latina, devido ao fato de, em algumas regiões, ser cultivado em grandes áreas, necessitando de grande emprego de mão-de-obra durante o ciclo da cultura (Borém & Carneiro, 1998).

No Brasil, a cultura é caracterizada por dois sistemas de cultivo: a) lavouras menores que 100 ha, presentes na maioria dos sistemas de produção, principalmente naqueles vinculados à agricultura familiar que correspondem, em média, a um percentual médio de 70% da produção nacional e b) lavouras que ocupam áreas maiores que 100 ha, onde se observa o emprego de tecnologias especializadas e, conseqüentemente, alta produtividade. Nestas últimas, o feijão é alvo do uso intensivo de insumos agrícolas e de tecnologias como irrigação, que requerem um alto investimento financeiro e que explicam a alta produtividade. Para as menores, há necessidade de se desenvolver tecnologias de baixo custo financeiro, que sejam capazes de melhorar os índices de produtividade dos pequenos produtores, responsáveis pela maior parte da produção nacional de feijão (Straliotto, 2002).

A cultura do feijoeiro tem exigência elevada em nutrientes, principalmente nitrogênio e potássio, e os pequenos e médios produtores não dispõem de recursos para a utilização de fertilizantes, normalmente necessários em solos de baixa fertilidade, gerando uma cadeia de deficiências nutricionais,

que, associadas à suscetibilidade a pragas e doenças, vêm promovendo a estagnação da produção nos atuais patamares.

Os fertilizantes nitrogenados, além de terem um alto custo para o produtor (principalmente para o pequeno), podem ser problema para o ambiente, pois são facilmente perdidos por volatilização e por lixiviação, poluindo as águas.

O emprego da interação do feijão com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, conhecidas como rizóbios, pode ser uma alternativa para a substituição parcial ou total de fertilizantes nitrogenados, diminuindo os custos do cultivo, os danos ambientais (como poluição das águas) e o consumo de combustíveis fósseis para a fabricação de fertilizantes nitrogenados.

Por estas razões, trabalhos que visem viabilizar o emprego da inoculação de sementes de feijão são altamente oportunos e devem ser conduzidos em diversos ambientes e sistemas de produção de modo a contribuir para a construção de recomendações seguras a respeito dessa prática.

Os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar a eficiência de estirpes previamente selecionadas em simbiose com feijoeiro no campo, comparadas à estirpe atualmente recomendada para a produção do inoculante comercial para a cultura; 2) estudar a influência da aplicação foliar de Mo quando inoculam-se as sementes do feijoeiro com o rizóbio e, 3) avaliar a diversidade, densidade e eficiência das populações nativas que nodulam o feijão na área do estudo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fixação biológica de nitrogênio

Dentre as simbioses de fixadores de  $N_2$  com plantas, a que se estabelece com leguminosas se destaca por sua importância econômica, que está relacionada não só à ampla distribuição geográfica e utilização do hospedeiro, como também à maior eficiência do processo decorrente de uma parceria entre vegetal e microrganismos mais evoluída (Moreira & Siqueira, 2002).

O feijoeiro é uma leguminosa que pode se beneficiar da associação com bactérias diazotróficas, entretanto, a seleção natural em solos mais férteis, a utilização de variedades de ciclo curto e fatores climáticos têm subestimado o potencial de fixação do  $N_2$  dessa cultura. Contudo resultados experimentais têm mostrado que o feijão pode se beneficiar da simbiose, fixando  $N_2$  em quantidade suficiente para produzir até  $1.500\text{kg ha}^{-1}$  (Dobereiner & Duque, 1980).

O nitrogênio é um dos aparentes paradoxos da natureza. Ao mesmo tempo em que é um dos elementos mais abundantes na Terra, pois 81% do ar atmosférico são compostos de nitrogênio na forma de  $N_2$ , é também um dos mais escassos no solo e dos mais caros, seja para nutrição vegetal, humana ou animal.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) consiste, essencialmente, na transformação biológica do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ), sendo realizada principalmente por um número restrito de espécies microbianas, isoladamente ou em simbiose com plantas.

Estes microrganismos possuem uma enzima chamada nitrogenase, capaz de realizar a clivagem das moléculas de nitrogênio e combiná-las com hidrogênio, formando amônia. Alguns deles vivem de forma livre nos solos, como por exemplo, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*, *Clostridium*, outros na superfície de raízes, *Azospirillum* e um grupo que inclui *Rhizobium*, ao qual foi

dedicado este estudo, mesmo podendo viver de forma livre nos solos, quando em simbiose com plantas da família das leguminosas, fixa o nitrogênio. A partir de estudos dentro deste grupo de microrganismos, desenvolveu-se a tecnologia agrícola denominada inoculação de sementes, com o emprego de, um insumo moderno, o inoculante, utilizado para se obter boas produções com custos menores, possibilitando retorno financeiro ao produtor.

O nitrogênio é o nutriente absorvido em maior quantidade pelas plantas e as suas principais fontes são os íons amônio e nitrato, além do  $N_2$  atmosférico. Daí a importância da adubação nitrogenada e da fixação simbiótica desse elemento (Malavolta, 1980). O grande desafio que se apresenta para a cultura do feijão é conseguir um manejo adequado dessa simbiose, visando aumentar a eficiência do sistema de fixação biológica de nitrogênio.

O feijão pode utilizar, para sua nutrição nitrogenada, o N proveniente do solo e, ou o N proveniente da atmosfera, tendo sido constatado, inclusive, um efeito sinérgico entre a absorção do N mineral fornecido em doses baixas e a fixação do  $N_2$  (Hungria et al., 1985a). Esse efeito sinérgico pode ser devido à utilização do N mineral no período entre o esgotamento das reservas cotiledonares e o início da atividade dos nódulos ou, posteriormente, por meio da suplementação nutricional, pois plantas noduladas obtêm o benefício máximo dessas fontes de N em épocas diferentes do crescimento das plantas (Franco et al., 1979, Felix et al., 1981).

O feijoeiro é considerado uma leguminosa pouco eficiente na associação simbiótica com bactérias, devido a fatores bióticos e abióticos, afetando, principalmente, o estabelecimento desta associação em condições de campo. Entre estes fatores, os que mais interferem na associação são competição do rizóbio inoculado com estirpes nativas ineficientes estabelecidas no solo e condições ambientais, como temperatura e acidez do solo.

A eficiência simbiótica e o estudo da sobrevivência das bactérias inoculadas em competição com a microbiota do solo têm sido os principais pontos observados na seleção de estirpes, devido à grande variabilidade genética entre cultivares de feijão e estirpes de rizóbio na simbiose.

A espécie de rizóbio atualmente recomendada para a produção de inoculante comercial para a cultura do feijoeiro é a *Rhizobium tropici*, estirpes SEMIA 4080 (PRF 81) e CIAT 899 (BR 322), pela maior estabilidade genética e maior tolerância a estresses, como acidez do meio e temperaturas elevadas características de solos tropicais (Hungria et al., 1997; Chueire et al., 2003).

Além dos citados, vários outros fatores interferem na eficiência simbiótica das estirpes em condições de campo. Alguns são intrínsecos à bactéria, outros são extrínsecos, envolvendo outros microrganismos do solo, fatores determinados pela planta hospedeira e também fatores nutricionais do solo como deficiência de cálcio, de molibdênio, de magnésio e de fósforo e toxidez de alumínio e manganês (Straliotto, 2002). A fertilidade do solo, aliás, é fator de destaque na eficiência da associação simbiótica, pois para o pleno funcionamento da simbiose, o feijoeiro tem que estar em condições favoráveis de nutrição (Corrêa et al., 1989). A esse respeito, Ruschel & Reuszer (1973) citam que a influência dos micronutrientes é marcante, tanto no desenvolvimento da planta e da bactéria como também na efetivação da simbiose.

O Mo é um nutriente essencial ao crescimento e desenvolvimento de plantas, principalmente leguminosas (Malavolta, 1980), exercendo efeito direto e benéfico na fixação do N atmosférico. Diversos trabalhos demonstram boa resposta do feijoeiro ao Mo, principalmente à aplicação foliar (Alvarenga, 1995; Amane et al., 1994; Diniz., 1995; Rodrigues et al., 1995), que causa o aumento da atividade das enzimas nitrogenase e nitrato-redutase (Vieira, et al.1994),



resultando em maior eficiência da fixação simbiótica e da assimilação do nitrogênio mineral na planta.

Em estudos sobre doses e épocas de aplicação do molibdênio na cultura do feijão, Berger et al. (1996), concluíram que a dose ideal de Mo, em aplicação foliar, é de 80 a 90 g ha<sup>-1</sup> e que a época mais propícia para essa aplicação é de 14 a 28 dias após a emergência dos feijoeiros.

## 2.2 Diversidade e ocorrência de organismos fixadores de nitrogênio

Diazotróficos podem ser encontrados entre aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos e na maioria dos grupos filogenéticos representativos de Bacteria e de Archaea. Mesmo representando uma pequena parcela de procariotos, eles apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (Moreira & Siqueira, 2002).

Nas proteobactérias encontram-se, por exemplo: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Azospirillum* spp., *Beijerinckia* spp., *Acetobacter diazotrophicus*, *Derrxia* e *Azotobacter*. Entre Archaea estão presentes nos halófitos e nos metanogênicos. Entre metilotróficos, celulolíticos, bactérias envolvidas no ciclo do enxofre e até denitrificadores, que mediam justamente o processo inverso, também são encontrados organismos fixadores de N<sub>2</sub>. A alta diversidade desses organismos garante não só a resiliência do importante processo que mediam em um determinado ecossistema, como também a ocorrência deste nos mais diferentes tipos de "hábitats" terrestres (Moreira & Siqueira, 2002).

Algumas espécies de diazotróficos podem além de colonizar abundantemente a rizosfera, ocorrer endofiticamente, ou seja, invadir o córtex e colonizar tecidos internos em diversas espécies vegetais. Resultados mostram que essa ocorrência é mais generalizada em associações com gramíneas e monocotiledôneas (Moreira & Siqueira, 2002).

### 2.3 Importância da seleção de bactérias que nodulam feijoeiro

A seleção de novas estirpes eficientes na fixação biológica de nitrogênio atmosférico, quando associadas ao feijoeiro, vem sendo realizada por órgãos de pesquisa com o intuito de produzir inoculantes comerciais capazes de melhorar os níveis de produtividade. Entretanto, estirpes anteriormente selecionadas em casa de vegetação podem não alcançar o máximo da fixação quando testadas em campo onde existem fatores limitantes diversos como competição com estirpes nativas já estabelecidas do solo, acidez, temperatura e umidade do solo, e deficiências nutricionais (especialmente P e Mo), entre outros (Cassini & Franco, 1998).

Assim, seleção de estirpes eficientes para otimizar o potencial de fixação do N<sub>2</sub> em leguminosas de importância econômica como o feijão deve levar em conta, além da eficiência da estirpe, características como habilidade de competir com estirpes nativas por sítios de infecção, habilidade de sobreviver e se multiplicar no solo mesmo na ausência do hospedeiro, formação de nódulos sob larga faixa de temperatura e umidade nas raízes, dentre outras.

A captura de rizóbio do solo utilizando plantas-isca, como leucena, tem sido eficiente na recuperação de isolados com eficiência em feijoeiro. Estes isolados pertencem a dois grupos taxonômicos distintos: *R. tropici* (Mercante et al., 1998) e *Sinorhizobium* sp. (Straliotto et al., 1997; Straliotto et al., 1999). No entanto, Moreira et al. (1998), relatam nodulação de *Leucaena* com estirpes de *R. leguminosarum* isolados da região Amazônica, além de *R. tropici*, *Sinorhizobium medicae*, *Sinorhizobium* sp. e *Mesorhizobium huahuii* os quais vem sendo testados em condições de campo, visando à produção de inoculante mais eficiente para o feijoeiro (Souza et al., 2003).

O processo de seleção de estirpes para determinada espécie vegetal envolve, de modo geral, quatro estádios. No primeiro, é verificada, em câmara de crescimento (condições ótimas e controladas de temperatura, umidade,

luminosidade e nutrientes), a capacidade de nodular e fixar nitrogênio de um número elevado de estirpes, testadas separadamente, em tubos ou em sacos plásticos com solução nutritiva livre de nitrogênio na forma mineral, com ou sem ágar, em condições estéreis. No segundo estágio, estirpes selecionadas são testadas em mistura de areia, vermiculita esterilizada e solução nutritiva livre de nitrogênio, em vasos de Leonard, na casa de vegetação. Nos estádios seguintes, as estirpes selecionadas são testadas em vasos contendo solo em casa de vegetação e, depois, no campo. Estirpes que não obtiverem boa performance nos estádios iniciais de seleção são eliminadas, pois, se em condições controladas não estabelecem simbiose eficiente, também não o farão nas condições mais estressantes do campo (Moreira & Siqueira, 2002).

A seleção prévia de organismos fixadores que mostram eficiência em laboratório e em casa de vegetação, nem sempre é garantia do seu máximo potencial no campo e isso pode ser devido a fatores como inadaptação a condições ambientais do solo e baixa competitividade, entre outros.

Em alguns ambientes, especialmente de campo nativo, há predominância de solos com pH baixo, associado a níveis tóxicos de alumínio, fatores que limitam em muito a nodulação da leguminosa e, conseqüentemente, a fixação do N<sub>2</sub> causando efeito direto sobre a bactéria, limitando também o crescimento da planta (Dobereiner, 1966).

A variabilidade da tolerância ou suscetibilidade de estirpes de rizóbio a condições de estresse é bem maior do que a da leguminosa hospedeira (Brose, 1994).

#### **2.4 Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro**

Com relação à classificação taxonômica do rizóbio do feijoeiro, até 1984 estava definida uma única espécie, *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* (Jordan, 1984). Desde então, com o desenvolvimento de técnicas de biologia

molecular, foi possível constatar grande diversidade genética entre os microssimbiontes, permitindo assim a definição de novas espécies (Chueire et al., 2003).

Diversas espécies de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro são descritas atualmente: *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* (Jordan, 1984), *Rhizobium tropici* (Martinez- Romero et al., 1991), *Rhizobium etli* bv *phaseoli* (Segovia et al., 1993), *Rhizobium giardini* bvs *giardinnii* e *phaseoli* (Amarger et al., 1997), *Rhizobium gallicum* e *R. phaseoli* (Amarger et al., 1997), *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *fredii* (Scholla & Elkan., 1984) *Rhizobium* (*Mesorhizobium*) *loti* (Jordan 1984), *Rhizobium* (*Mesorhizobium*) *huahuii* (Chen et al., 1991), *Azorhizobium* (Gonçalves & Moreira, 2004) e espécies de *Burkholderia* (Moreira et al., 2002). Além destas espécies, Stralio et al. (1997) recuperaram, de nódulos de feijoeiro, em solos tropicais brasileiros, um considerável número de isolados classificados como *Sinorhizobium* sp.

No Brasil, três espécies distintas de rizóbio são de grande importância ecológica no que se refere à simbiose com o feijoeiro, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* e *R. tropici* (Stralio et al., 1999). Estudos das características genéticas destas espécies mostram que elas estão sujeitas a elevado grau de instabilidade genética, podendo, com o tempo, perder a capacidade de fixar nitrogênio no feijoeiro. Entretanto, a espécie *R. tropici* capaz de nodular leucena, feijoeiro e diversas leguminosas, mostrou maior estabilidade nas suas características culturais e de nodulação, após longos períodos de estocagem (Souza et al., 2003).

Em estudos sobre a diversidade de rizóbios em área de mineração de bauxita reabilitada, tendo por base características culturais e o feijoeiro como planta-isca, Melloni (2001) verificou que aproximadamente 80% dos isolados pertenciam ao grupo formado pelas estirpes de referência dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, e que alguns isolados pertenciam a grupos formados por

estirpes de referência dos gêneros *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*.

Em estudos da diversidade de populações nativas que nodulam feijão em Perdões, Minas Gerais (Soares, 2004) e na região Centro-Oeste de Minas Gerais (Vale, 2005), observou-se que, com base no perfil protéico total, a maioria dos isolados da população nativa foi classificada, a 80% de similaridade, como *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*.

## 2.5 Caracterização fenotípica

A caracterização de uma bactéria envolve a descrição qualitativa das muitas propriedades relativas á morfologia, cultivo, nutrição, bioquímica, metabolismo, ácidos nucléicos, patogenicidade e ecologia, os quais são pré-requisitos para a identificação e base da sistemática desse grupo de organismos. Não é possível a caracterização de bactérias com base apenas em caracteres morfofisiológicos. Existem várias técnicas relevantes de caracterização de bactérias, podendo ser ressaltadas as técnicas fenotípicas que incluem as baseadas na expressão do DNA, ou seja, técnicas morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que coletam informações sobre composição química total ou parcial das células para classificar a bactéria. Compreendem análise de ácidos graxos, análise de proteínas celulares totais ou de proteínas de parede celular, eletroforese de enzimas, espectrometria de massa por pirólise (PyMS), além das análises fenotípicas clássicas que dão informações sobre a célula e a colônia. Dentre estas, a revelação do perfil eletroforético de proteínas totais para identificação de espécies bacterianas tem fornecido informações importantes nos estudos de caracterização e taxonomia.

Dentre as várias técnicas para a caracterização de proteínas (Hames & Reckwod, 1990; Alfenas et al., 1991; Patel, 1994), a técnica do fracionamento de proteínas desnaturadas em géis verticais de SDS-PAGE é a preferida, dada a

rapidez, alta resolução e facilidade de uso. O objetivo desta técnica é a separação de proteínas presentes em misturas complexas.

A eletroforese evidencia proteínas e ácidos nucléicos de maneira precisa e valiosa para estudos taxonômicos, filogenéticos, fisiológicos e genéticos em vegetais, animais, microrganismos e partículas virais (Alfenas et al., 1991).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de proteínas totais e proteínas solúveis de bactérias produz padrões de bandas que podem ser considerados como marca altamente específica dentro de diferentes taxa de bactérias (“impressões digitais”). Esta técnica consiste inicialmente de uma desnaturação por aquecimento da amostra na presença de um detergente aniônico, duodecil sulfato de sódio (SDS) e um agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol. O SDS se liga às regiões hidrofóbicas de proteínas para separá-las em suas unidades componentes, fazendo com que estas percam seu efeito de carga específica, separando-se devido às diferenças em seu peso molecular.

A elevada resolução das bandas é obtida pelo uso de um sistema descontínuo de géis, o qual possui uma camada de gel de concentração e outra para separação das bandas (gel de corrida). Esses dois géis podem diferir na concentração de sais, pH, concentração de acrilamida ou combinações desses fatores (Alfenas & Brune, 1998). A eletroforese está entre as técnicas que permitem melhor resolução de bandas, tornando possível a avaliação em nível qualitativo (ausência ou presença) e quantitativo, por meio da diferença de concentração de polipeptídeos existentes em uma amostra (Carraro, 1990).

Após a separação física no gel, as proteínas são detectadas por meio de procedimentos de coloração apropriados, formando padrões de bandas. Proteínas com massas diferindo em cerca de 25g/mol (10 aminoácidos diferentes) podem gerar padrões distintos e serem distinguidas (Westermeier et al., 1993).

É necessário que sejam padronizadas as condições de cultivo das bactérias, e também dos procedimentos metodológicos, mas, apesar disso, a

eletroforese de proteínas é vantajosa, pois a estabilidade do padrão eletroforético e a comparação dos perfis fornecem uma medida segura da relação taxonômica de amostras analisadas.

Vários estudos têm mostrado o potencial da eletroforese de proteína na caracterização de diferentes isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (Moreira et al., 1993; De Lajudie et al., 1994; Dupuy et al., 1994; Pereira, 2000) e fungos ectomicorrízicos dos gêneros *Phisolithus* (Burgess et al., 1995; Souza, 2000) e *Suillus* (Zhu et al., 1998; Sem, 1990; Keller, 1992), entre outros.

Resultados baseados em eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) demonstram alta diversidade entre 171 isolados de rizóbios, os quais representaram uma nova fonte de espécies e gêneros. Entre os 23 padrões eletroforéticos de proteínas obtidos, somente 9 compreendiam espécies de rizóbio previamente conhecidas (Moreira et al., 1993). Posteriormente duas novas espécies foram descritas com base nestes grupos, *Mesorhizobium plurifarium* (De Lajudie et al., 1998) e *Azorhizobium johanense* (Moreira et al., 2000).

A eletroforese em gel de poliacrilamida tem sido usada na descrição de novas espécies de rizóbio, como, por exemplo, *Mesorhizobium chacoense* (Velázquez et al., 2001), *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus et al., 1988) e *Rhizobium yanglingense* (Tan et al., 2001).

Outros autores fizeram uso desta técnica para caracterização fenotípica de microrganismos como *Campilobacter* (Vandamme et al., 1990; Aydin et al., 2001), *Aspergillus* (Rath, 2001), *Enterococcus* (Andrigheto et al., 2001) e *Acinetobacter* (Alexander et al., 1984), entre outros.

## 2.6 Atividade Agrícola da Cidade de Formiga

O município de Formiga está inserido na bacia sedimentar do super grupo do São Francisco (Craton do São Francisco), localizado na região do Campo das Vertentes, Centro Oeste de Minas Gerais, região correspondente ao alto São Francisco e áreas vizinhas (Alves et al., 1998). A região possui um clima quente e úmido, com algumas variações na temperatura. Cerrado e campo cerrado são os tipos principais de vegetação. Em grande parte da região, os solos são classificados como regulares para agricultura, necessitando, entretanto, da utilização de tecnologias modernas para melhorar a produtividade (Alves, 1998).

Dados do último Censo Agropecuário (1996) relatam 2.045 estabelecimentos rurais, com tamanho médio de 41,6ha., caracterizados como minifúndios, representando 79,8% do total das propriedades rurais, comportando 7.300 habitantes, somando 11% da população do município. (SEBRAE, 2001). O cultivo do feijoeiro é praticado em todas as propriedades, sendo, às vezes, a principal fonte de proteína destes agricultores. A produtividade é muito baixa e o volume suficiente somente para seu próprio consumo ou para comercialização na feira-livre no município (EMATER, comunicação pessoal).

A área plantada na safra das águas de 2003 foi de 1.000 ha<sup>-1</sup>, produção de 600 toneladas e uma produtividade de 600Kg ha<sup>-1</sup>. Na segunda safra, o plantio se deu numa área de 800ha<sup>-1</sup>, com produção de 480 toneladas e produtividade de 600kg ha<sup>-1</sup>. Já na safra de inverno, a área foi sensivelmente reduzida para 150ha<sup>-1</sup>, resultando numa produção de 225 toneladas e produtividade de 1.500 kg ha<sup>-1</sup>, perfazendo uma área total de 1950 ha<sup>-1</sup>, produção de 1.305 toneladas e produtividade média de 669kg ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2004).

Entre os fatores responsáveis pela baixa produtividade da cultura do feijoeiro, no município, como também em outros municípios e regiões onde prevalece a agricultura familiar, destacam-se a baixa fertilidade do solo, a não utilização de sementes certificadas, o manejo inadequado, o excesso ou mesmo a



falta de água, a falta de infra-estrutura dos pequenos produtores, a susceptibilidade da planta a doenças e o não emprego de tecnologias, como a inoculação, que podem possibilitar maior rendimento e produtividade a custos menores.

Além da deficiência e toxidez nutricional, os solos da região (cerrado), apresentam baixa capacidade de retenção de água e baixa atividade dos microrganismos. No entanto, com a correção da acidez, é possível transformá-los em solos férteis, capazes de proporcionar produtividades mais elevadas. Lavouras implantadas com sementes de baixa qualidade, em solos com manejo inadequado e sem controle de condições ambientais, mesmo que recebam doses expressivas de fertilizantes, não conseguem atingir maiores rendimentos.

Com aspecto bem diferenciado, existem na região, poucos produtores que, por possuírem recursos financeiros, conseguem atingir níveis mais altos de produtividade, cerca de 2.800 kg ha<sup>-1</sup> (EMATER-Formiga), com uso de tecnologias de irrigação, calcário e fertilizante, aos quais os pequenos produtores não têm acesso por falta de recursos financeiros.

A adubação nitrogenada inadequada é um fator que, muitas vezes, determina o insucesso no cultivo do feijoeiro. Enquanto alguns produtores usam doses excessivas de N, outros aplicam quantidades insuficientes, limitando de qualquer forma a produtividade da lavoura.

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico pode contribuir para o aumento do rendimento da cultura do feijoeiro, diminuir ou substituir o uso de fertilizantes nitrogenados e, com isso, reduzir os custos de produção e o possível impacto ambiental proporcionado pelo uso excessivo de fertilizantes químicos. Na região, entretanto, os produtores não utilizam a tecnologia da inoculação e não conhecem e os benefícios advindos dessa prática. Portanto, a condução de experimentos em campo, em área de propriedade da região de Formiga, poderia contribuir para a difusão da prática entre os agricultores.

## **2.7 A área selecionada para os experimentos de campo**

A Fazenda Ponte Alta, de propriedade do senhor Paulo Rodrigues Nunes, fica situada na zona rural de Formiga, ocupa uma área de 900 ha e sua atividade de maior destaque é a pecuária leiteira. Para esse fim é reservada uma área de 700 ha aproximadamente.

As lavouras são, normalmente, o milho, o feijão e o sorgo, este mais esporadicamente. O milho é plantado em áreas que podem chegar até a 150ha e o feijão, em áreas de no máximo 30ha, ficando o restante para pastagens.

A área usada no ensaio serviu como pastagem durante longo período, tendo nos últimos cinco anos, sido usada para plantio de milho, sem que fossem feitas rotações com outras culturas. Nessa propriedade, nunca havia sido utilizada a tecnologia da inoculação.

## **2.8 A cultura do feijoeiro na Fazenda Ponte Alta**

Durante muitos anos a cultura, do feijoeiro foi deixada para segundo plano, sendo utilizada somente para aproveitamento de áreas que estivessem ociosas, e, segundo o produtor, o preço era desencorajador.

A Fazenda Ponte Alta tem características diferenciadas, por estar situada em região onde há exploração de turismo. O lago de Furnas contorna grande parte da propriedade, sendo, dessa maneira, muito visitada, tanto por produtores da região como por produtores de outras regiões, além de turistas de várias partes do estado de Minas Gerais e também de outros estados, como São Paulo. Este fato contribuiu, de certa maneira, para a difusão da tecnologia de inoculação, pois a área experimental foi visitada nos meses de agosto a novembro de 2004, durante a condução dos ensaios no campo.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Eficiência agrônômica de estirpes selecionadas de bactérias que nodulam o feijoeiro e resposta a adubação com molibdênio.**

As estirpes de rizóbio usadas foram obtidas em diferentes sistemas de uso de terra (SUT), no estado de Rondônia, demonstrando alta eficiência em vasos de Leonard (Pereira, 2000). Posteriormente, experimentos de campo comprovaram a alta eficiência agrônômica destas estirpes (Soares, 2004) em solos da região de Perdões, no estado de Minas Gerais.

As características culturais em placas com meio YMA das estirpes de rizóbio, usadas no ensaio, encontram-se na Tabela 1.

Foram conduzidos dois ensaios de campo em área da Fazenda Ponte Alta, entre os meses de julho a novembro de 2004, em um Argissolo Vermelho Distrófico típico (EMBRAPA, 2000), em área onde ainda não havia sido plantado feijão com utilização de inoculante. Os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE). Resultados da análise química do solo amostrado encontram-se na Tabela 2.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com seis repetições, nos dois ensaios.

TABELA 1 Origem e avaliação morfofisiológica das estirpes de rizóbio usadas nos ensaios 1 e 2 de campo em Formiga-MG

Estirpe	UF	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
UFLA 02-100	RO	3	2mm	neutro	circular	lisa	abundante	gomosa	branca	não
BR322	RO	3	3mm	ácido	circular	lisa	abundante	gomosa	amarela	sim
UFLA02 86	RO	3	2mm	neutro	circular	lisa	abundante	gomosa	branca	não
UFLA 02-127	RO	3	2mm	neutro	circular	lisa	abundante	gomosa	branca	não

R- Manifestação do crescimento (colônias isoladas): R rápida (três dias), I intermediária (quatro a cinco dias), L lenta (seis a nove dias), ML muito lenta (acima de 10 dias)

1-Tempo pra aparecimento de colônias isoladas (dias)

2- Diâmetro da colônia, em mm

3- Alteração do pH no meio YMA, com indicador Azul de Bromotimol

4- Forma da colônia: circular, puntiforme, irregular.

5- Superfície da colônia: lisa, rugosa, papilada.

6- Produção de muco; escassa, pouca, moderada, abundante.

7- Consistência da massa de crescimento: seca, aquosa, gomosa, viscosa, butírica.

8- Cromogênese da colônia em meio YMA: incolor, branca, amarela, rosa, creme.

9- Absorção de indicador/corante

TABELA 2 Características químicas da amostra de material do solo da área experimental antes da adubação. Formiga, MG, 2004

Características	Unidade	Valor
pH em H <sub>2</sub> O (1:2,5)		5,6
P (fósforo Mehlich 1)	mg/dm <sup>3</sup>	6,5
K (Potássio Mehlich 1)	mg/dm <sup>3</sup>	160,0
Ca	cmol $\delta$ /dm <sup>3</sup>	2,8
Mg	cmol $\delta$ /dm <sup>3</sup>	1,5
Al	cmol $\delta$ /dm <sup>3</sup>	0,0
H + Al	cmol $\delta$ /dm <sup>3</sup>	3,6
S.B.	cmol $\delta$ /dm <sup>3</sup>	4,7
t	cmol $\delta$ /dm <sup>3</sup>	4,7
T	cmol $\delta$ /dm <sup>3</sup>	8,3
m	%	0
V	%	56,7
Matéria Orgânica	dag/Kg	2,2

Análises realizadas nos laboratórios do Departamento de Ciências do Solo da UFLA.

O ensaio 1 teve seis tratamentos: três isolados de rizóbio (UFLA O2-100, UFLA O2-127, UFLA O2-86) e a estirpe *Rhizobium tropici* (CIAT 899/ BR 322<sup>T</sup>, atualmente recomendada para produção a de inoculantes comerciais para feijão) uma testemunha sem inoculação e com nitrogênio mineral (TN) fonte uréia, na dosagem de 80 kg ha<sup>-1</sup> de N (40kg na semeadura e 40kg aos vinte dias após a emergência) e uma testemunha sem inoculação e sem N mineral (T).

Todos os tratamentos, incluindo as testemunhas, receberam adubação fosfatada e potássica na dose de 90kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 20kg ha<sup>-1</sup> de KCL usando como fontes o superfosfato triplo e cloreto de potássio, incorporados a 6cm de profundidade.

O inoculante foi preparado com turfa esterilizada em autoclave, na proporção 3:1 de turfa e culturas em meio YMA (Vincent, 1970) semi-sólido na fase log (cinco dias após crescimento), a inoculação foi realizada na proporção de 500g de inoculante para cada 50kg de sementes. A cultivar utilizada foi a cv. Pérola.

O ensaio 2 teve quatro tratamentos: inoculação das sementes de feijão com rizóbio (isolado UFLA 02-100), inoculação das sementes mais aplicação foliar de molibdênio (80g ha<sup>-1</sup> de Mo fonte molibdato de amônio, aos 25 dias após emergência) de acordo com Berger et al. (1996), uma testemunha nitrogenada (TcN) (fonte uréia, 8Kg ha<sup>-1</sup>, parcelados em duas vezes, sendo 40kg na semeadura e 40kg com vinte dias após emergência), e uma testemunha sem N mineral e sem inoculação (TsN).

Neste ensaio, as adubações fosfatada e potássica foram as mesmas do ensaio 1, e a cultivar de feijoeiro utilizada foi a Pérola.

O solo da área experimental foi preparado com uma aração, uma gradagem e sulcamento para demarcação das linhas. A semeadura de ambos os experimentos foi feita em 31 de julho de 2004, de forma manual, após se proceder à inoculação das sementes com seus respectivos tratamentos, numa densidade de 17 sementes por metro linear de sulco.

As parcelas foram constituídas de doze linhas de 6,0 m de comprimento, espaçadas em 0,5m, totalizando 36m<sup>2</sup> de área total e 15m<sup>2</sup> de área útil (referente às seis linhas centrais, destinadas à colheita de grãos, dispensando-se meio metro no início e no final de cada linha).

Devido às baixas temperaturas registradas no período, houve atraso considerável na germinação das sementes e, conseqüentemente, na emergência das plantas, que também não se mostrou regular.

Durante todo o ciclo da cultura, o ensaio foi mantido livre de plantas daninhas, com a realização de capinas manuais. Foi ainda realizado o controle

preventivo de doenças comuns à cultura com aplicações dos fungicidas Mertin 400, à base de trifenil hidróxido de estanho, 325-1000ml/ha (130-400 g i.a. /ha), pulverizado com equipamento motorizado. A primeira aplicação foi aos 20 e 25 dias após germinação (DAG). Também utilizou-se amistar, a base de metil 2-[2-[6-(2- cianofenoxi) – pirimidim-4-iloxi)fenil]-3-metoxiacrilate Azoxytrobim na dosagem de 80 a 120 g/há, 30 dias após emergência (DAE), pulverizado com equipamento motorizado.

Na época do florescimento, foram coletadas dez plantas de cada parcela, na terceira e nona linhas de cada parcela, para avaliação da nodulação (contagem e matéria seca de nódulos) e parte aérea (matéria seca, teor e acúmulo de nitrogênio e eficiência relativa).

A colheita dos ensaios foi feita em 15 de novembro de 2004, avaliando-se o rendimento dos grãos (após correção de umidade para 13%) e o teor de N nestes grãos.

O nitrogênio total, tanto na matéria seca da parte aérea das plantas como nos grãos, foi calculado pelo método semi-microkjedahl, de acordo com Sarruge & Haag (1979).

O nitrogênio acumulado na parte aérea foi calculado multiplicando-se o peso da matéria seca da parte aérea pela percentagem de N e dividindo-se por 100.

Para o cálculo da eficiência relativa de cada tratamento, foi usada a expressão:

$$Efr = \frac{MSPA \text{ inoculada}}{MSPA \text{ com N}} \times 100$$

Os dados foram submetidos à análise de variância, empregando-se o sistema de análise estatística SISVAR, versão 4.0 (Ferreira, 2000). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste Scott-Knott.

## **3.2 Diversidade das populações nativas**

### **3.2.1 Captura de rizóbios nativos**

Para a captura dos rizóbios nativos foram utilizados os nódulos das raízes dos feijoeiros das parcelas que não receberam inoculação, testemunhas com e sem N mineral. Destas “plantas iscas,” foram coletados 100 nódulos, no total, sendo cinquenta de cada tratamento. Dois nódulos de cada planta-isca foram utilizados para o isolamento de rizóbios em placas contendo meio YMA.

Os nódulos utilizados foram primeiramente imersos em álcool etílico 95%, por 30 segundos, para que fosse quebrada a tensão superficial e, posteriormente, imersos em  $H_2O_2$  por 1 minuto para que fosse esterilizada a superfície do nódulo. Após este procedimento, os nódulos foram lavados seis vezes em água esterilizada para retirada do  $H_2O_2$  depois, foram esmagados com pinça esterilizada, em placas contendo meio de cultura YMA com azul de bromotimol e o material interno foi espalhado para obtenção de colônias isoladas.


### **3.2.2 Caracterização cultural dos isolados obtidos**

Após a obtenção de colônias isoladas e puras nas placas, estas foram repicadas para crescimento em placas contendo meio de cultura YMA, para caracterização fenotípica, cultural e por padrão de proteína e armazenamento em deep freezer, a  $-80^{\circ}C$ .

Para a caracterização dos isolados foram avaliadas as seguintes características culturais:

1. tempo de crescimento: muito rápido (1 dia,) rápido (2 a 3 dias), intermediário (4 a 5 dias), lento (6 a 10 dias) e muito lento (mais que 10 dias).
2. Diâmetro médio das colônias:  $<1mm$ , 1 a 2 mm ou  $>2mm$ .



- 
3. Modificação do pH do meio YMA com o indicador azul de bromotimol: ácido (amarelo), alcalino (azul) ou neutro (sem alteração de cor).
  4. Forma da colônia : puntiforme, circular ou irregular
  5. Superfície da colônia: lisa, rugosa ou papilada.
  6. Produção de muco: escassa, pouca, moderada ou abundante.
  7. Consistência: seca, aquosa, gomosa, viscosa ou butírica
  8. Coloração das colônias em meio azul de bromotimol: amarela, creme, incolor, branca ou rosa.
  9. Absorção do indicador/corante: sim ou não.

Após a caracterização, os isolados foram conservados em meio YMA líquido (Anexo 1), em frascos e em meio YMA sólido (Anexo 1), em tubos, devidamente identificados, e encaminhados à coleção da UFLA, permanecendo em “deep freezer” a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE).

As estirpes UFLA 02-100, UFLA 02-127e UFLA 02-86 (usadas no ensaio 1 de campo), os isolados dos ensaios de campo, a estirpe recomendada para a produção de inoculante comercial (BR 322/ CIAT 899) e as estirpes tipo – BR 5410<sup>T</sup> (*Azorhizobium caulinodans*), BR 7801<sup>T</sup> (*Mezorhizobium loti*), BR 7411<sup>T</sup> (*Sinorhizobium meliloti*), BR 10026<sup>T</sup> (*Rhizobium etli*), BR 29 (*Bradyrhizobium elkanii*), BR111<sup>T</sup> (*Bradyrhizobium japonicum*), após terem sido crescidas em placas, foram submetidas a dois cultivos sucessivos em meio TY sólido, para a produção de células para análise de proteína.

As estirpes isoladas foram inoculadas em meio TY líquido (Anexo 1), a  $28^{\circ}\text{C}$ , sob agitação constante a 120 rpm durante 10 minutos. O crescimento se deu por agitação constante a 120 rpm, por 4 dias a  $28^{\circ}\text{C}$ . Após o crescimento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, durante 10 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Descartou-se o sobrenadante, lavaram-se as células por meio de ressuspensão do pellet em 30ml de tampão NaPBS, (Anexo 1), quando foi novamente centrifugado. Esse processo foi repetido três vezes.

Em tubos Eppendorf, foram colocados 70mg de células de cada isolado, adicionando-se 0,9ml do tampão da amostra (TTA) (Anexo 1) e 0,1 ml de SDS a 20% para solubilização das proteínas. Misturou-se num agitador tipo Vórtex e aqueceu-se a mistura em banho-maria a 95°C, por 10 minutos (Anexo 1).

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 *rpm* por 10 minutos, à temperatura de 4°C, sendo, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pelo método Laemmli (1970), com modificações descritas por Jackman (1985). Para eletroforese utilizou-se um gel de sistema descontínuo, sendo 12% para o gel separador e 5% para o gel de concentração (Anexo 1). Foram aplicadas ao gel 30 microlitros de cada amostra.

Uma matriz binária dos dados originais foi construída, compreendendo 15 cadeias polipeptídicas (bandas) representativas dos perfis gerados, os quais foram comparados às estirpes de referência e às estirpes selecionadas para o teste de eficiência no campo.

### **3.3 Contagem das populações nativas**

Para contagem das estirpes nativas do solo, foram usados frascos de vidro com capacidade para conter quantidade suficiente de solução nutritiva de Jensen (Anexo 1) exigida pelas plantas, 300 a 400 ml e papel germitest.

Foram coletadas amostras do solo de área adjacente ao local dos ensaios, reunidas em uma única amostra composta, a partir da qual foram realizadas 6 diluições seriadas decimais,  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .

Sementes de feijão foram colocadas em placas anteriormente autoclavadas e, após a germinação, foram transferidas para frascos autoclavados contendo a solução nutritiva de Jensen. Os frascos tinham diâmetro de 7cm e

altura de 17cm. O papel germitest utilizado como suporte tinha em torno de 5cm a mais que a altura do frasco e também foi cortado mais largo que o diâmetro do frasco. A folha de papel dobrada formou duas abas que foram fixadas às bordas do frasco com auxílio de barbante de algodão.

Um canal foi feito na parte superior do papel para que as sementes germinadas pudessem ser colocadas ali sem risco de caírem. A solução nutritiva foi colocada nos frascos, o papel germiteste foi inserido já dobrado e o frasco foi tampado com papel alumínio devidamente fixado ao frasco. Os frascos foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1,0 atmosferas, durante 30 minutos.

Quando ocorreu o devido resfriamento, fez-se pequeno orifício no papel alumínio, na mesma direção do canal do papel germiteste, onde foi colocada a semente germinada.

Em cada frasco foi colocada uma semente germinada. A inoculação ocorreu no sétimo dia após a colocação das sementes germinadas nos frascos. A diluição seriada decimal foi preparada no momento do uso e a inoculação com seis diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) consistiu na adição de alíquotas de 1,0ml de cada diluição por frasco, com três repetições. Para efeito de comparação, foram feitos tratamentos adicionais: uma testemunha nitrogenada (TcN) na dose de 1mL da solução de 40M de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e 1 testemunha sem adição de nitrogênio (TsN) para que pudesse ser avaliada a eficiência relativa dos tratamentos. Cada tratamento (oito no total) teve três repetições.

Os frascos foram envolvidos com papel opaco para evitar a incidência de luz nas raízes e dispostos sobre os balcões da casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFLA. A avaliação foi feita 25 dias após inoculação, para a determinação da nodulação (contagem e matéria seca) e matéria seca da parte aérea, isolando-se também bactérias nativas presentes nos nódulos.

Para a estimativa do número mais provável (NMP) de células de rizóbios considerou-se a infectibilidade e a formação de nódulos como positivo ao teste e a ausência de nodulação como negativo ao mesmo, em cada diluição , empregando o programa “Most Probable Number Estimate” (MPNES) (Womer et al., 1988).

### **3.4 Análises estatísticas**

Os dados do ensaio de casa de vegetação foram submetidos à análise de variância empregando-se o sistema de análise estatística SISVAR, versão 4.0 (Ferreira, 2000). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os perfis protéicos das estirpes e dos isolados obtidos foram agrupados utilizando-se o método UPGMA (“average linkage clustering”), baseado na distancia intergrupo, que é a média das distâncias pareadas dos membros de dois grupos e representados por um dendrograma de similaridade (NTSYS-pc, versão 2.01, Slice et al., 1994).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Eficiência agronômica de estirpes selecionadas de bactérias que nodulam o feijoeiro

A análise de variância das características de crescimento e da nodulação do feijoeiro (Tabela 3) revelou que apenas a eficiência relativa (Efr) foi significativamente influenciada pelos tratamentos. Com base nos valores do coeficiente de variação (CV), observa-se que a matéria seca de nódulos (MSN) foi estimada com menor precisão experimental que as demais.

TABELA 3 Resumo da análise de variância (quadrados médios) do número de nódulos por planta (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (Efr %), nitrogênio na parte aérea (NPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA) do feijoeiro cv. Pérola no ensaio 1. Formiga, MG.

FV	GL	Quadrados médios					
		NN	MSN	MSPA	Efr	NPA	ANPA
Tratamento	5	5,14	0,71	1155,08	725,10	0,47	2,81
Bloco	5	19,11	0,15	161,23	200,23	0,38	1,15
Erro	25	11,15	0,50	604,00	260,70	0,24	0,83
CV(%)		19,52	32,60	23,22	20,22	14,7	25,63

Os valores médios das características avaliadas são apresentados na Tabela 4, em função dos tratamentos empregados. O número de nódulos (NN) variou de 16,48 a 18,95 nódulos por planta, mostrando, portanto pequena variação (Tabela 4) e evidenciando que todas as estirpes empregadas mostraram-se equivalentes e não diferiram das testemunhas (com e sem N mineral).

A nodulação verificada na testemunha sem N mineral indica que o N mineral adicionado à testemunha nitrogenada (TN) ( $40\text{kg ha}^{-1}$  na semeadura e  $40\text{kg ha}^{-1}$  em cobertura) não foi suficiente para reduzir a nodulação (Tabela 4).

Os valores da matéria seca dos nódulos (MSN) foram, de certa maneira, proporcionais aos do número de nódulos (NN), confirmando que o desempenho das estirpes selecionadas (UFLA 02-100, UFLA 02-127 e UFLA 02-86) foi equivalente ao da estirpe referência BR322 e das estirpes nativas (na testemunha sem N). Da mesma forma, a testemunha com N mineral não apresentou redução significativa no peso seco dos nódulos.

As fotos da figura 1 (A e B) mostram uma visão geral dos ensaios 1 e 2, aos 25 dias após germinação época da aplicação da uréia em cobertura no ensaio 1 e aplicação foliar de Mo no ensaio 2.



FIGURA 1 A- ensaio 1 (25 dias após germinação)



FIGURA 1 B- ensaio 2 (25 dias após germinação)

TABELA 4 Valores médios do número de nódulos por planta (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (Efr%), teor de nitrogênio na parte aérea (NPA), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), em função das fontes de nitrogênio sobre o feijoeiro, cv. Pérola, no ensaio 1. FormigaMG

Fontes de N	NN **	MSN (mg pl <sup>-1</sup> )	MSPA (mg pl <sup>-1</sup> )	Efr (%) (%)	NPA (%)	ANPA (mg pl <sup>-1</sup> )
UFLA02-100	16,80	2,20	93,91	72,30b	3,27	3,04b
UFLA02-127	16,84	2,46	93,23	71,27b	3,36	3,21b
UFLA 02-86	18,95	2,66	109,20	74,67b	2,91	3,07b
BR 322	17,01	2,02	110,26	84,89b	3,38	3,80b
TcN	16,48	1,70	129,88	100,00a*	3,70	4,85*a
TsN	16,53	2,00	98,60	75,91b	3,63	3,61b
Médias	17,01	2,16	105,84	81,50	3,38	3,60

Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo segundo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

\* Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade

\*\*Dados transformados  $\sqrt{x+1}$

Com relação à matéria seca da parte aérea, verifica-se, na Tabela 4, que os valores observados nos tratamentos inoculados e testemunha sem N mineral variaram de 93,23 a 110,26, mostrando pequena variação. O único tratamento que apresentou certa tendência em proporcionar maior crescimento da parte aérea foi a testemunha com N mineral, embora sem diferença significativa em relação aos demais tratamentos. Como a testemunha sem N mineral apresentou crescimento da parte aérea que não diferiu dos demais tratamentos, depreende-se que a população nativa de rizóbios foi tão eficiente quanto as estirpes inoculadas. Este fato é confirmado pelos valores da eficiência relativa, já que, à exceção da testemunha com N mineral (Efr=100%), todos os demais tratamentos



apresentaram eficiência entre 71,27% e 84,89%. Os dados relativos ao teor de N na parte aérea da planta não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos. O nitrogênio acumulado na parte aérea diferiu entre os tratamentos ficando a testemunha nitrogenada (TN) num grupo diferente dos demais tratamentos.

Um resumo da análise de variância das características agronômicas do feijoeiro (estande inicial e final e rendimento de grãos) e do teor e acúmulo de N nos grãos são apresentado na Tabela 5.

TABELA 5 Resumo da análise de variância (quadrados médios) dos estandes inicial (Ei) e final (Ef), rendimento de grãos (RG), teor (NG) e acúmulo de N nos grãos (ANG) do feijoeiro cv. Pérola, no ensaio 1 Formiga MG.

FV	GL	Quadrados Médios				
		Ei	Ef	RG	NG	ANG
Tratamento	5	5564	2660	863162	0,26	760,71
Blocos	5	10049	7810	410249	0,05	202,68
Erro	25	5598	3674	352564	0,10	563,83
CV(%)		15,39	15,75	13,03	10,39	16,18

O estande inicial variou de 308 a 362 mil plantas por hectare, resultando em estandes finais da ordem de 246 a 274 mil plantas por hectare, com média geral de 250 mil plantas por hectare (Tabela 6), o que equivale a pouco mais de 12 plantas por metro, considerada densidade ideal para o feijoeiro. Estes valores não apresentam diferenças significativas, donde se pode concluir que diferentes rendimentos de grãos não poderão ser atribuídos a diferenças na população de plantas.

Quanto ao rendimento dos grãos, verifica-se, na Tabela 6, que o rendimento médio do ensaio foi superior a 3 toneladas de grãos por hectare, bastante superior à média nacional, que é de 826kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2004). Observa-se ainda na Tabela 6 que duas estirpes selecionadas (UFLA 02-100 e UFLA 02-127) e a estirpe BR 322<sup>T</sup>, proporcionaram rendimento de grãos que não diferiram significativamente da testemunha com N na dose total de 80kg por hectare (40kg na semeadura e 40kg em cobertura). Com base neste resultado, qualquer das três estirpes poderá ser utilizada com economia do fertilizante nitrogenado.

Ainda relacionado à Tabela 6, a estirpe UFLA 02-86 foi a que proporcionou menor rendimento, comparável ao da testemunha sem N mineral. É interessante observar que estes resultados não guardam qualquer relação com os resultados obtidos neste ensaio com a nodulação e crescimento da parte aérea do feijoeiro. Com relação às estirpes UFLA 02-100 e UFLA 02-127, os resultados do presente estudo se assemelham aos obtidos por Soares (2004), as quais apresentaram produtividade semelhante à da estirpe referência BR 322<sup>T</sup>, e à testemunha que recebeu N mineral (TcN).

TABELA 6. Valores médios do estande inicial (Ei), estande final (Ef), rendimento de grãos (RG) teor de N nos grãos (NG) e acúmulo de nitrogênio nos grãos (ANG), em função das fontes de nitrogênio sobre a cv Pérola, no ensaio 1. Formiga, MG.

Fontes de N	Ei (mil pl.ha <sup>-1</sup> )	Ef (mil pl.ha <sup>-1</sup> )	RG ** (Kg ha <sup>-1</sup> )	NG (%)	ANG (Kg ha <sup>-1</sup> )
UFLA 02-100	315	246	3267**a	3,18*a	154,23
UFLA 02-127	317	263	3097**a	2,86b	140,59
UFLA 02-86	308	246	2787b	3,22*a	143,30
BR 322	312	246	3208a	2,83b	145,54
TcN	362	264	3363a	3,36*a	164,47
TsN	330	274	2696b	3,04b	132,16
Médias	324	256	3069	3,08	145,05

Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

\*Significativo pelo teste de F ao nível de 5% de probabilidade

\*\*Significativo pelo teste de F ao nível de 6% de probabilidade

Quanto ao teor de N os tratamentos com as estirpes UFLA 02-100, UFLA 02-86 e a testemunha nitrogenada (TN) diferiram significativamente dos demais tratamentos, e com relação ao acúmulo de N nos grãos, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Hungria et al. (2000), estudando a eficiência e competitividade de novos isolados de rizóbios para o Brasil, obtiveram rendimentos de grãos variando entre 750 a 3.519kg ha<sup>-1</sup>, tendo também uma resposta positiva em função da inoculação de novas estirpes, algumas destas proporcionando rendimentos de grãos semelhante à estirpe referência BR 322<sup>T</sup> e ao controle com N mineral, como neste trabalho.

Mostasso et al. (2001), estudando a seleção de estirpes para feijão em cerrados brasileiros, obtiveram rendimento de grãos entre 1.612 e 2.600kg ha<sup>-1</sup>, valores estes que também não diferiram significativamente entre os tratamentos. Estas diferenças de resultados podem ser atribuídas a fatores tais como solo, adubação e época de semeadura, dentre outros.

## 4.2 Efeito da aplicação foliar do Mo no feijão inoculado com a estirpe UFLA 02-100

A análise de variância das características de crescimento e de nodulação das plantas, bem como do teor e acúmulo de N na parte aérea da leguminosa e a eficiência relativa (Efr), é apresentada na Tabela 7. Da mesma forma que no ensaio 1, verifica-se que a eficiência relativa foi a única característica influenciada significativamente pelos tratamentos. As características NN, Efr e NPA foram estimadas com maior precisão experimental, com relação às outras variáveis, fato este observado com base nos valores do coeficiente de variação (CV) (Tabela 7).

TABELA 7. Resumo da análise de variância (quadrados médios) do número de nódulos por planta (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (Efr%), nitrogênio na parte aérea (NPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA) do feijoeiro cv. Pérola, no ensaio 2. Formiga-MG.

FV	GL	Quadrados médios					
		NN	MSN	MSPA	Efr	NPA	ANPA
Tratamentos	3	11,70	0,56	1545,84	1026,81*	0,67	3,41
Blocos	5	12,01	0,42	747,90	77,40	0,50	1,32
Erro	15	10,49	0,45	505,27	197,89	0,23	1,61
CV(%)		18,72	32,31	20,76	16,56	14,24	33,12

Os valores médios dessas características encontram-se na Tabela 8, em função dos tratamentos empregados.

Com relação ao número de nódulos (NN) observa-se uma variação de 16,48 a 19,38 mostrando pouca variação e equivalência nas estirpes empregadas

e que não houve diferença significativa das testemunhas. Os valores da matéria seca dos nódulos (MSN) foram proporcionais ao número de nódulos (NN). Quanto à matéria seca da parte aérea, os valores variaram entre 93,90 e 129,88, também com pouca variação (Tabela 8). Os tratamentos TcN e UFLA 02-100Mo apresentaram certa tendência em proporcionar maior crescimento da parte aérea, embora não tenham se diferenciado significativamente dos demais tratamentos. O valor da eficiência relativa do tratamento com inoculação e molibdênio (91,67%) mostra claramente a influência do micronutriente no crescimento da planta do feijão, já que, excetuando-se a testemunha com N mineral (Efr= 100%), os demais tratamentos apresentaram eficiência significativamente inferior (Tabela 8). Os dados relativos ao teor e acúmulo de N na parte aérea não mostraram variação significativa entre os tratamentos.

Trabalhos anteriores a esse demonstram boa resposta do feijoeiro à aplicação do Mo, entre eles, os de Barbosa Filho et al. (1979), Amane et al. (1994), Vieira (1994), Alvarenga (1995) e Berger et al. (1996), dentre outros.

Resultado similar a este foi também observado por Andrade et al., (1998), em estudos sobre a influência do nitrogênio, rizóbio e molibdênio sobre o crescimento, nodulação radicular e teores de nutrientes no feijoeiro.

Os resultados médios das características avaliadas encontram-se na Tabela 8.

**TABELA 8** Valores médios do número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (Efr%), nitrogênio na parte aérea (NPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA), em função das fontes de nitrogênio sobre o feijoeiro cv. Pérola no ensaio 2. Formiga, MG.

F. de Nitrogênio	NN**	MSN (mg pl <sup>-1</sup> )	MSPA (mg pl <sup>-1</sup> )	Efr (%)	NPA (%)	ANPA (mg pl <sup>-1</sup> )
UFLA 02-100	16,80	2,19	93,90	72,29b	3,27	3,04
UFLA 02-100Mo	19,38	2,41	110,75	91,67* a	2,98	3,81
TcN	16,48	1,69	129,88	100,00* a	3,70	4,85
TsN	16,53	1,99	98,60	75,92b	3,63	3,61
Médias	17,29	2,07	108,28	84,97	3,40	3,83

Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

\* Significativo pelo teste de F ao nível de 5% de probabilidade

\*\*Dados transformados  $\sqrt{x+1}$ .

Um resumo da análise de variância das características agronômicas do feijoeiro (estandes inicial e final e rendimento de grãos) e do teor e acúmulo de N nos grãos é apresentado na Tabela 9. A precisão experimental, avaliada pelo coeficiente de variação (CV%), indicou maior precisão na estimativa do rendimento de grãos e estandes do que das demais características analisadas (Tabela 9)

**TABELA 9** Resumo da análise de variância (quadrados médios) dos estandes inicial e final, rendimento de grãos e teor e acúmulo de N nos grãos do feijoeiro cv. Pérola no ensaio 2. Formiga, MG.

FV	Quadrados médios					
	GL	EI	EF	RG	NG	ANG
Tratamentos	3	6105,48	2624,11	1068282,54	0,16	1473,50
Blocos	5	8915,94	1501,86	518887,60	0,20	355,48
Erro	15	2531,98	1404,51	528028,24	0,09	638,70
CV(%)		10,09	9,69	14,98	9,62	16,38

Os valores médios das características avaliadas são apresentados na Tabela 10, em função dos tratamentos empregados.

**TABELA 10** Valores médios do estande inicial (Ei), estande final (Ef) rendimento de grãos (RG) teor de nitrogênio nos grãos (%) (NG) e acúmulo de nitrogênio nos grãos (ANG), em função das fontes de nitrogênio sobre o feijoeiro cv. Pérola no ensaio 2. Formiga MG.

Fontes de N	Ei (mil pl ha <sup>-1</sup> )	Ef (mil pl ha <sup>-1</sup> )	RG Kg ha <sup>-1</sup>	NG (%)	ANG
UFLA 02-100	314	245	3267	3,18	134,23
UFLA 02-100Mo	322	246	3242	3,40	166,27
TcN	329	264	3363	3,36	164,47
TsN	362	279	2696	3,04	132,16
Médias	331	258	3142	3,25	149,28

Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O estande inicial variou de 314 a 362 mil plantas por hectare, resultando em estandes finais da ordem de 245 a 279 mil plantas por hectare, com média geral de 258 mil plantas por hectare (Tabela 10), o que equivale a pouco mais de 12 plantas por metro, considerada densidade ideal para o feijoeiro. Estes valores não apresentaram diferenças significativas, donde se pode concluir que eventuais diferenças no rendimento de grãos não poderão ser atribuídas a diferenças na

população de plantas. Trabalhos anteriores a esse demonstraram boa resposta do feijoeiro à aplicação do Mo (Barbosa Filho et al., 1979; Amane et al., 1994; Vieira, 1994; Alvarenga, 1995; e Berger, et al. 1996). O teor de N na testemunha sem N mineral (TsN), quando comparado ao teor de N no tratamento inoculado e com Mo (UFLA 02-100Mo), assumiu um valor não esperado, de maior magnitude. Este resultado se manifesta também no acúmulo de N nos grãos (ANG), (Tabela1).

O rendimento de grãos verificado na Tabela 10, mostra rendimento médio superior a 3 toneladas de grãos por hectare, também como no ensaio 1 muito superior à média nacional, que é de 826Kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2004). Ainda na Tabela 10, observa-se que o tratamento que recebeu inoculação e aplicação foliar de Mo (UFLA 02-100Mo) não proporcionou aumento no rendimento de grãos quando comparado ao tratamento com inoculação e sem adição de Mo (UFLA 02-100). Quanto ao teor e acúmulo de N nos grãos, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

#### **4.3 Caracterização cultural dos isolados nativos**

Foi obtido um total de 100 isolados dos nódulos das raízes das plantas de feijoeiro que não receberam inoculação: 50 nódulos das testemunhas sem N mineral e 50 nódulos das testemunhas com N mineral. Estes isolados foram caracterizados culturalmente, submetidos a teste de eficiência relativa, em frascos em casa de vegetação do laboratório de Microbiologia do Solo da UFLA e submetidos à análise de proteínas totais por SDS-PAGE.

Os 100 isolados obtidos dos nódulos das plantas de feijoeiro, e as estirpes testadas no experimento, foram agrupados segundo suas características culturais. Os grupos foram formados por similaridade e foram separados de acordo com a origem dos isolados em: FN isolados de nódulos da raiz da planta testemunha sem inoculação e com N mineral (TcN) e FT isolados de nódulos da



raiz da planta testemunha sem inoculação e sem N mineral (TsN) (Tabelas 11 e 12).

TABELA 11 Agrupamento e número de isolados de nódulos do feijoeiro sem N mineral (TsN) (FT), de acordo com suas características culturais.

Características culturais isolados de TsN (FT)										
Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	N/I
1	R	1 a 2	ácido	circ.	lisa	abundante	gomosa	amarela	N	1
2	R	>2	ácido	circ.	lisa	abundante	gomosa	creme	N	3
3	R	>2	ácido	circ.	lisa	abundante	gomosa	creme	N	2
4	R	>2	ácido	circ	lisa	abundante	gomosa	amarela	S	35
5	R	>2	neutro	circ.	lisa	abundante	gomosa	creme	N	3
6	R	>2	ácido	circ.	lisa	abundante	gomosa	amarela	S	6

Características culturais: 1= tempo de crescimento (MR) muito rápido- 1 dia, (R) rápido- 2 a 3 dias, ( I) intermediário- 4 a 5 dias, (L) lento- 6 a 10 dias, (ML) muito lento - mais de 10 dias; 2 = diâmetro da colônia em mm; 3 = modificação do p H do meio (ácido, básico); 4 = forma da colônia (puntiforme, circular, irregular); 5= superfície da colônia (lisa, rugosa, papilada); 6 = produção de muco( escassa, pouca, moderada, abundante); 7= consistência (seca, aquosa, gomosa, viscosa, butírica); 8 =coloração (amarela, creme, incolor, branca, rosa); 9 = absorção do indicador (sim (S) ou não (N); N/I = número de isolados.

**TABELA 12** Agrupamento e número de isolados de nódulos do feijoeiro com N mineral (TcN) (FN) de acordo com suas características culturais.

Características culturais isolados de TcN (FN)										
Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	N/I
1	R	1 a 2	neutro	circ.	lisa	abundante	gomosa	branca	N	3
2	R	>2	ácido	circ.	lisa	abundante	gomosa	branca	N	9
3	R	>2	ácido	circ.	lisa	abundante	gomosa	branca	S	8
4	R	>2	ácido	circ.	lisa	abundante	gomosa	amarela	S	6
5	R	>2	ácido	circ.	lisa	abundante	gomosa	amarela	N	8
6	R	>2	ácido	circ.	lisa	abundante	gomosa	amarela	N	11
7	R	>2	ácido	circ.	lisa	abundante	gomosa	creme	S	5

Características culturais: 1= tempo de crescimento (MR) muito rápido- 1 dia, (R) rápido- 2 a 3 dias, ( I) intermediário- 4 a 5 dias, (L) lento- 6 a 10 dias, (ML) muito lento – mais de 10 dias; 2 = diâmetro da colônia em mm; 3 = modificação do p H do meio (ácido, básico); 4 = forma da colônia (puntiforme, circular, irregular); 5= superfície da colônia (lisa, rugosa, papilada); 6 = produção de muco( escassa, pouca, moderada, abundante); 7= consistência (seca, aquosa, gomosa, viscosa, butírica); 8 =coloração (amarela, creme, incolor, branca, rosa); 9 = absorção do indicador (sim (S) ou não (N)); N/I = número de isolados.

#### **4.4 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos isolados obtidos.**

Os isolados de plantas de feijoeiro que não receberam N mineral (FT), e os isolados das plantas de feijoeiro que receberam N mineral (FN) que apresentaram perfil protéico formaram 5 grupos, a 80% de similaridade, conforme as Tabelas 13 e 14. Os dendrogramas de similaridade, obtidos a partir dos perfis eletroforéticos das estirpes, podem ser visualizados nas figuras 2 (TsN) e 3 (TcN) e os perfis de proteína total destes isolados encontram-se nas Figuras 4 (TsN) e 5 (TcN).

TABELA 13 Grupos formados pela eletroforese de SDS-PAGE dos isolados de plantas de feijoeiro que não receberam N mineral (FT).

Grupos	Isolados
Grupo 1	1,12 e 17
Grupo 2	15 isolados (3, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 23, 25, 30, 32, 36, 46, 48, 49), UFLA 02-86
Grupo 3	16 isolados (2, 21, 26, 27, 28, 29, 31, 34, 35, 37, 39, 40, 41, 45, 47, 50); UFLA 02-68.
Grupo 4	4, 5, 9, 43, 44, BR 322
Grupo 5	16, 22, 33, 38.

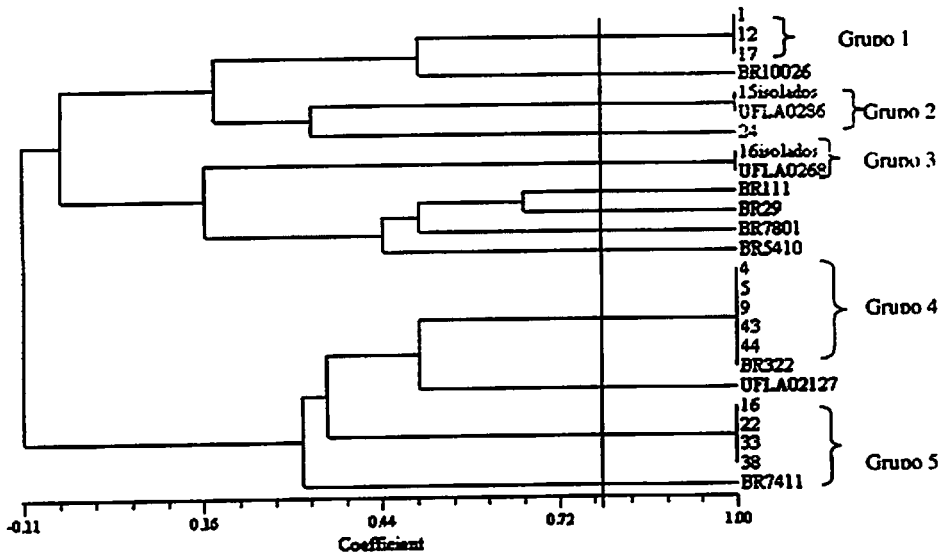


FIGURA 2 Dendrograma de similaridade construído de acordo com as características dos isolados de plantas de feijoeiro que não receberam N mineral (TsN), e as estirpes usadas neste ensaio (UFLA 02-100, UFLA 02-127, UFLA02-86 e BR 322) e também as estirpes Tipo (UFLA 02-68, BR 10026, BR 7411, BR 7801, BR 5410, BR 29, BR 111).

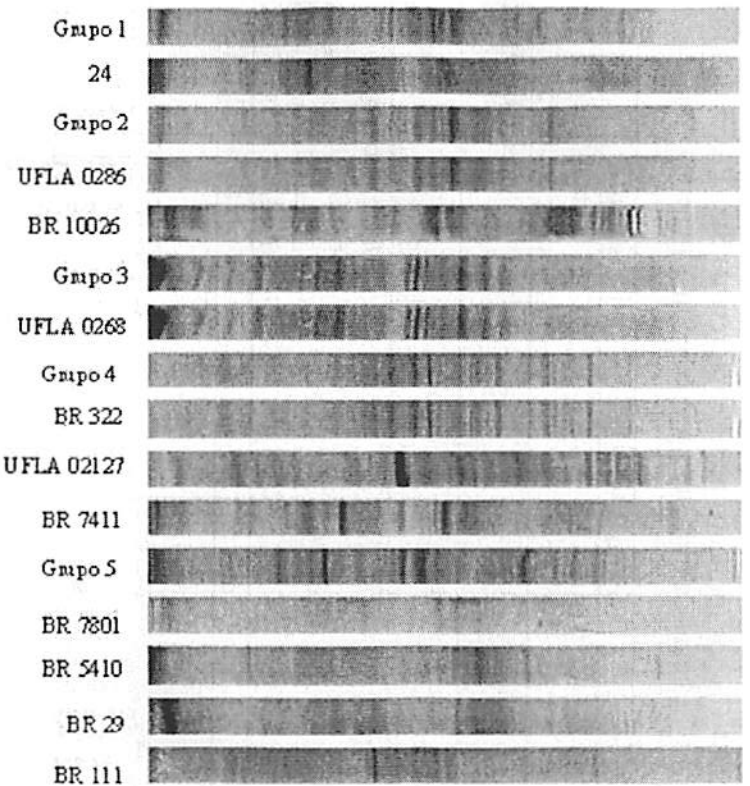
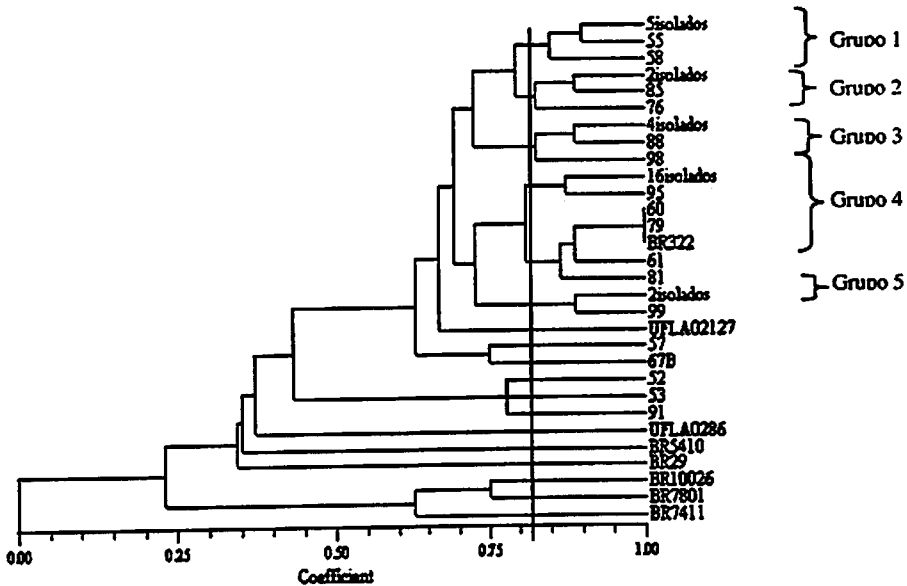


FIGURA 4 Perfis de proteína celular total das estirpes isoladas das plantas T<sub>5</sub>N (FT) da área em estudo, das estirpes referência e das estirpes Tipo obidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

O grupo 1, na Tabela 14, foi formado por 3 isolados. O grupo 2 foi formado por 15 isolados e conteve a estirpe de rizóbio UFLA02-86, usada no ensaio. O grupo 3 foi formado por 16 isolados e conteve a estirpe UFLA 02-68. O grupo 4 foi formado por 5 isolados e conteve a estirpe Br 322<sup>T</sup>. O grupo 5 foi formado por 4 isolados. As estirpes usadas como referência não se agruparam, a 80% de similaridade, com os demais isolados nativos da área em estudo, (Tabela 14).

**TABELA 14** Grupos formados pela eletroforese de SDS-PAGE dos isolados de plantas de feijoeiro que receberam N mineral (FN).

<b>Grupo</b>	<b>Isolados</b>
Grupo 1	5 isolados (51, 67 <sup>A</sup> , 75, 86, 88B), 55, 58.
Grupo 2	2 isolados (64, 89), 76, 85.
Grupo 3	4 isolados (87, 88 <sup>A</sup> , 90, 92), 88, 98.
Grupo 4	16 isolados (59, 63, 65, 66, 68, 69, 71, 72, 77, 78, 82, 83, 84, 94, 95, 96), 61, 60, 79, 81 e BR 322.
Grupo 5	2 isolados (62, 100), 99.



**FIGURA 3** Dendrograma de similaridade construído de acordo com as características dos isolados de plantas de feijoeiro que receberam N mineral (TcN) e as estirpes usadas neste ensaio (UFLA 02-100, UFLA 02-127, UFLA02-86 e BR 322) e também as estirpes Tipo (UFLA 02-68, BR 10026, BR 7411, BR 7801, BR 5410, BR 29, BR 111).

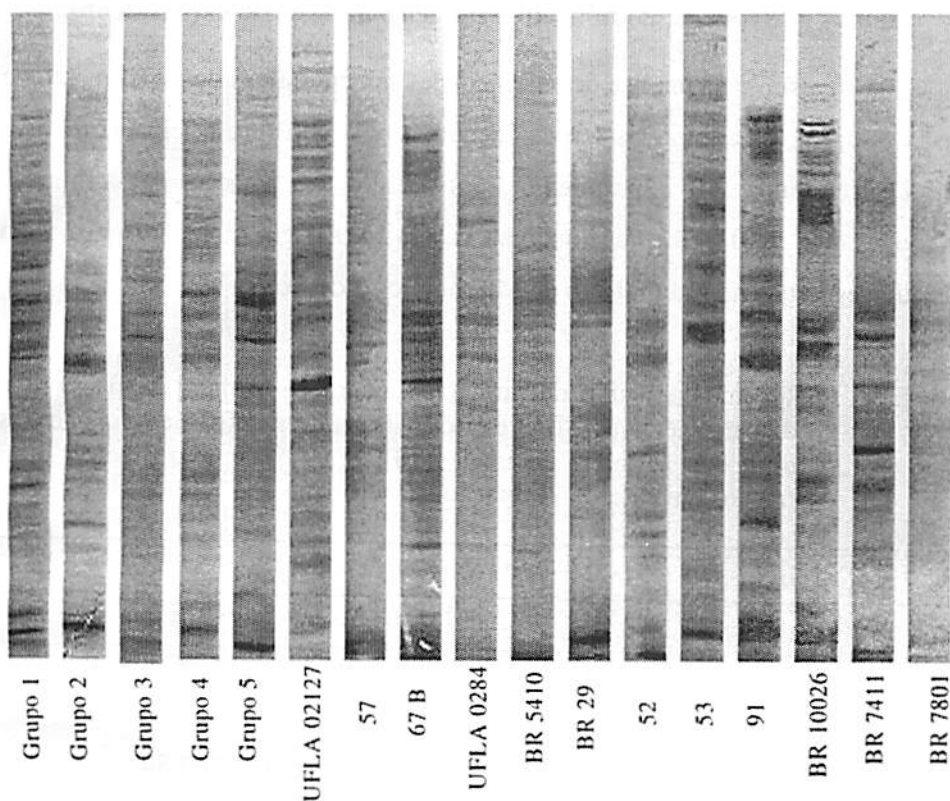


FIGURA 4 Perfis de proteína celular total das estirpes isoladas das plantas TcN (FN) da área em estudo, e das estirpes referência e das estirpes Tipo obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

O grupo 1,(Tabela 15) foi formado por 7 isolados, o grupo 2 foi formado por 4 isolados, o grupo 3 foi formado por 6 isolados, o grupo 4 foi formado por 20 isolados e conteve a estirpe referência BR 322<sup>T</sup> referência recomendada para produção de inoculante comercial para feijão, e finalmente, o grupo 5 foi formado por 3 isolados. As outras estirpes não se agruparam, a 80% de similaridade, com os demais isolados nativos da área em estudo.

#### 4.4 Ensaio na casa de vegetação: Densidade e eficiência da população de rizóbios nativos que nodularam o feijoeiro na área do experimento.

Um resumo da análise de variância das características do experimento de casa de vegetação, como massa seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (Efr%), referentes ao experimento com frascos em função das diluições utilizadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ), é apresentado na Tabela 15. A figura 6 mostra ensaio em casa de vegetação no Laboratório de Microbiologia do Solo - UFLA.

TABELA 15 Resumo da análise de variância (quadrados médios) da massa seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (Efr%) em função das diluições seriadas decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) do experimento com frascos em casa de vegetação.

Quadrados médios			
FV	GL	MSPA	Efr (%)
Frascos	8	0,02*	1892,99*
Repetição	2	0,00	10,58
Erro	16	0,00	167,84
CV(%)		31,09	19,74

\*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.



FIGURA 6 Ensaio em casa de vegetação - DCS-UFLA

Os dados sobre a presença (+) ou ausência (-) de nódulos, matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (Efr%), em função das diluições utilizadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ), nas plantas inoculadas com suspensões de solo, e das testemunhas com N mineral e sem N mineral, encontram-se na Tabela 14.



TABELA 16 Ocorrência de nódulos (+) (-), valores médios da matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (Efr%) referentes ao experimento com frascos em função das diluições utilizadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ), e das testemunhas com (TcN) e sem N mineral (TsN).

Tratamentos	Nodulação			MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	Efr (%)
	R1	R2	R3		
Diluição $10^{-1}$	+	+	+	0,21a	60,00 a <sup>2</sup>
Diluição $10^{-2}$	-	+	+	0,12b	34,29 a <sup>1</sup>
Diluição $10^{-3}$	+	+	+	0,31a	88,57 a <sup>3</sup>
Diluição $10^{-4}$	+	+	-	0,25a	71,43 a <sup>2</sup>
Diluição $10^{-5}$	+	+	-	0,24a	68,57 a <sup>2</sup>
Diluição $10^{-6}$	-	+	+	0,27a	77,14a <sup>2</sup>
TcN	-	-	-	0,35a	100,00a <sup>3</sup>
TsN	-	-	-	0,21a	60,00 a <sup>2</sup>
CV%				19,74	31,09

Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Presença de nódulos (+), ausência de nódulos (-), matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (Efr%), R= repetição.

A partir deste experimento, foi possível inferir que a área onde foi realizado o ensaio possui uma população de rizóbio nativos de 781 células por grama de solo. Valores semelhantes foram encontrados em solos cultivados com feijoeiro no município de Perdões, MG (Soares, 2004), no município de Theobroma, RO (Pereira, 2000) e em solos da região Centro-Oeste do estado de Minas Gerais (Vale, 2005).

As testemunhas não apresentaram nódulos em suas raízes, portanto, não houve contaminação do experimento.

A ocorrência de espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro é demonstrada por outros autores como sendo variável para cada tipo de solo ou região estudada. Andrade et al. (2000) verificaram maior ocorrência de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*, em relação ao *Rhizobium tropici*, em

solos que não receberam calagem e, portanto, com valores menores de pH. Mhandi et al.(2002), obtiveram isolados de feijoeiro em solos da Tunísia, sendo 1/3 classificado como *R. gallicum*, 1/3 como sendo *R.etli* e *R. leguminosarum* e o restante em outras espécies que nodulam o feijoeiro.

O resultado deste trabalho, com relação aos isolados de plantas que receberam N mineral, assemelha-se aos encontrados por Mercante et al.; (1998) e Hungria et al. (2000), pois, mostra a tendência de alguns isolados (20 dos 50), estudados apresentarem características de *R. tropici*. Entretanto, com relação aos isolados de plantas que não receberam N mineral, observa-se uma certa tendência de alguns isolados (16 dos 50) em apresentar características da estirpe UFLA 02-68.

## 5 CONCLUSÕES

A inoculação com as estirpes UFLA 02-100 e UFLA 02-127 contribuiu de forma significativa para o aumento de rendimento de grãos no feijoeiro, podendo desta maneira serem utilizadas com economia do fertilizante nitrogenado.

A população nativa apresentou diversidade fenotípica cultural e de padrões protéicas.

Cerca da metade dos isolados não foi similar às estirpes de espécies conhecidas.

Com relação aos perfis protéicos, 20 dos cinquenta isolados das plantas que receberam N mineral se agrupam a 80% de similaridade com a estirpe tipo de *Rhizobium tropici* BR322<sup>T</sup>, 16 dos cinquenta isolados de plantas que não receberam N mineral se agruparam a 80% de similaridade com a estirpe UFLA 02-68 e 15 dos cinquenta isolados de plantas que não receberam N mineral se agruparam a 80% de similaridade com a estirpe UFLA 02-86.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. et al. Fingerprint *Acinetobacter* strains from clinical sources by numerical analysis of electroforetic protein patterns. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.18, n.1, p.55-64, Jan. 1984.

ALFENAS, A.C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, C.A. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.

ALFENAS, A.C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991. 292p.

ALVARENGA, P.E. **Resposta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) às adubações nitrogenada e molíbdica e à inoculação com *Rhizobium leguminosarum* bv.*phaseoli*.** 1995. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ALVES, L.I.O.; CARVALHO, R.M.; LASMAR, I.E. **Minas Gerais: espaço em construção**. 2.ed. Belo Horizonte: Lê, 1998. 135p.

AMANE, M.I.V. et al. Resposta de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) às adubações nitrogenada e molíbdica. **Revista Ceres**, v.41, p.202-216, 1994.

AMARGER, N.; MACHERET, V.; L AGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp.nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Sistematic Bacteriology**, v.47, p.996-1006, 1997.

ANDRIGHETTO, C. et al. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from italian cheeses. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.68, n.2, p.303-316, May 2001.

ANDRADE, M.J.B. et al. Influência do nitrogênio, rizóbio e molibdênio sobre o crescimento, nodulação radicular e teores de nutrientes no feijoeiro. *Revista Ceres*, v.45, n.257, p.65-79, 1998.

ANDRADE, N.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. Diversity and abundance of populations of bean-nodulating rhizobia as a function of liming and cropping history in acidic Brazilian soils. In: PEDROSA, F.O. et al. (Ed.). *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Dordrecht: Kluwer, 2000. p.546.

AYDIN, F.; ATABAY, H.I.; AKAN, M. the isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* from domestic geese (*Anser anser*). *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v.90, n.4, p.637-642, Apr. 2001.

BARBOSA FILHO, M.P. et al. Efeitos de idade, fósforo, molibdênio e cobalto no teor percentual de nitrogênio em diferentes partes do feijoeiro comum. *Ciência e Prática*, Lavras, v.3, n.107-116, 1979.

BERGER, P.G.; VIERA, C.; ARAÚJO, G.A. A. Efeitos de doses e épocas de aplicação do molibdênio sobre a cultura do feijão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.31, p.473-480, 1996.

BORÉM, A. et al. *Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais*. Viçosa: UFV, 1998. p.13-18.

BROSE, E. Seleção de rizóbio para trevo-branco em solo ácido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.29, n.2, p.281-285, 1994

BURGESS, T. et al. Variation in *Pisolithus* based on basidiome and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using ID SDS-PAGE. *Micological Research*, Cambridge, v.99, n.1, p.1-13, Jan. 1995.

CARRARO, D.M. *Variação e herança dos padrões eletroforeticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (Zea mays L.)*. 1990. 121p. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CASSINI, S.T.A.; FRANCO, M.C. Fixação biológica de nitrogênio. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p.153-180.

CHEN, W.X. et al. *Rhizobium huahuii* sp.nov. isolated from root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, n.2 p.275-280, 1991.

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**, Viçosa ago. 2003.

CONAB. **Comparativo de área, produtividade e produção safras 2003/2004 e 2004/2005**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 05 ago. 2004.

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

DE LAJUDIE, P. et al. Poliphasic taxonomy of rhizobia emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium melilot* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov., and. **Internatinal Journal of Sistematic Bacteriology**, Reading, v.44, n.4, p.715-733, Oct. 1994.

DE LAJUDIE, P. et al. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.48, n.2, p.369-382, Apr. 1998.

DINIZ, A.R. **Resposta da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) à aplicação de nitrogênio (semeadura e cobertura) e de molibdênio foliar**. 1995. 60p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DOBEREINER, J. Manganese toxicity effects on nodulation and fixation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.), in acid soils. **Plant and Soil**, v.14, p.153-166, 1966.

DOBEREINER, J.; DUQUE, F.F. Contribuição da pesquisa em fixação biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. **Revista de Economia Rural**, Brasília, v.18, n 3. p.447-460, 1980.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* ge. nov., a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, n.1, p.89-98, Jan. 1988.

DUPUY, N. et al. Phenotypic and Genotypic of Bradyrhizobia strains nodulating the leguminous tree *Acacia albina*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, n.3 p.461-473, 1994.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 253p.

FELIX, J.F. et al. Nitrate reductase and nitrogenase activities of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from different geographic locations. **Pl. Soil**, Hague, v.63, p.427-438, 1981.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programas e Resumos...** São Carlos :UFSCar, 2000. p.235.

FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C.; NEIRA, C.A. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. **P Physiology**, Bethesda, v.63, p.421-424, 1979.

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F.M.S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. And its Nodule Isolates *Azorhizobium johannae* with other Legume Hosts and Rhizobia. I. Balaban, Philadelphia/Rehovot. **Symbiosis**, Rehovot, v.36, n.1, p.57-68, 2004.

HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. **Gel eletrophoresis of protein: a practical approach**. 2.ed. Oxford: Oxford University, 1990. 383p.

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

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, da redutase do nitrato e transporte do nitrogênio na seiva do xilema<sup>(1)</sup>. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.9, p.193-200, 1985 a.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. II. Absorção e translocação do N mineral e do N<sub>2</sub> fixado<sup>(1)</sup>. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.9, p.201-209, 1985b.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CNAC, 1997. 524p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.  
**Levantamento sistemático da produção agrícola /2003: relatório por produto**. Formiga, MG. Unidade Estadual-MGGCEA-MG/Surpervisão Estadual de Pesquisa Agropecuária-LSPA, 2004.

JORDAM, D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. London: Willians & Wilkins, 1984. p.235-244.

LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n.5259, p.680-685, Aug. 1970.

KELLER, G. Isozymes in isolates of *Suillus* species from *Pinus cembra* L. **New Phytologist**, New York, v.120, n.3, p.351-358, Mar. 1992.



MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251p

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

MERCANTE, F.M. et al. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian "cerrado" region. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.29. p.49-58, 1998.

MELLONI, R. **Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em solos de mineração de bauxita**. 2001. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MHAMDI, R.A. et al. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.41, n.1, p.77-84, 2002.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 620p.

MOREIRA, F.M.S.; TIEDJE, J.; MARSH, T.L. *Burkholderia* spp. are among fast growing symbiotic diazotrophs isolated from diverse land use systems in Amazônia and from Brazilian leguminosae Forest species. In: REUNIÓN LATINAMERICANA DE RHIZOBIOLOGIA, 21.; CONGRESO NACIONAL DE LA FBN, 6., 2002, Cocoyoc, México. **Proceedings...** Cocoyoc, México, 2002. p.45-46.

MOREIRA, F.M.S. et al. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.16, n.1, p.135-146, Apr. 1993.

MOREIRA, F.M.S. et al. *Azorhizobium johanense* sp. Nov. and *sesbania virgata* (Caz.) Pers.: a Highly specific symbiosis. In: PEDROSA, F.O. et al. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p.197.

MOSTASSO, L. et al. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobialstrains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.73, n.2/3, p.121-132, 2001.

PATEL, D. **Gel eletrophoresis: essential data series**. New York: J. Wiley, 1994. 146p.

PEREIRA, E.G. **Diversidade de rizóbio em diferentes sistemas de uso da terra da Amazônia**. 2000. 93p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RATH, P.M. Phenotypic and genotypic characterization of reference strains of the genus *Aspergillus*. **Mycoses**, Berlin, v.44, n.3/4, p.65-72, May 2001.

RODRIGUES, J.R.M.; ANDRADE, M.J.B.; CARVALHO, J.G. **Resposta de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a doses de molibdênio via foliar**. 1995. 47p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RUSCHEL, A.P.; REUSZER, H.W. Fatores que afetam a simbiose *Rhizobium phaseoli- Phaseolus vulgaris*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.8, n.8, p.287-292, 1973.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1979. 27p.

SCHOLLA, L.; ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.34, n.4, p.484-486, 1984.

**SEBRAE. Diagnóstico municipal. Formiga MG, 2001**

**SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTINEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.43, n.2,374-377, Apr. 1993**

**SEM, R. Intraspecific variation in two species of *Suillus* from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) forest based on somatic incompatibility and isozyme analysis. *New Phytologist*, New York, v.114, n.4, p.607-616, Apr. 1990**

**SLICE, D.E.; KIM, J.; WALKER, J. NTSYS-Numerical taxonomy and multivariate analysis system: versão 1.80. 1994. Programa.**

**SOARES, A.L.L. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas que nodulam feijão e caupi em Perdões/MG. 2004. 73p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG**

**SOUZA, A.M. de. Diversidade fenotípica e genotípica de isolados *Pisolithus* sp. 2000. 107p. Dissertação (Mestrado em Manejo Ambiental)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.**

**SOUZA, M.F.M.; VALE, H.M.M., STRALIOTTO, R. Competitividade de estirpes pertencentes a diferentes espécies de Rizóbio para ocupação nodular em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomia*, v.37. n.1, p.59-63, 2003**

**STRALIOTTO, R. A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro. Embrapa, CNPAB, 2002.**

**STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose. Seropédica, RJ: Embrapa-CNPAB, 1999. p.51. (Documentos, 94).**

STRALIOTTO, R. et al. Diversidade genética de rizóbio que nodula o feijoeiro em condições tropicais: *Sinorhizobium*, um novo gênero nodulando eficientemente o feijoeiro em condições de estresse térmico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 19.; 1997, Rio de Janeiro. Abstracts... Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997.

TAN, Z.Y. et al. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, n.3, p.909-914, May 2001.

VALE, H.M.M. Densidade, eficiência e diversidade de populações de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos da região Centro-Oeste de Minas Gerais 2005. 78p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VANDAMME, P. et al. Intra and interspecific relationships of veterinary campilobacters revealed by numerical analysis of eletrophoretic protein profiles and DND:DNA hybridizations. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.13, n.3, p.295-303, Aug. 1990.

VELAZQUEZ, E. et al. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov. A novel species that nodulates *Prosopis Alba* in the Chaco Arid region (Argentina). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, n.3, p.1011-1021, May 2001.

VIEIRA, C. et al. Triagem de germoplasma de feijão (*Phaseolus Vulgaris* L. ) em busca de fontes de tolerância à baixa temperatura. **Ciência e Prática**, v.18, p.295-305, 1994.

VINCENT, J.M.A. **Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970.

WESTERMEIER, R. et al. **Eletrophoresis in practice: a guide to theory and practice**. New York: VCH, 1993. 227p.

WOOMER, A.N.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.54, n.7, p.1112-1116, July 1988.

ZHU, H. et al. Intraspecific genetic variability of isozymes in the ectomycorrhizal fungus *Suillus tomentosus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, n.3, p.588-594, Mar. 1998.

## ANEXOS

ANEXOS	Página
ANEXO 1	
Solução de Jensem modificada, meios de cultura, tampões e soluções de revelação.....	60
ANEXO 2.	
Protocolo para análise de proteína total por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de bactérias gram- negativas (protocolo utilizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Gent e do SMS – UFLA).....	63

## ANEXO 1

### Solução de Jensen Modificada

$K_2HPO_4$ (0,12 mol L <sup>-1</sup> )	10 mL*
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,081 mol L <sup>-1</sup> ) + NaCl (0,34 mol L <sup>-1</sup> )	10 mL*
$CaHPO_4$ (0,035 mol L <sup>-1</sup> )	10 mL*
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,0,35 mol L <sup>-1</sup> )	10 mL*
** Solução de micronutrientes	1 mL *
Água destilada	1000 mL
pH = 6,7; ajustar com NaOH	

#### Solução estoque

\* Volume retirado da solução estoque para o preparo de 1 litro da solução de Jensen modificada

\*\* Solução de micronutrientes para 1 litro de água

$H_3BO_3$	2,86 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2,03 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08 g
$Na_2MoO_4 \cdot 4H_2O$	0,09 g
$CoCl_2$	0,03 g

Meios de cultura, tampões e soluções de revelação.

#### Meio YMA

10 g de manitol ou sacarose	Completar para 1.000 ml com água destilada. pH 6,8 a 7,0. Meio sólido: 15g da ágar. Meio semi-sólido: 1,75 gr de Agar.
1ml sol. $K_2HPO_4$ (10%)	
4 ml sol. $KH_2PO_4$ (10%)	
2 ml sol. $MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$ (10%)	
1 ml sol. NaCl (10%)	
100 ml de extrato de levedura ou 0,4 gr de extrato de levedura em pó.	

5ml sol. A 0,5% em 0,2 N de KOH de azul de bromotimol

**Meio de cultura TY**

Tryptona	5g
Extrato de levedura	0,75g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,454g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,79g
H <sub>2</sub> O destilada	completar para 1000mL
pH 6,8-7,8	

**Observação**

Solução CaCl<sub>2</sub> (autoclavar em frasco individual) 20g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O em 100mL H<sub>2</sub>O. No momento da inoculação, acrescentar 0,25mL para cada 50ml de meio de cultura (TY)

**Tampão de lavagem das células (NaPBS)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O 0,2M	40,5ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O 0,2M	9,5ml
NaCl	8,0 g
H <sub>2</sub> O bidestilada	completar para 1000mL
pH 7,3	Estocar a 4°C

**Tampão de tratamento da amostra (TTA)**

**Observação:**

Mercaptoetanol	5mL
Glicerol	10mL
Tris-HCL	0,75 g
H <sub>2</sub> O bidestilada	completar para 100mL
pH 6,8	Estocar a -18° C

(0,75 g Tris + 50 mL de água destilada + 3,45 mL 1,72 N HCl ajuste o pH para 6,8). Depois de adicionar o mercaptoetanol + 10 mL de glicerol e ajuste para 100 mL

**A - Tampão do gel de separação**

**B - Tampão gel de empilhamento**

Tris (1,5M)	18,15 g
H <sub>2</sub> O	completar para 100 mL
pH 8,8	Estocar a 4°C

Tris base (0,5M)	6,0 g
H <sub>2</sub> O	completar para 100 mL
pH	6,8 Estocar a 4°C

Observações:



A- Pesar o Tris e adicionar 50mL de água bidestilada + 24,2 mL de HCl 1,72 N. Elevar o pH para 8,8e completar o volume restante com água bidestilada.

B- Pesar o Tris e adicionar 50mL de água bidestilada + 29 mL de HCl 1,72 N. Elevar o pH para 6,8 e completar o volume restante com água bidestilada

Solução estoque de SDS (10%)		Solução estoque APS (10%)	
10g SDS	100ml H <sub>2</sub> O destilada	0,1g APS	1ml H <sub>2</sub> O destilada
Gel de separação ( para 1 gel)		Gel de concentração ( para 1 gel)	
H <sub>2</sub> O bidestilada	9,6mL	H <sub>2</sub> O bidestila	6 mL
Bis acrilamida	12,5mL	Bis acrilamida	1,34 mL
Tris-HCl 1,5M pH:8,8	7,5mL	Tris-HCl 1,5M pH:8,8	2,5 mL
SDS (10%)	300µL	SDS (10%)	100µL
APS (10%)	15µL	APS (10%)	50µL
TEMED	10µL	TEMED	5µL

(pH da solução de APS recém-preparada (fresca 1 hora, no máximo) deve estar entre 5-6).

#### Tampão de corrida (Tampão Tris-Glicina)

Tris	12,0g
Glicina	57,5g
SDS	4g
H <sub>2</sub> O bidestilada	completar para 4000mL
pH 8,59 a 19°C. (Preparar minutos antes de começar a eletroforese)	

Solução de monômeros	Observação
Acrilamida	Imediatamente após dissolver os compostos em água (processos endotérmico) o volume é ajustado e a solução deverá sempre permanecer gelada.
Bis-acrilamida	
H <sub>2</sub> O bidestilada completar para 100 mL. Filtrar e armazenas a 4° C.	

#### Solução estoque de SDS (20%)

20g de SDS e completar o volume para 100mL com água destilada. Estocar a temperatura ambiente (não colocar na geladeira)

### Volumes de STB e SDS para o preparo do extrato de célula (1/20 diluição)

Peso de células úmidas, em mg	STB (sem SDS), em mL	SDS 20%, em mL
70	0,9	0,1

### Revelação de proteínas totais

*Solução de coloração		*Solução fixadora	
Metanol	400mL	Metanol	450mL
Ácido. acético	70mL	Ácido. acético	100mL
Coomassie Blue R250	0,5 g	H <sub>2</sub> O destilada	1000mL
H <sub>2</sub> O destilada	1000mL		

*Solução descolorante		*Solução secante	
Metanol	400mL	Metanol	650mL
Ác. acético	70mL	Glicerol	5mL
H <sub>2</sub> O destilada	1000mL	H <sub>2</sub> O destilada	1000mL

## ANEXO 2

Protocolo para análise de proteína total por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de bactérias gram-negativas (protocolo utilizado do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Gent e no SMS - UFLA).

### EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

1) Multiplique a bactéria em meio adequado para o cultivo da espécie sólido, a 28°C, para verificação de pureza.

- 2)
    - a) Repique colônias isoladas para meio TY sólido (pode ser ágar inclinado) duas vezes sucessivas.
    - b) Inocule colônias isoladas em meio TY líquido (50 mL), a 28°C (bactérias de crescimento rápido por 48h e as de crescimento lento por 72 h.), sob agitação constante (120 rpm).
  - 3) Centrifugue a 10.000 rpm por 10 min., a 4°C.
  - 4) Descarte o sobrenadante
  - 5) Lave as células por meio de ressuspensão do "pellet" em 30mL de tampão NaPBS e faça uma nova centrifugação.
  - 6) Descarte sobrenadante e repita a lavagem por mais duas vezes.
  - 7) Pese, para cada isolado, as células em tubos Eppendorf limpo. O peso úmido das células deve ser de 70mg.
  - 8) Adicione 0,9mL do tampão de tratamento da amostra (STB sem SDS) e misture com misturador tipo Vórtex.
  - 9) Adicione 0,1mL de uma solução SDS 20% (dodecil sulfato de sódio) e misture com misturador do tipo Vórtex.
  - 10) Aqueça a mistura a 95°C por 10-15 min, esfrie e centrifugue em uma centrífuga Eppendorf (10000 rpm por 8 min)
  - 11) Verta o sobrenadante (extrato de proteína) em dois tubos Eppendorf limpos. A parte menor, para uso diário, é armazenada a -20°C e a parte maior, para armazenamento mais longo, a -80°C por até três anos.
- Obs: entre os passos 9 e 10, a suspensão bacteriana resfriada pode ser tratada por ultra-som (sonda tipo agulha – 127mm, 4mm de diâmetro), durante 5 segundos, posição "low", máximo de 50w.

### PREPARAÇÃO DO GEL DE SDS-PAGE NAS PLACAS (modificado de Laemmli, 1970).

#### A) Preparação do gel de separação de 12%

- 1) Misture o seguinte em um frasco limpo.

<i>H<sub>2</sub>O</i> (bidestilada)	13.4mL
1,5M TRIS-HCL, p H 8,8 (tampão gel de separação)	10ml
Bis-Acrilamida (solução de monômeros)	16mL

- 2) Esquente a mistura acima a aproximadamente 19°C por aproximadamente 3 min.

- 3) Adicione o seguinte na mistura:

SDS 10%	0,4mL
TEMED	20 µL

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 10%(APS)

0,14MI

(p H da solução de APS recém preparada (fresca 1 hora, no máximo) deve estar entre 5 e 6.)

4) Misturar bem (agitando o frasco, erlenmeyer, que contem a solução do gel) e verta 28ml da solução imediatamente entre as placas de vidro. O nível de gel de separação deve ser, aproximadamente, 12,6 cm da base.

5) Colocar o conjunto submerso em banho-maria a 19°C

6) Cubra com 2ml de isobutanol saturado com água para manter uma condição de anaerobiose e obter uma superfície plana.

7) Deixe polimerizar no banho-maria por 1h a 20°C. Após 1 hora descarte o isobutanol, lave a superfície do gel com bastante água bidestilada e cubra com 1,6 mL de tampão do gel de separação (diluído 1:4) contendo 0,1% de SDS.

8) Proceder a polimerização por 24 h (ou só durante a noite) em temperatura ambiente (a 20°C).

B- Preparação do gel de empilhamento ( concentração) de 5%( uma hora antes de carregar o gel.)

1) Descarte o líquido sobrenadante e lave com água bidestilada, remova o excesso do líquido virando as placas de cabeça para baixo para escoar.

2) Misture o seguinte em frasco:

H<sub>2</sub>O (bidestilada) 5,7mL

Bis-Acrilamida (30%T, 2.67%C) solução de monômeros 1,7 mL

3). Esquente a mistura até aproximadamente 19°C por aproximadamente 3 min. em banho-maria

4) Adicione o seguinte na mistura:

SDS10% 0.1mL

TEMED 10 µL

Misturar bem com um bastão de vidro.

5) Antes de colocar a solução do gel de empilhamento na superfície do gel de separação, lave a superfície com alguns mL da solução do gel de empilhamento.

6) Aplique a solução do gel de empilhamento (concentração) em cima do gel de separação polimerizado a temperatura ambiente.

7) Insira o pente entre as placas para formar de 15 ou 20 aberturas (poços).

8) Deixe polimerizar à temperatura ambiente por, aproximadamente, 30 min.

9) Remova o pente e preencha as aberturas (poços) com o tampão de empilhamento (1:4) contendo 0,1% de SDS, após e enxaguar 2x com água bidestilada. Esperar 30 min.



10). Aplique as amostras de proteína extraída, após encher as aberturas (poços) com tampão de corrida preparado fresco, após lavá-los duas vezes com a mesma solução.

### ELETROFORESE DE PROTEÍNA SOLUBILIZADA COM SDS

1) Marque as aberturas com números desejados e aplique extrato de proteína em cada uma das aberturas (poços) usando uma micropipeta. O volume a ser aplicado é em microlitros e depende da concentração do extrato de proteína.

2) O volume final em cada poço é ajustado a 15 $\mu$ L (com tampão de tratamento de amostra contendo 0.001% azul de Bromofenol) (linha de corrida) No caso de um extrato de proteína muito diluído, não deve ser aplicado um maior volume. Preencha os poços com tampão de corrida.

1-Prenda o reservatório superior em cima das placas e remova a parte de baixo (prenda bem os parafusos).

2-Imergir as placas de gel na cuba cheia com tampão de corrida Tris Glicina (não mais velho que 7 dias). Ligue o banho térmico a 15°C, verifique se as mangueiras não estão dobradas.

3-Coloque vagarosamente tampão de corrida (tris – glicina SDS) fresco no reservatório superior e verifique se não há vazamento

4- Ligue a corrente a 5,5 MA para cada placa( correspondente a 18 volts) e deixe correr a corrente constante, até que a linha de corrida alcance um nível de aproximadamente 9,5 cm do topo do gel de separação ( aproximadamente 12,6 cm; comprimento total do gel de separação mais empilhamento do gel (fundo de aberturas =14cm))

5-Desligue a corrente e tire as placas da cuba

6-Remova os grampos que seguram o gel, retire os espaçadores e insira uma espátula de plástico plana empurre para soltar as placas de vidro. Nunca use um objeto de metal; lascará as placas de vidro. Retire o gel de empilhando deixe permanecer gel de separação, faça a marca de início da aplicação das amostras e coloque o gel na solução de coloração.

7- Após 12 horas, retire o gel da solução de coloração e coloque na solução de descoloração (revelação). Troque a solução caso precise, quando as bandas eletroforéticas estiverem nítidas e o resto do gel transparente passe para a solução de fixação e armazene sob refrigeração.

Quando for secar o gel, se ele estiver com o tamanho adequado coloque-o na solução secante por aproximadamente 1 hora. Em um bastidor coloque uma folha de papel celofane umedecido em água destilada coloque o gel e coloque outra folha de celofane formando um sanduíche. Feche o bastidor e estique o papel e deixe secar. Caso o gel não esteja no tamanho adequado, deixe-o em água destilada por meia hora antes de colocar na solução secante.