

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E EFICIÊNCIA
SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* sp.
ISOLADAS DE ÁREAS DE MINERAÇÃO DE BAUXITA
REABILITADAS.**

JUCIANE SILVA DA MOTTA

2002

JUCIANE SILVA DA MOTTA

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE
ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* sp. ISOLADAS DE ÁREAS DE
MINERAÇÃO DE BAUXITA REABILITADAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Profa. Fátima M. S. Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

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

Motta, Juciane Silva da

Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de
Bradyrhizobium sp. isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas /
Juciane Silva da Motta. -- Lavras : UFLA, 2002.

43 p. : il.

Orientador: Fátima M. S. Moreira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

I. Área minerada. 2. Bauxita. 3. Diversidade fenotípica. 4. Simbiose. 5.
Revegetação. 6. *Bradyrhizobium*. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD-631.64

JUCIANE SILVA DA MOTTA

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE
ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* sp. ISOLADAS DE ÁREAS DE
MINERAÇÃO DE BAUXITA REABILITADAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 21 de março de 2002

Prof. José Oswaldo Siqueira

UFLA

Pesq. Antônio Álvaro C. Purcino

Embrapa

Profa. Fátima M. S. Moreira

UFLA

(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

“Grandes coisas fez o Senhor por nós, por isso estamos alegres. Salmo 126:3”

**Aos meus pais João e Juraneide,
aos meus irmãos Junison e Jucielen,
à Alexsandra e especialmente
à minha sobrinha Larissa,**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu Senhor e supremo benfeitor;

Aos meus pais pelo amor e compreensão incondicionais;

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao departamento de Ciência do solo, pela oportunidade de realização do curso ;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

À Embrapa, especialmente o Núcleo de Biologia Aplicada pela contribuição para a realização deste trabalho

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

À José O. Siqueira e Antônio A. C. Purcino, pelas contribuições ao trabalho;

À Edna pelo carinho, ajuda e amizade;

À professora Dulcinéia de Carvalho pela amizade e ajuda.

À Dea, Dona Yani e Raquel por terem sido uma família para mim;

Aos meus amigos Claudia, Vanessa, Ana Rosa, Juliano, Alexandre, Gevaldo, Cláudio, Lílían, Michela e Yanê pelos maravilhosos momentos que passamos juntos;

Aos colegas do curso de Pós graduação em Solos e Nutrição de Plantas pela agradável convivência;

Aos funcionários Delane, Marlene e Adriana pela amizade e auxílio;

À 1ª Igreja Presbiteriana de Lavras pela maravilhosa acolhida;

E finalmente, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	03
2.1 Atividade mineradora	03
2.2 Importância da FBN na sustentabilidade e recuperação de áreas degradadas.....	04
2.3 Importância do gênero <i>Bradyrhizobium</i> para a soja e o caupi ...	06
2.4 Importância da biodiversidade e da seleção de estirpes adaptadas.	07
2.5 Caracterização fenotípica	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Estirpes de rizóbio.....	14
3.2 SDS-PAGE de proteínas totais.....	16
3.3 Eficiência simbiótica das estirpes	17
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	20
4.1 SDS-PAGE de proteínas totais.....	20
4.2 Eficiência simbiótica	23
5 CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
ANEXOS	36

RESUMO

MOTTA, Juciane Silva da. **Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas.** Lavras: UFLA, 2002, 43p. (Dissertação - Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)*

Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium*, isoladas usando caupi (*Vigna unguiculata*) como planta isca, de solo da serra de Poços de Caldas sob diferentes estratégias de reabilitação após a mineração de bauxita. A análise dos perfis de proteína total de 15 estirpes, obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), mostrou grande diversidade com a formação de 6 grupos com similaridade de 80%. Quatro destes grupos continham estirpes tipo e referência de *B. japonicum* e de *B. elkanii*. Em relação à eficiência simbiótica com caupi em vasos de Leonard, a maioria das estirpes testadas foi altamente eficiente produzindo matéria seca da parte aérea da planta similar a da testemunha que recebeu adubação nitrogenada. Não houve relação do tipo de reabilitação aplicado às áreas de mineração com a eficiência simbiótica das estirpes ou com os grupamentos obtidos por análises fenotípica.

*Comitê Orientador: Fátima M. S. Moreira - UFLA (Orientadora)

ABSTRACT

MOTTA, Juciane Silva da. Phenotypic diversity and symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from rehabilitated bauxite mining areas. Lavras: UFLA, 2002. 43p. (Dissertation – Master of Science in Soil and Plant Nutrition)*

This work aimed to evaluate the phenotypic diversity and symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium* strains, isolated by using *Vigna unguiculata* (cowpea) as trap culture, from bauxite mining “Serra” areas with diverse rehabilitation strategies, located at Poços de Caldas, MG, Brazil. Total protein profiles obtained by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of 15 strains were distributed in 6 groups at 80% similarity. Four of these groups contained type or reference strains of *B.elkanii* and *B. japonicum*. The majority of the strains tested in Leonard jars for symbiotic efficiency with cowpea, were highly efficient and produced shoot dry matter weight similar to the control receiving mineral nitrogen. There was no relationship among the rehabilitation type applied to the mined areas with the symbiotic efficiency or phenotypic grouping of the strains.

* Guidance Committee: Fátima M. S. Moreira - UFLA (Major Professor)

1 INTRODUÇÃO GERAL

As atividades de mineração têm sido responsáveis pela degradação de extensas áreas em todo o mundo. O grau de sucesso da reabilitação de áreas degradadas é extremamente variável em função das condições químicas, físicas e biológicas do local e das estratégias adotadas no processo. Em função disto, as empresas mineradoras, os órgãos ambientais, as universidades e institutos de pesquisa têm se esforçado na busca de técnicas de recuperação que possam ser desenvolvidas e implantadas com sucesso nestas áreas.

A degradação causada pela mineração resulta do impacto do revolvimento e retirada do solo, da perda de vegetação e de outras formas de vida subterrânea, além da oxidação da matéria orgânica de alterações nas propriedades físicas do solo e da perda da atividade biológica (Franco et al., 1995). Os microrganismos do solo facilitam o desenvolvimento da estrutura edáfica e controlam a disponibilidade de nutrientes às plantas através da mediação dos ciclos biogeoquímicos dos elementos e do melhoramento de limitações químicas ou físicas (Tate, 1985). Os microrganismos, pela sua diversidade e dinâmica, e por estarem continuamente mudando e se adaptando às alterações ambientais, representam indicadores sensíveis às mudanças no solo, oriundas de modificações no seu manejo (Kennedy & Papendick, 1995), e também no tipo de cobertura vegetal (Prasad et al., 1994). Por isso, parâmetros microbiológicos, como mineralização do nitrogênio, biomassa, atividade e biodiversidade microbianas, são indicativos da qualidade do solo (Doran et al., 1994) e, consequentemente, podem ser usados para avaliar o sucesso da reabilitação de áreas mineradas.

A eficiência das bactérias que formam simbiose com leguminosas em fixar nitrogênio e a capacidade destas de sobreviverem no solo e formar nódulos dependem dos fatores genéticos inerentes aos simbiossiontes, além da interação com

o fatores edáficos e climáticos. A utilização da fixação biológica do nitrogênio atmosférico, viabilizada pela inoculação de sementes de soja (*Glicine max*) com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* (RELARE, 2000), representa uma economia de cerca de US\$1 bilhão que seriam gastos em fertilizantes nitrogenados. O feijão caupi, que é uma cultura de importante destaque na economia do norte e nordeste, constituindo o principal alimento protéico e energético do homem rural, é também um exemplo da importância do gênero *Bradyrhizobium*, pois esta leguminosa, apesar de ser promíscua, nodulando com vários gêneros de rizóbio, tem como inoculante recomendado bactérias do gênero *Bradyrhizobium*.

Nem sempre organismos fixadores selecionados em laboratório e casa de vegetação alcançam necessariamente seu máximo potencial no campo devido, entre outros fatores, à baixa competitividade com a população nativa ou à falta de adaptação às condições ambientais locais. Torna-se evidente, portanto, a necessidade de avaliar, quantificar e monitorar a diversidade de rizóbios nativos no solo, assim como a extensão de práticas perturbadoras do solo (agricultura, mineração, etc) sobre comunidades naturais destes organismos. A perda desta biodiversidade pode resultar na perda de estirpes inoculantes potenciais, assim como a diminuição do potencial de fixação de nitrogênio dos solos, prejudicando o desenvolvimento de práticas de recuperação e conservação dos solos.

O presente trabalho é parte integrante do projeto de pesquisa que tem como objetivo avaliar os Parâmetros Microbiológicos e Bioquímicos como Indicadores da Reabilitação do Solo em áreas de mineração, desenvolvido na empresa de mineração ALCOA Alumínio S.A., situada em Poços de Caldas (MG). Neste trabalho, avaliaram-se a diversidade fenotípica e a eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium*, isoladas de áreas da serra reabilitadas por diferentes estratégias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Atividade mineradora

A atuação dos processos de intemperismo sobre o maciço de rochas alcalinas do município de Poços de Caldas (MG) levou à formação de extensos depósitos de bauxita, os quais despertaram interesse econômico a partir de 1934. Nesta região ocorrem dois tipos de jazidas de bauxita: as jazidas de serra e as jazidas de campo (Brasil, 1979). A extração é realizada em mina a céu aberto, sendo que, atualmente, o processo da lavra do minério é feito, quase que na totalidade, mecanicamente, envolvendo a utilização de tratores e retro escavadeiras de grande porte, o que resulta em enorme movimentação de terra e interferência no meio ambiente.

As leis brasileiras são exigentes quanto à regulamentação das atividades mineradoras com vistas à recuperação de áreas nas quais se realizam atividades de mineração, bem como à minimização do impacto ambiental. Consta na nova Constituição Brasileira, no segundo parágrafo do artigo 225 do capítulo VI, que: "Aquele que explorar recursos minerais fica obrigado a recuperar o meio ambiente degradado, de acordo com solução técnica exigida pelo órgão público competente, na forma de lei". Em 1989, pela lei nº 6938 do Decreto nº 97632, esclarece-se que os novos empreendimentos no setor mineral devem apresentar ao órgão oficial competente um EIA (Estudo de Impacto Ambiental) /RIMA (Relatório de Impacto Ambiental), juntamente com o plano de recuperação da área degradada pela atividade de mineração (Brasil, 1990).

A reabilitação de áreas mineradas é recente no Brasil e, atualmente, tem sido realizada através da calagem, da adubação, da revegetação com plantas de rápido crescimento e resistentes aos estresses edáficos e da adição de matéria orgânica (Andrade, 1991; Lorenzo, 1991; Souza, 1997).

2.2 Importância da FBN na sustentabilidade e recuperação de áreas degradadas.

Em solos minerados, o nitrogênio é particularmente problemático porque, além da mineralização, devido à perturbação ocorrem aumentos nos processos de perdas de nitrogênio através da lixiviação, volatilização e desnitrificação. Assim, a imobilização microbiana do nitrogênio é um avançado processo de conservação de nitrogênio e outros nutrientes após o processo de reabilitação de mineração de bauxita (Adams & Attiwill, 1986). Williamson & Jhonson (1994) também destacam o potencial de perda do nitrogênio da superfície do solo durante o armazenamento e no processo de reabilitação. Portanto, o nitrogênio imobilizado na biomassa microbiana é importante forma de manutenção deste nutriente no solo.

Uma forma de aumentar o nitrogênio em áreas sob mineração é a utilização de espécies de plantas capazes de formar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (Franco, et al., 1994). Em áreas de mineração de bauxita na Austrália, Ward (2000) verificou aumento do nitrogênio nos primeiros 5cm do solo após nove anos de reabilitação utilizando leguminosas, sendo esta contribuição da ordem de 300 Kg N ha⁻¹, enquanto em área adjacente reabilitada com *Eucalyptus marginata*, ocorreram somente 63 Kg N ha⁻¹ nos primeiros 5cm do solo.

No Brasil, em áreas de mineração de bauxita em Trombetas (PA), a utilização de leguminosas de crescimento rápido, como *Acacia mangium* e *Albizia saman*, adicionou grandes quantidades de serrapilheira com baixa relação C/N, tendo sido observada a liberação de até 200 Kg N ha⁻¹ ano⁻¹, o que contribuiu para o sucesso da revegetação (Franco et al., 1994).

Carneiro (2000) e Melloni (2001) avaliaram a reabilitação de áreas de mineração de bauxita da Alcoa Alumínio S/A em Poços de Caldas, submetidas a diferentes estratégias de reabilitação. Estes autores concluíram que o plantio de

bracatinga como estratégia de reabilitação favoreceu o acúmulo de nitrogênio e carbono orgânico no solo, constituindo uma eficiente estratégia de reabilitação.

Apesar da existência de vários estudos sobre o uso de leguminosas na reabilitação, pouco se conhece sobre a diversidade, densidade e eficiência de microrganismos diazotróficos simbióticos com plantas, em solos de mineração de bauxita. A sobrevivência, competitividade e eficiência simbiótica do rizóbio são limitadas por diversos fatores, como espécie e nutrição vegetal, baixa fertilidade do solo; toxicidade por Al e Mn, decorrente da acidez; altas temperaturas; baixa ou elevada umidade no solo, e revolvimento, entre outros (Brockwell et al., 1995), normalmente encontrados em solos minerados.

Dentre os diversos grupos de microrganismos do solo, aqueles fixadores de N_2 atmosférico ou diazotróficos são considerados grupos funcionais -chave, uma vez que desempenham papel importante em processos relacionados à sustentabilidade do sistema solo-planta, incorporando nitrogênio nesses ecossistemas (Swift & Bignell, 2001) e formando um grupo com alta diversidade bioquímica, fisiológica e morfológica, podendo ser encontrados entre as bactérias, cianobactérias e actinomicetos e vivendo livremente no solo ou em simbiose com plantas. Dentre os que formam simbiose, destacam -se os rizóbios, que nodulam as raízes ou, excepcionalmente, o caule das plantas, atualmente distribuídos em 6 gêneros, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*, os quais são capazes de nodular, de modo específico ou promíscuo, uma variedade imensa de leguminosas. A maioria dos isolados de espécies florestais no Brasil são classificados como *Bradyrhizobium*, mas também formam simbiose com outros gêneros (*Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*) (Moreira et al., 1998).

As espécies de leguminosas arbóreas ou arbustivas, fixadoras de nitrogênio atmosférico, têm mostrado sua importância em sistemas

agroflorestais, agropastoris e, principalmente, em programas de recuperação de áreas degradadas. As espécies arbóreas apresentam uma função produtiva e outra protetora. Dentre as funções produtivas, pode-se destacar a produção de alimento, forragem, lenha, carvão, mel e outros produtos. Dentre as funções protetoras, pode-se ressaltar o controle de erosão, a estabilidade de taludes, barra ventos, aumento no estoque e qualidade da água, além de outras funções conservacionistas, frutos da associação de espécies fixadoras de nitrogênio (Faria et al.,1999) com sistemas radiculares mais profundos, com outras não fixadoras utilizadas para diversos fins.

2.3 Importância do gênero *Bradyrhizobium* para a soja e o caupi

A soja (*Glicine max*(L) Merrill) e o caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) são culturas de grande importância econômica e social. A soja é a mais importante oleaginosa cultivada no mundo. Da produção mundial total das principais oleaginosas (soja, algodão, amendoim, girassol, colza, linho, copra e palma), estimada em 274 milhões de toneladas para a safra 1997/98, a soja participou com 55,8% desse total (Geld, 1998). O sucesso da cultura reside na eficiência do processo de FBN, pois, para alcançar produtividade de 2.500 Kg . ha⁻¹, seria necessário aplicar de 300 a 400 Kg . ha⁻¹ de nitrogênio, o que inviabilizaria a cultura no país(Hungria et al 1999).

As bactérias capazes de nodular a soja estão classificadas em duas espécies: *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* (Jordan, 1984; Kuykendall et al.,1992). Em um levantamento com as estirpes que foram ou são utilizadas em estudos e inoculantes brasileiros, Boddey & Hungria (1997) constataram que a maioria se classificava na espécie *Bradyrhizobium elkanii*, e somente a CB 1809 (= SEMIA 586) e sua variante CPAC 7 (= SEMIA 5080), esta última recomendada em inoculantes comerciais, possuíam as características de *B. japonicum*.

O feijão caupi é uma cultura de importante destaque na economia nordestina e de amplo significado social, constituindo o principal alimento protéico e energético do homem rural. Apresenta alta rusticidade e adaptabilidade às condições de estiagem prolongadas e capacidade de se desenvolver em solo de baixa fertilidade (Oliveira & Carvalho, 1988). O caupi apresenta nodulação espontânea com a população nativa de rizóbio do solo das regiões tropicais, mas também pode responder à inoculação em áreas recém desmatadas (Martinazzo, 1989). Apesar de ser promíscuo, nodulando com vários gêneros de rizóbio (Lewin et al., 1987), a estirpe atualmente recomendada como inoculante para o caupi (SEMIA 6145) pertence ao gênero *Bradyrhizobium* [Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola. (RELARE, 2000)].

A procura por organismos eficientes, capazes de fornecer ou disponibilizar às plantas os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, é um passo importante que antecede a sua introdução como inoculantes para uma determinada cultura. Pelo fato de ainda não existirem inoculantes competitivos para o caupi, pois esta leguminosa nodula facilmente com as populações nativas de rizóbio, torna-se necessária a seleção de estirpes com alta eficiência e que possam competir com as populações nativas, garantindo, assim, um aumento na produção da cultura (Ferreira et al., 1998).

2.4 Importância da biodiversidade e da seleção de estirpes adaptadas

A fixação biológica de N_2 é mediada por uma parcela dos procariotos que, apesar de relativamente pequena, apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Diazotróficos podem ser encontrados entre os aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos e na maioria dos grupos filogenéticos representativos de Bactéria e de Archae. Nas Proteobacterias

encontram-se, por exemplo: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Azospirillum* spp., *Beijerinckia* spp., *Acetobacter diazotrophicus*, *Derxia* e *Azotobacter*. Entre as Archae, fixadores estão presentes entre os halófilos e os metanogênicos. Entre os metilotróficos, celulolíticos e bactérias envolvidas no ciclo do enxofre e até denitrificadores, que mediam justamente o processo inverso, também se encontram fixadores de N₂ (Moreira & Siqueira, 2002). A alta diversidade destes 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 hábitat terrestres.

Para simbiose de rizóbio com leguminosas arbóreas tropicais, foi observada uma alta frequência de estirpes de rizóbio tolerantes a pH ácido (Silva & Franco, 1984; Souza et al., 1984; Moreira, 1991; Lesueur et al., 1993). Alguns resultados sugerem que altas concentrações de alumínio, mais que acidez (pH 4,5), são o principal fator de seleção para estirpes de *Bradyrhizobium* manterem-se em altas populações em condições naturais e demonstram tolerância de algumas estirpes a até 100 µM AlCl₃ em meio de cultura líquido. Melloni (2001) isolou estirpes de rizóbio em áreas de mineração da ALCOA Alumínio, em Poços de Caldas –MG, e entre os isolados obtidos de nódulos de caupi a maioria apresentou características culturais semelhantes as de *Bradyrhizobium*, embora também tenham sido encontrados representantes dos demais gêneros.

Para Brockwell et al. (1982) e Thompson (1988), citados por Santiliana et al. (1998), características desejáveis em uma estirpe devem incluir, entre outras, habilidade para fixar N₂, competitividade por sítios de nodulação, apropriada capacidade de multiplicar-se em meio líquido e adequada sobrevivência em turfa e sobre a semente. Por outro lado, diferenças nessas características entre estirpes de rizóbio têm sido relatadas indicando variabilidade dentro do gênero, o que permite selecionar, dentre estirpes eficientes, as mais recomendadas para a produção de inoculantes.

Nem sempre organismos fixadores selecionados em laboratório e em casa de vegetação alcançam, necessariamente, seu máximo potencial no campo devido, entre outros fatores, à baixa competitividade ou à falta de adaptação às condições ambientais locais. Desta forma, é necessário monitorar a diversidade de rizóbios no solo, pois a perda da biodiversidade pode ocasionar a perda de estirpes inoculantes potenciais, assim como a diminuição do potencial de fixação de nitrogênio dos solos, prejudicando o desenvolvimento de práticas de recuperação e conservação dos solos (Pereira, 2000).

A seleção de estirpes eficientes para maximizar a fixação de nitrogênio em espécies vegetais de importância econômica tem sido um dos principais alvos da pesquisa. Além da eficiência, estas estirpes devem apresentar também outras características, como serem boas competidoras por sítios de infecção em relação às estirpes nativas e terem boa sobrevivência e adaptação às condições edáficas e climáticas.

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 e luminosidade), a capacidade de nodular e fixar nitrogênio de um número elevado de estirpes, testadas separadamente em tubos ou 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 e vermiculita esterilizadas e solução nutritiva livre de nitrogênio em vasos de Leonard, na casa de vegetação. Nos estádios seguintes, as estirpes selecionadas são testadas em vasos com solo na casa de vegetação e no campo. Estirpes que não tenham boa performance nos estádios iniciais de seleção são eliminadas, pois se não estabelecem simbiose eficiente em condições nutricionais e ambientais ótimas, também não o farão nas condições mais estressantes do solo (Moreira & Siqueira, 2002).

2.5- Caracterização fenotípica

A caracterização de uma bactéria envolve a descrição qualitativa das muitas propriedades relativas à morfologia, cultivo, nutrição, bioquímica, metabolismo, ácidos nucleicos, patogenicidade e ecologia, as quais são pré-requisitos para a identificação e base da sistemática desse grupo de organismos. O perfil eletroforético de proteínas, por exemplo, tem fornecido valiosas informações adicionais nos estudos de identificação e sistemática de microrganismos e tem sido aplicado com sucesso para vários microrganismos de importância médica e ecológica.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de proteínas totais e proteínas solúveis de bactérias produz padrões de bandas que podem ser considerados como marcas (impressões) altamente específicas dentro de diferentes Taxa de bactérias. Uma das técnicas eletroforéticas mais usadas é a eletroforese de proteínas totais (ou de proteínas da parede celular) na presença de um detergente aniônico duodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS se liga às regiões hidrofóbicas de proteínas para separar a maioria em suas unidades componentes, faz com que as proteínas percam seu efeito de carga específica, separando-se devido às suas diferenças de peso moleculares. Esta está entre as técnicas que permitem a melhor resolução de bandas, tornando possível a avaliação em nível qualitativo (ausência/presença) e quantitativo (diferença de concentração de polipeptídeos existentes em uma amostra) (Carraro, 1990).

Após a separação física no gel, as proteínas são detectadas através de procedimentos de coloração apropriados, formando padrões de bandas. Proteínas com massas diferindo em cerca de 2% (diferença de cerca de 10 aminoácidos) podem geralmente ser distinguidas (Westermeier et al., 1993).

A resolução em géis de poliacrilamida foi melhorada com a introdução, na década de sessenta, do sistema descontínuo, em que dois sistemas de géis, gel separador e gel concentrador, e de solução tampão dos géis (Tris-HCl) diferentes

daqueles dos eletrodos (Tris glicina) são utilizados. Enquanto no gel concentrador as moléculas de proteína concentram-se numa banda estreita e compacta, no gel separador elas se separam de acordo com os respectivos tamanhos moleculares (peneiramento molecular) (Alfenas et al., 1991).

Embora haja a necessidade de manter as condições de cultivo das bactérias padronizadas, a eletroforese de proteínas oferece algumas vantagens. A estabilidade do padrão eletroforético e a comparação dos perfis fornecem uma medida segura da relação taxonômica de amostras analisadas. Taxonomicamente, este método diferencia níveis de espécies e subespécies (figura 1).

Família	Gênero	Espécie	Subespécie	Estirpe
Sequenciamento do DNA				
Sequenciamento 16SrDNA				
ARDRA				
Reassociação DNA-DNA				
tRNA-PCR				
ITS-PCR				
RFLP LFRFA PFGE				
Isozima multilocus				
SDS-PAGE				
AFLP				
RAPD's APPCR				
Rep-PCR				

FIGURA 1 – Resolução relativa de vários fingerprints e técnicas de DNA. (Modificado de Rademaker & Bruijn, 1997).

Os perfis eletroforéticos obtidos em condições padronizadas podem ser armazenados em bases de dados (como registro de densitometria) e comparados por técnicas de análise numérica. Uma vez assim, bibliotecas de referências podem ser construídas para a identificação de novos isolados. Vários estudos têm mostrado o potencial da eletroforese de proteína na caracterização de diferentes isolados de bactérias fixadoras de N₂ (Moreira et al., 1993; De Lajudie et al., 1994; Dupuy et al., 1994; Pereira, 2000) e fungos ectomicorrízicos dos gêneros *Pisolithus* (Burgess et al., 1995; Souza, 2000) e *Suillus* (Zhu et al., 1988; Sem, 1990; Keller, 1992) entre outros.

Resultados baseados em eletroforese de proteínas totais (SDS -PAGE) demonstraram alta diversidade entre 171 isolados de rizóbio, 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 plurifarum* sp. nov. (De Lajudie et al., 1998) e *Azorhizobium johanense* (Moreira et al., 1999). Dupuy (1994) analisou 84 isolados de *Bradyrhizobium* por SDS-PAGE para determinar a posição taxonômica destes organismos e a relação entre isolados obtidos na superfície e em profundidade no solo. A maioria dos isolados foi distribuída em 8 grupos eletroforéticos que continham estirpes representativas de *B. japonicum*, *B. elkanii* e *Bradyrhizobium* sp. Esta técnica também tem sido usada na descrição de novas espécies de rizóbio, como, por exemplo, o *Mesorhizobium chacoense* (Velazquez et al., 2001), *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus et al., 1988) e *Rhizobium yanglingense* (Tan et al., 2001).

Milnitsky et al. (1997) usaram SDS-PAGE de proteína total para a caracterização de rizóbios que nodulam leguminosas arbóreas nativas no Uruguai. Chen et al. (2000) também fizeram uso desta técnica para caracterizar

isolados que nodulam *Canavalia rosea* na China. Outros autores também têm feito uso desta técnica para a caracterização fenotípica de isolados de rizóbio (Willems et al., 2000) e outros microrganismos, como *Campilobacter* (Vandame et al., 1990; Aydin et al., 2001), *Aspergillus* (Rath, 2001), *Enterococcus* (Andrigheto et al., 2001) *Acinetobacter* (Alexander et al., 1984), entre outros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Estirpes de rizóbio

As estirpes de rizóbio estudadas foram isoladas de amostras de solo de áreas da ALCOA Alumínio S/A, localizadas na serra de Poços de Caldas, de 8 locais sendo: um com vegetação nativa e os demais áreas reabilitadas por diferentes coberturas vegetais e com tempo de reabilitação conforme tabela 1.

TABELA 1. Origem das estirpes de *Bradyrhizobium* e de crescimento rápido(*).

Area de Origem	Estirpes
Recém-minerado. Coberto por capim gordura, feijão guandu e espécies arbóreas nativas. (6 meses)	UFLA 3-162
	UFLA 3-163
	UFLA 3-164
	UFLA 3-165
	UFLA 3 156
Braquiaria, feijão guandu e espécies arbóreas nativas. (2 anos)	UFLA 3 154
	UFLA 3-166
	UFLA 3-167*
Mata de espécies arbóreas nativas e sub-bosque bem desenvolvido, com serrapilheira adicionada. (10 anos)	UFLA 3-168
	UFLA 3 155
Referência de mata fechada com espécies arbóreas (sem alteração antrópica).	UFLA 3-169
	UFLA 3 160
Bracatinga e vegetação rasteira e arbustiva, processo de sucessão lento. (14 anos)	UFLA 3-170
	UFLA 3 152
Eucalipto (<i>E. saligna</i>) e sub-bosque bem desenvolvido (gramíneas e arbustos). (16 anos)	UFLA 3 159
Bracatinga e sub-bosque coberto por capim gordura. (6 anos)	UFLA 3 153
	UFLA 3-171
Mata de espécies nativas incluindo bracatinga, sub bosque fechado, serrapilheira espessa, troncos caídos. (18 anos)	UFLA 3-172
	UFLA 3 158*
Estirpe de referência de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> isolada no Rio Grande do Sul	SEMIA 587
Estirpe de referência de <i>B. japonicum</i>	UFLA 1 457
Estirpe tipo de <i>B. elkanii</i> proveniente do Japão	USDA 76 ^T
Estirpe tipo de <i>B. japonicum</i> proveniente dos EUA	ATCC 10324 ^T
Estirpe de referência de <i>B. elkanii</i> isolada em Manaus-AM	INPA 173 A

As estirpes foram isoladas em meio YMA por Melloni, Nóbrega, Moreira e Siqueira (em preparação) e mantidas sob refrigeração, sendo suas características culturais apresentadas na tabela 2.

TABELA 2. Características culturais de estirpes de *Bradyrhizobium* e crescimento rápido isoladas de áreas mineradas e recuperadas e de mata nativa da serra de Poços de Caldas.

Isolado	Dias ¹	Diâm. Col. ²	pH do meio ³	Produção de Goma	Cor	Absorção de Indicador
<i>Bradyrhizobium</i>						
UFLA 3-162	6	1	AL	Alta	Amarela	Não
UFLA 3-165	6	<1	AL	Média	Branca	Não
UFLA 3-154	6	<1	AL	Média	Branca	Não
UFLA 3-152	6	2	AL	Alta	Amarela	Não
UFLA 3-166	10	>4	N	Alta	Branca	Não
UFLA 3-169	10	>4	N	Média	Branca	Não
UFLA 3-159	10	2	N	Média-Alta	Amarela	Sim
UFLA 3-172	10	2	N	Média	Branca	Sim
UFLA 3-155	10	3	N	Alta	Amarela	Sim
UFLA 3-168	10	3	N	Alta	Amarela	Sim
UFLA 3-160	10	<1	AL	Baixa	Branca	Não
UFLA 3-156	10	1	AL	Média-Baixa	Branca	Não
UFLA 3-170	10	2	AL	Média	Branca	Sim
UFLA 3-171	10	2	AL	Baixa	Amarela	Sim
UFLA 3-153	10	2-3	AL	Média-Alta	Branca	Sim
UFLA 3-163	10	>4	AL	Média	Amarela	Sim
<i>Crescimento rápido³</i>						
UFLA 3-158	4	4	AC	Alta	Amarela	Não
UFLA 3-167	4	3	AC	Alta	Amarela	Sim

1. Tempo para crescimento de colônia isolada;

2. Diâmetro da colônia em mm

3. AL – alcalino, AC – ácido; N – neutro;

As estirpes estudadas apresentaram características culturais típicas de *Bradyrhizobium*, como: crescimento lento (mais de 6 dias para aparecimento de colônias isoladas), produção de polissacarídeos extracelulares de médio a alto e reação alcalina em meio de cultura contendo extrato de levedura e manitol – meio YMA (Vincent, 1970). Além destas, foram usadas como referência as estirpes: USDA 76^T (Estirpe tipo de *Bradyrhizobium elkanii* Kuykendall et al.,1992); SEMIA 587, recomendada como inoculante para soja (*B. elkanii* Rumjanek et. al., 1993); INPA 173 A (Estirpe referência de *Bradyrhizobium*

elkanii, Moreira et al., 1998); UFLA 1 457 (Estirpe referência de *Bradyrhizobium japonicum* Moreira et al., em preparação) e ATCC 10324^T (Estirpe tipo de *Bradyrhizobium japonicum*). Além destas, também foram utilizadas como referência duas estirpes de crescimento rápido e acidificantes, isoladas das áreas reabilitadas (UFLA 3 158, UFLA 3- 167), citadas nas tabelas 1 e 2.

3.2- SDS-PAGE de proteínas totais

As estirpes estocadas foram crescidas em meio de cultura sólido YMA. Após o crescimento em placa, inocularam -se as mesmas em 50 mL de meio líquido TY constituído por extrato de levedura (0,75g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0,454 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ .7 H₂O (1,79 g.L⁻¹) e CaCl₂ .2 H₂O 20% (5mL.L⁻¹), com pH 6,8-7,8. O crescimento se deu sob agitação constante por 4 dias. O meio com as bactérias foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao “pelet” formado foi adicionado o tampão de extração constituído por Tris-HCl pH 7,5 (50 mM), NaCl (200 mM), Glicerol 5%, DTT (1mM) e PMSF (1mM). Ao extrato adicionou-se o tampão da amostra contendo SDS para solubilização das proteínas, que foram, posteriormente, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilami da (PAGE) pelo método Laemmli (1970), com modificações descritas por Jackmam (1985), conforme empregado por Moreira et al.(1993) para outras estirpes de rizóbio tropicais. Para eletroforese, utilizou -se um gel de sistema descontínuo com concentração 12,5% para o gel separador e 6% para o concentrador. Foram adicionadas ao gel 100 µL de cada amostra. As bactérias foram agrupadas com base no seu padrão protéico. Os grupos formados foram comparados com estirpes tipo (ATCC 10324^T - *B. japonicum*, USDA 76^T- *B. elkanii*) e referências de *Bradyrhizobium* (UFLA 1 457, *B. japonicum*; INPA 173 A, *B. elkanii* e SEMIA 587, *B. elkanii*).

Na avaliação dos géis, cada banda foi considerada como um único caráter, e isto possibilitou a construção de uma matriz de zero a um. Para estimar a similaridade entre os isolados, utilizou-se o programa NTSYS 1.8 (Slice, Kim e Walker, 1994). A análise binária dos perfis possibilitou a construção de uma matriz de dissimilaridade a partir do qual foi construído um dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA.

3.3- Eficiência Simbiótica

Para avaliação da eficiência simbiótica, a maioria das estirpes foi selecionada a partir dos grupos formados por SDS-PAGE e representantes de cada área reabilitada. As estirpes selecionadas foram as seguintes: UFLA 3-165, UFLA 3-162 (G4), UFLA 3-166 (G3), UFLA 3-168 (G1), UFLA 3-163 (G2), UFLA 3-169 (G5), UFLA 3-170 (G2), UFLA 3-164 (G4), UFLA 3-159 (G4), UFLA 3-154 (G2), UFLA 3-153 (G6), UFLA 3-172 (G6) e SEMIA 6145 [estirpe recomendada pela IX Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE) para inoculação do caupi]. O experimento foi realizado em vasos de Leonard, em casa de vegetação (figura 2). Os tratamentos foram: inoculação de cada isolado individualmente, num total de 12; inoculação da estirpe recomendada como inoculante (SEMIA 6145); tratamento sem nitrogênio e sem inoculação e tratamento com nitrogênio em que o nitrogênio foi aplicado em 3 parcelas com intervalos de 10 dias, perfazendo um total de 240mg de $N-NO_3NH_3$ por vaso.



FIGURA 4. Experimento com plantas de caupi inoculadas e sem inoculação em vasos de Leonard, em casa de vegetação.

A parte superior dos vasos de Leonard (Vincent, 1970) continha uma mistura de areia e de vermiculita (1:1), e a parte inferior, solução nutritiva com a seguinte composição em g L⁻¹: CaCl₂.H₂O 0,147; KH₂PO₄ 0,68; MgSO₄7H₂O 0,61; K₂SO₄ 0,43; FeCl₃ 6H₂O 0,037, micronutrientes (H₃BO₃ 0,715; MnSO₄.H₂O 0,507; ZnSO₄.H₂O 0,055; CuSO₄.H₂O 0,02; NaMoO₄.H₂O 0,022; e CoCl₂ 0,0075 mg L⁻¹) e pH ajustado para 6,8. Os vasos foram autoclavados por 45 minutos, a uma pressão de 1,5 Kg/cm² e a 127° C. A solução nutritiva foi autoclavada por 20 min, a 127° C. Foram semeadas seis sementes por vaso. Todas as sementes foram desinfetadas superficialmente com etanol 70% por 5 minutos e Hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. No momento da semeadura, procedeu-se a inoculação utilizando-se, para tal, 1ml de YM semi-sólido com as estirpes na fase log de seu crescimento (4 dias de cultivo a 28° C) junto às sementes. Decorridos três a cinco dias da germinação, foi feito o desbaste deixando-se uma planta por vaso. Os níveis de solução nutritiva nos

vasos foram reabastecidos periodicamente com solução nutritiva autoclavada. As plantas foram colhidas no estágio de florescimento para determinação da matéria seca da parte aérea e avaliação do número e peso de nódulos secos.

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento e conduzido no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciências do Solo (DCS/UFLA) em novembro/dezembro de 2001. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SDS-PAGE de proteína total

Os perfis eletroforéticos das estirpes de rizóbio obtidos pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) podem ser visualizados na figura 3. Foram identificadas 23 bandas polimórficas e 5 monomórficas (anexo).

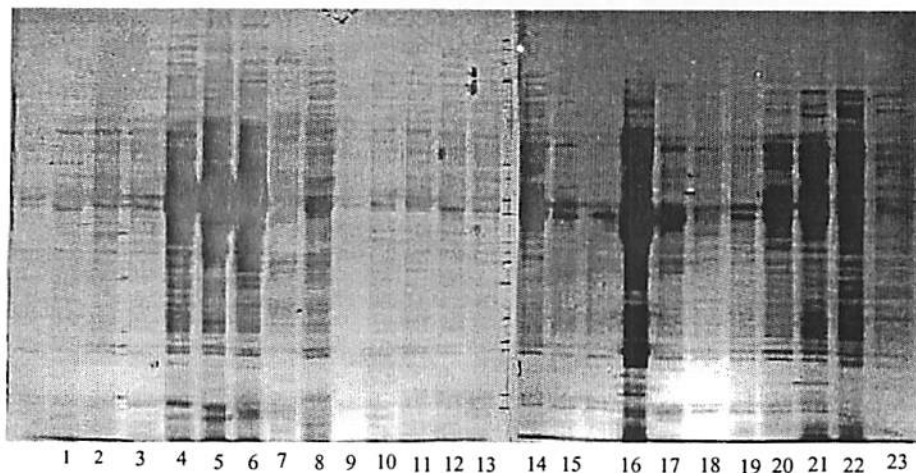


FIGURA 1. Perfis de proteína total das estirpes de rizóbio obtidos pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). 1- UFLA 3-152; 2- SEMIA 587; 3- UFLA 3-163; 4- UFLA 3-168; 5- UFLA 3-169; 6- UFLA 3-160; 7- UFLA 3-167; 8- UFLA 1-457; 9- UFLA 3-166; 10- INPA 173 A; 11- UFLA 3-154; 12- UFLA 3-170; 13- UFLA 3-171; 14- UFLA 3-164; 15- UFLA 3-155; 16- UFLA 3-158; 17- UFLA 3-172; 18- ATCC 10324^T; 19- UFLA 3-153; 20- USDA 76^T; 21- UFLA 3-159; 22- SEMIA 587; 23- UFLA 3-162.

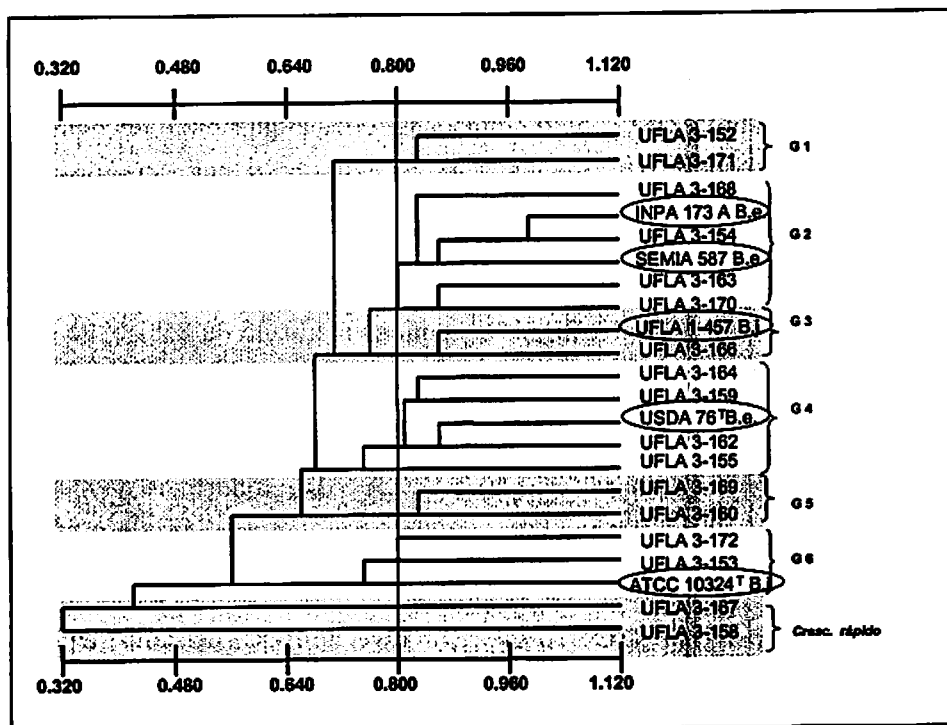


FIGURA 4. Dendrograma de similaridade entre as estirpes de *Bradyrhizobium* e 2 estirpes de crescimento rápido construído com base na análise dos perfis protéicos obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Estirpes tipo ^(T) e referência de *Bradyrhizobium japonicum* (B.j.) e *B. elkanii* (B.e.)

Analisando o dendrograma formado pelo agrupamento dos perfis protéicos (figura 4), verificou-se a formação de 4 grupos com similaridade entre 80 e 90% e 2 grupos com similaridade entre 75 e 80%. No grupo 1, a similaridade entre as estirpes foi de 86,4% e reuniu as estirpes UFLA 3-152 (bracatinga e vegetação rasteira) e UFLA 3-171 (bracatinga e capim gordura); o grupo 2 reuniu as estirpes UFLA 3-168 (espécies arbóreas nativas), UFLA 3-154 (braquiária, feijão guandu e espécies nativas), UFLA 3-163 (recém minerado) e UFLA 3-170 (bracatinga e vegetação rasteira), juntamente com as referências de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587, INPA 173A, ao nível de 85%. A SEMIA 587 foi isolada no Rio Grande do Sul, e foi usada como inoculante da

soja entre 1968 e 1975 e continua sendo usada desde 1979. A INPA 173A foi isolada de nódulos de *Tachigali paniculata* em solo de várzea de Manaus-AM. O grupo 3 uniu a estirpe UFLA 3-166 (braquiária e feijão guandu) à referência de *B. japonicum* UFLA 1-457, com nível de similaridade de 89%. O grupo 4 uniu as estirpes UFLA 3-164 (recém minerado), UFLA 3-159 (Eucalipto), UFLA 3-162 (recém minerado) e UFLA 3-155 (espécies arbóreas nativas) à estirpe referência de *B. elkanii* USDA 76^T, com similaridade de 85% entre os isolados. Esta estirpe referência foi isolada na Nova Zelândia, de um nódulo proveniente do Japão (Dupuy et al., 1994). O grupo 5 foi formado pelas estirpes UFLA 3-160 (referência de mata fechada) e UFLA 3-169 (referência de mata fechada), com similaridade de 85%; e o grupo 6 uniu as estirpes UFLA 3-172 (espécies nativas e bracatinga), UFLA 3-153 (bracatinga e capim gordura) à estirpe tipo de *B. japonicum* ATCC 10324^T, com nível de 76,8% de similaridade. As estirpes UFLA 3-167 (braquiária e feijão guandu) e UFLA 3-158 (espécies nativas e bracatinga), que apresentaram características culturais típicas dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* (crescimento rápido e acidificação do meio YMA), não foram agrupados com as demais típicas de *Bradyrhizobium*. Moreira et al. (1993), através da análise de proteína total por SDS-PAGE, verificaram que a maior parte das estirpes isoladas de espécies florestais da Amazônia e da Mata Atlântica pertencia ao gênero *Bradyrhizobium* e que havia grande diversidade dentro deste gênero. Também Dupuy et al. (1994), estudando 84 estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos de *Acacia albida* do Senegal, através da análise de proteína total SDS-PAGE para determinar a posição taxonômica destes organismos e a relação entre estirpes obtidas na superfície e em profundidade no solo, encontraram alta diversidade por esta análise fenotípica. A maioria das estirpes foi distribuída em 8 grupos eletroforéticos que continham estirpes representativas de *B. japonicum*, *B. elkanii* e *Bradyrhizobium* sp.

A expressão do genoma microbiano poderia codificar 3300 proteínas moleculares, mas na realidade sintetiza cerca de 2000, que constituem a célula microbiana (Darnell et al., 1990). Por isso a diversidade genotípica entre as estirpes estudadas pode ser maior do que a expressa pela análise de proteínas. Por exemplo, Moreira et al. (em preparação) analisaram, entre outras, as estirpes UFLA 3-152, UFLA 3-160, UFLA 3-154, UFLA 3-159, UFLA 3-153, UFLA 3-156, UFLA 3-158 e UFLA 3-155, que foram estudadas também no presente trabalho. Para tal foi usada a técnica de REP -PCR, que amplifica seqüências palindrômicas do DNA altamente conservadas e repetitivas. Seus resultados mostraram uma alta diversidade entre estas estirpes, com dissimilaridades da ordem de 80%.

4.2 Eficiência simbiótica

Os nódulos (figura 5) formados nas raízes das plantas foram grandes e uniformes e com coloração interna vermelha na maior parte dos tratamentos de inoculação. O número de nódulos (tabela 2) foi estatisticamente igual para todas as estirpes, exceto para SEMIA 6145, UFLA 3-169 e UFLA 3-166. Não foi verificada a presença de nódulos nas testemunhas com e sem nitrogênio. O parâmetro peso de nódulos secos mostrou-se semelhante para a maioria das estirpes, exceto para SEMIA 6145, UFLA 3-169 e UFLA 3-166, que apresentaram um peso seco muito inferior ao das demais. Houve correlação entre as variáveis MSPA e peso de nódulo seco ($r = 0,78$), MSPA e número de nódulos ($r = 0,70$) e número de nódulos e peso de nódulos secos ($r = 0,88$), ao nível de significância de 1%.

TABELA 3. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), número e peso dos nódulos secos de caupi inoculado com diferentes isolados de *Bradyrhizobium*, obtidos de áreas de mineração de bauxita reabilitadas.

Tratamentos	MSPA (g)	Número de Nódulos	Peso de Nódulos (g)
Testemunha S/N	0,450 b	-	-
SEMIA 6145	1,776 b	30 b	0,166 b
UFLA 3-169	2,246 b	96 b	0,213 b
UFLA 3-166	3,436 b	77 b	0,423 b
UFLA 3-168	4,810 a	130 b	0,720 a
UFLA 3-163	4,850 a	169 a	0,526 a
UFLA 3-172	4,963 a	237 a	0,593 a
UFLA 3-154	4,973 a	169 a	0,600 a
Testem. Nitrogenada	5,310 a	-	-
UFLA 3-153	5,383 a	186 a	0,573 a
UFLA 3-165	5,536 a	158 a	0,566 a
UFLA 3-159	5,590 a	105 a	0,476 a
UFLA 3-164	6,423 a	162 a	0,623 a
UFLA 3-162	7,416 a	204 a	0,966 a
UFLA 3-170	8,156 a	203 a	0,803 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Schot Knott a 5% de probabilidade.

Não houve diferença estatística para a produção de matéria seca do caupi entre o tratamento com nitrogênio e os tratamentos com inoculação para a maioria das estirpes testadas (UFLA 3-168, UFLA 3-163, UFLA 3-172, UFLA 3-154, UFLA 3-153, UFLA 3-165, UFLA 3-159, UFLA 3-164, UFLA 3-162 e UFLA 3-170), com exceção das estirpes UFLA 3-166, UFLA 3-169 e SEMIA 6145 (tabela 3). As estirpes UFLA 3-170 e UFLA 3-162 apresentaram uma produção de MS bem superior (8,15g e 7,41g) a da estirpe comercial recomendada pela RELARE (2000), SEMIA 6145 (1,77g) (figura 6 e 7), o que indica que as áreas reabilitadas apresentam uma fonte significativa de estirpes eficientes, pelo menos para caupi, pois não se pode inferir a relação destas estirpes com outras espécies de



FIGURA 5. Raiz de planta de caupi inoculada com o isolado UFLA 3-153

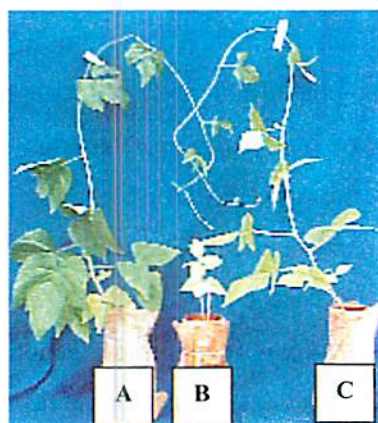


FIGURA 6. Plantas de caupi adubadas com N (C), inoculada com a estirpe UFLA 3-153 (A) e testemunha sem adubação nitrogenada e sem inoculação (B).

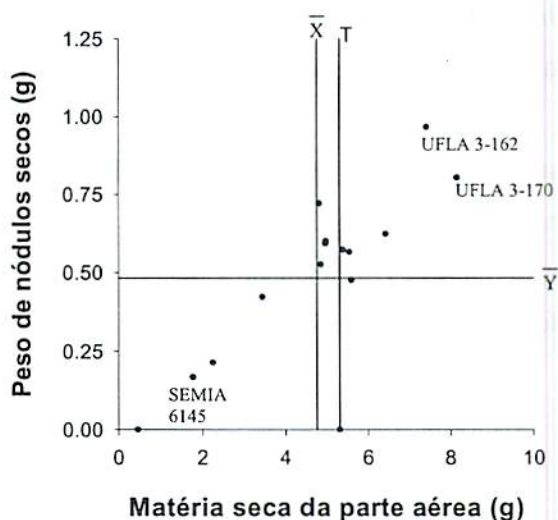


FIGURA 7. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas. $\bar{X}$ = média da produção de matéria seca da parte aérea; $\bar{Y}$ = média do peso de nódulos secos (g); T= testemunha nitrogenada.

leguminosas devido à possibilidade de diferentes relações simbióticas. Pereira et al. (submetido) também observaram, em seu trabalho, que a maioria dos isolados nativos da Amazônia testados em caupi apresentou eficiência simbiótica superior à da SEMIA 6145.

Considerando que existem apenas três espécies de *Bradyrhizobium* descritas até o momento (*B. japonicum*, *B. elkanni* e *B. liaoningense*), e que vários grupos fenotípicos e genotípicos não se agruparam com estirpes tipo ou referência das duas primeiras espécies e também não apresentaram a característica cultural da terceira (crescimento muito lento), estes resultados indicam uma grande possibilidade de existência de novas espécies a serem descritas.

CONCLUSÕES

As estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de áreas mineradas de bauxita reabilitadas apresentam alta diversidade fenotípica e podem representar novas espécies do gênero.

A maioria das estirpes apresentou alta eficiência simbiótica com caupi, podendo, assim, ser recomendadas para testes de campo.

Não houve relação entre os grupamentos fenotípicos, e eficiência simbiótica com as áreas de origem das estirpes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADAMS, M. A.; ATTWILL, P. M. Nutrient cycling and nitrogen mineralisation in eucalyptforest of south-eastern Australia. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 92, n. 3, p. 341-362, 1986.
- ALEXANDER, M.; ISMAIL, F.; JACKMAN, P. J. H.; NOBLE, W. C. Fingerprint *Acinetobacter* strains from clinical sources by numerical analysis of electrophoretic protein patterns. *Journal of Medical Microbiology*, London, v. 18, n. 1, p. 55-64, 1984.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUCE, W.; PASSADOS, G. C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: SIF, 1991. 292p.
- ANDRADE, L. A. B. L. de. Associação micorrízica e matéria orgânica no crescimento de *Brachiária decumbens* em estéril de mineração de ferro e bauxita. 1991. 53p. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- ANDRIGHETTO, C.; KNIFF, E.; LOMBARDI, A.; TORRIANI, S.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; DELLAGLIO, F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from italian cheeses. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 68, n. 2, p. 303-316, May 2001.
- 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.
- BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. *Biology and Fertility Soils*, Berlin, v. 25, n. 4, p. 407-415, Oct. 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quanties of proteins utilizing the principle of protein -dye binding. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério das Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Projeto Sapucaí: Estado de Minas Gerais e São Paulo. Brasília, 1979. 299p. Relatório Geologia, 4.

BRASIL. Ministério do Interior. Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação.** Brasília, 1990. 96p.

BROCKWELL, J.; BOTOTMLEY, P. J.; THIES, J. E. Manipulation of rhizobia microflora for imposing legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant and Soil*, The Hague , v. 174, n. 1/2, p. 143- 180, July 1995.

BURGESS, T.; DELL, B.; MALAJCZUK, N.; BERNARD, D. Variation in *Pisolithus* based on basidiome and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. *Micological Research*, Cambridge, v. 99, n. 1, p. 1-13, Jan. 1995.

CARNEIRO M. A. C. **Características bioquímicas do solo em duas cronosequências de reabilitação em áreas de mineração de Bauxita** 2000. 166p. Tese (Doutorado em solos e nutrição de plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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, SP.

CHEN, W. M.; LEE, T. M.; LAN, C. C.; CHENG, C. P. Characterization of halotolerant rhizobia isolated from root nodules of *Canavalia rosea* from seaside areas. *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, v. 34, n. 1, p 9-16, Oct. 2000.

DARNELL, J. E.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. **Molecular cell biology.** 2. ed. New York: Scientific American Books, 1990. 1105p.

DE LAJUDIE , P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M. A.; LINDSTROM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Chracterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Reading , v. 48, n. 2, p. 369-382, Apr. 1998.

DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. 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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Reading, v. 44, n. 4, p. 715-733, Oct. 1994.

DIAS, L. A. dos S. Analises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: UFV, 1998. 574p.

DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Ed.). *Defining soil quality for a sustainable environment*. Wisconsin: American Society of Agronomy, 1994.

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.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDENBRUAENE, I. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Bradyrhizobia* Nodulating the Leguminous tree *Acacia albidia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v. 44, n. 3, p. 461-473, July 1994.

FARIA, S. M. de; OLIVARES, F. L. de; LIMA, H. C.; MELO, R. B.; XAVIER, R. Nodulação em florestais, especificidade hospedeira e as implicações na sistemática de Leguminosae. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7.; SINPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2.; *FertBIO*, 98. *Anais...* Caxambu: UFLA, 1999. Cap.5, p. 667-686.

FERREIRA, E. P. B.; ZILLI, J. E.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G. Avaliação da Eficiência de Isolados de Rizóbio de Crescimento Rápido que Nodulam *Caupi* (*Vigna unguiculata* L. Walp) Obtidos a partir de Solos do Sistema Integrado de Produção Agroecológica. *Fert bio* 1998

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. Revetação de áreas de mineração de bauxita em Porto Trombetas-PA com

leguminosas arbóreas noduladas e micorrizadas. In: SIMPOSIO SUL AMERICANO, 1.; SIMPOSIO NACIONAL: recuperação de áreas degradadas, 2. , 1994, Foz do Iguaçu. *Anais...* Curitiba: UFPR, 1994. 679p.

FREIRE-MAIA, N. **Genética de populações humanas**. São Paulo: HUCITEC/USP, 1974. 216p.

GELD, S. Boas vindas ao futuro. *Agroanalysis*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 7, p. 23-24, jul. 1998

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; VARGAS, M. A. T.; ANDRADE, D. S. Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas de grãos. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7.; SINPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5.; REUNIÃO BRASILEIRA DDE BIOLOGIA DO SOLO, 2.; *FertBIO*, 98. *Anais...* Caxambu: UFPA, 1999. Cap. 5, p.597-620.

JACKMAN, P. J. H. Bacterial Taxonomy based on Electrophoretic whole -cel Protein Patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (Eds). *Chemical methods in bacterial systematics* . London: Academic Press, 1985. p.119-129.

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

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.

KENNEDY, A . C.; PAPENDICK, R. I. Microbial characteristics of soil quality. *Journal of Soil and Water Conservation*, Ankeny, n.3, p. 243 -248, May/June 1995.

KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *B. elkanii* sp. nov. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, v. 38, p.501 -505, 1992.

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

LESUEUR, D.; DIEM, H. G.; DIANDA, M.; LE ROUX, C. Selection of *Bradyrhizobium* strains and provenances of acacia mangium and *Faidherbia albida*: Relationship with their tolerance to acidity and aluminium. *Plant and Soil*, The Hague, v. 149, n. 2, p. 159-166, Feb. 1993.

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

LORENZO, J. A. Regeneração natural de uma área minerada de bauxita em Poços de Caldas, MG. 1991. 151p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MARTINAZZO, A. F. Potencial de fixação em N₂ em *Vigna unguiculata* Walp. em diferentes condições ambientais. 1989. 154p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

MELLONI, R. Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em solos de mineração de bauxita. 2001. 173 p. Tese (Doutorado em solos e nutrição de plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MILNITSKY, F.; FRIONI, L.; AGIUS, F. Characterization of rhizobia that nodulate native legume trees from Uruguay. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 989-992, May/June 1997.

MOREIRA, F. M. S. Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. 1991. Tese (Doutorado) – Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

MOREIRA, F. S. M.; CARVALHO, Y.; GONÇALVES, M.; HAWKKA, K.; YOUNG, P. J. W.; FARIA, S. M.; FRANCO, A. A.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O. *Azorhizobium johannense* sp. nov. and *Sesbania virgata* (caz.) pers.: A highly specific symbiosis. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E. (Ed.). *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, 1999. Proceedings of the 12th international Congress on Nitrogen Fixation.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative 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.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 7, n. 7, p. 889-895, July 1998.

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

OLIVEIRA, I. P.; CARVALHO, A. M. A de. A cultura do caupi nas condições de clima e solo dos trópicos úmidos e semi-áridos do Brasil. In: ARAÚJO, J. P. de; WATT, E. A. (Org.) *O caupi no Brasil*. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p.65-95.

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

PRASAD, P.; BASU, S.; BEHERA, N. A comparative account of the microbiological characteristics of soils under natural forest, grassland and cropfield from Eastern India. *Plant and Soil*, The Hague, v. 175, n. 1, p. 85- 91, Aug. 1994.

RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: GAETANO-ANOLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M. (Ed.). *DNA markers: protocols, applications and overviews*. New York: J. Wiley, 1997.

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.

REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIOLÓGICOS DE INTERESSE AGRÍCOLA – RELARE, 9., 2000.

RUMJANEK, N. G.; DOBERT, R. C.; BERKUM, P. Van; TRIPLETT, E. W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 59, n.12, p. 4371-4373, Dec. 1993.

SANTILIANA, N.; FREIRE, J. R. J.; SÁ, E. L. S. de; SATO, M. Avaliação de estirpes de rizóbio para a produção de inoculantes, para trevo vermelho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas-SP, v. 22, n. 2, p. 231-237, abr./jun. 1998.

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.

SILVA, G. G.; FRANCO, A. A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* spp. de leguminosas florestais em meio de cultura tolerantes à acidez e à toxidez do alumínio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 19, p. 169 -173, jun. 1984.

SLICE, D. E.; KIM, J.; WALKER, J. Ntsys-Numerical taxonomy and multivariate Analysis System: versão 1. 80. [S. 1]:[s. n.], 1994.

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

SOUZA, J. A. Avaliação das estratégias de recuperação de áreas degradadas pela mineração de bauxita em Poços de Caldas, MG. 1997. 104p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOUZA, L. A. G.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A. Avaliação do crescimento de *Rhizobium* de leguminosas florestais tropicais em diferentes meios de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 19, p. 165-168, jun. 1984.

SUZUKI, D. T.; GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; LEWANTIN, R. C. Introdução à genética. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 633p.

SWIFT, M.; BIGNELL, D. Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice. Bogor, Indonesia, 2001.

TAN, Z. Y.; KAN, F. L.; PENG, G. X.; WANG, E. T.; REINHOUD-HUREK, B.; CHEN, W. X. *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.

TATE III, R. L.; KLEIN, D. A. (Ed.). *Soil reclamation processes: microbiological analyses and applications*. New York: M. Decker, 1985. 349p.

VANDAMME, P.; POT, B.; FALSEN, E.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Intra and interspecific relationships of veterinary campilobacters revealed by numerical analysis of electrophoretic protein profiles and DND:DNA hybridizations. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v. 13, n. 3, p. 295-303, Aug. 1990.

VELAZQUEZ, E.; IGUAL, J. M.; WILLENS, A.; FERNÁNDEZ, M. P.; MUÑOZ, E.; MATEOS, P. F.; ABRIL, A.; TORO, N.; NORMAND, P.; CERVANTES, E.; GILLIS, M.; MARTINEZ-MOLINA, E. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 51, n. 3, p. 1011-1021, May 2001.

VINCENT, J. M. *Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell, 1970. 164p.

WARD, S. C. Soil development on rehabilitated bauxite mines in south -west Australia. *Australian journal of Soil Research*, Melbourne, v. 38, n. 2, p. 453-464, 2000.

WESTERMEIER, R.; BARNES, N.; GRONAU-CZY BOLKA, S. et al. *Elektroforesis in practice: a guide to theory and practice*. New York: VCH, 1993. 227p.

WILLENS, A.; DOIGNON-BOURCIER, F.; COOPMAN, R.; HOSTE, B.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M. AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart v. 23, n. 1, p. 137-147, Apr. 2000.

WILLIAMSON, J. C.; JOHNSON, D. B. Conservation of mineral nitrogen in restored soils at opencast coal mine sites: II the effects of inhibition of nitrification and organic amendments on nitrogen losses and soil microbial biomass. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 319-326, Sept. 1994.

ZHU, H.; HIGGINBOTHAM, K. O.; DANCİK, B. P.; NAVRATIL, S. Intraespecific genetic variability of isozymes in the ectomycorrhizal fungus *Suillus tomentosus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, n. 3, p. 588-594, Mar. 1988.

ANEXOS

ANEXO A	Página
1A	Resumo das análises de variância de matéria seca da parte aérea (MSPA), peso de nódulos secos e número de nódulos 37
2A	Protocolo para proteína total SDS-PAGE. 38
3A	Proteína total solúvel pelo método de Bradford 39
4A	Soluções e tampões: composição química 40
5A	Conceito de distância genética, coeficientes de similaridade e dissimilaridade e polimorfismo 42

ANEXOS

Tabela 1A. Resumo das análises de variância de matéria seca da parte aérea (MSPA), peso de nódulos secos e número de nódulos.

MSPA			
	GL	FC	Pr > Fc
Tratamento	14	5.580	0.0000
erro	30		
CV (%) = 31,65			

Peso de nódulos secos			
	GL	FC	Pr > Fc
Tratamento	12	4.002	0.0015
erro	26		
CV (%) = 33.48			

NÚMERO DE NÓDULOS			
	GL	FC	Pr > Fc
Tratamento	12	3.296	0.0057
erro	25		
CV (%) = 36..31			

2A. Protocolo para proteína total SDS-PAGE

Meio de cultura TY

Tryptona	5g
Extrato de levedura	0,75g
KH ₂ PO ₄	0,454g
Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O	1,79g
H ₂ O qsp para 1000mL	pH 6,8- 7,8

CaCl₂ solução (autoclavar em frasco individual)

CaCl₂ .2 H₂O 20g/100mL H₂O

No momento da inoculação, acrescentar 0,25mL para cada 50ml de meio de cultura (TY)

Tampão de extração

Estoque	Volume usado	concent. final
Tris-HCl pH7,5 [1M]	50mL	50mM
NaCl [5M]	40mL	200mM
Glicerol 100%	50mL	5%
DTT (Dithiothreitol) [0,1M]	10mL	1mM
PMSF (phenilmethylsulfonylfluoride[0,1M]	10mL	1mM

Extração de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976). Como os extratos apresentaram concentração de proteínas igual ao branco, realizou -se a concentração destas proteínas pela precipitação com acetona fria (curso de bioquímica de proteínas Embrapa/CNPMS). Em 400µL do extrato foi adicionado 1mL de acetona a -20°C, agitando no vortex. As amostras foram

incubadas em freezer a -20°C , por 12 horas, em seguida centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pélet seco foi ressuspensão em 100 μL de tampão da amostra. O pélet foi misturado ao tampão com a ajuda do vortex e da ponteira da pipeta. As amostras foram aquecidas em banho maria a 90°C por 15 minutos e, em seguida, resfriadas em gelo e centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. Todo o volume obtido foi aplicado ao gel para eletroforese.

3A. Proteína Total solúvel pelo método de Bradford

- ✓ 80 μL do extrato cru diluído
- ✓ 720 μL de água destilada
- ✓ 200 μL do dye reagent concentrate (reagente de Bradford)
- ✓ Leitura em espectrofotômetro a 595nm
- ✓ Zerar o aparelho com o branco (800 μL de água e 200 μL de Dye)

Curva Padrão para Bradford

Tubo	Padrão de BSA	H ₂ O	Reagente de Bradford
1	0 μL	800 μL	200 μL
2	4 μL	796 μL	200 μL
3	8 μL	792 μL	200 μL
4	12 μL	788 μL	200 μL
5	16 μL	784 μL	200 μL
6	20 μL	780 μL	200 μL

Padrão de BSA = 1mg de BSA (albumina bovina) / 1mL de água destilada

Curva Padrão para Proteína Bradford: Pipetar para 6 tubos de ensaio os seguintes volumes em μL da solução estoque de BSA (1mg/mL): 0,4,8,12,16,20.

Com água destilada, completar o volume destes tubos para 800 μ L, adicionar 200 μ L do reagente não diluído e incubar por 7 minutos. Ler A₅₉₅ e determinar a curva padrão. Todas as amostras devem ser incubadas com o corante pelo mesmo período de tempo porque o fator tempo influencia no desenvolvimento da cor.

Análise das amostras: As amostras devem ser diluídas para uma concentração de proteína menor que 20 μ g e o volume completado com água destilada para 800 μ L. Adicione 200 μ L do corante, incube por 7 minutos e leia A₅₉₅. Interpole estas leituras na curva padrão e calcule a concentração de proteína na amostra.

4A.Soluções e Tampões: composição química

Tampão da amostra (sem SDS) Estoque em geladeira

Tris-HCl	0,75g
β -mercaptoetanol	5mL
Glicerol	10mL
H ₂ O qsp	100mL
pH	6,8

Gel de separação		Gel de concentração	
H ₂ O	19,2mL	H ₂ O	12mL
Bis acrilamida	25mL	Bis-acrilamida	2,68mL
Tris-HCl 8,8	15mL	Tris-HCl pH 6,8	5mL
SDS 10%	600 μ L	SDS 10%	200 μ L
APS 10%	300 μ L	APS 10%	100 μ L
Temed	20 μ L	Temed	10 μ L

Soluções estoque

Acrilamida		Tris-HCl 1,5M pH 8,8	
acrilamida	60g	Tris	95,8g
Bis acrilamida	1,6g	H ₂ O qsp	500mL
H ₂ O qsp	200mL	Ajustar pH para 8,8 com HCl 4N	
filtrar e estocar a 4°C		concentração final de tris na solução: 0,375M	

Tris-HCl 0,5M pH 6,8		Tampão de migração – estoque	
Tris	15,15g	Tris	30,2g
H ₂ O qsp	250mL	Glicina	144g
Ajustar pH para 6,8 com HCl 4N		SDS	10g
concentração final de tris na		H ₂ O qsp	100mL
solução: 0,125M		Diluir 1:10	

Armazenar sob refrigeração

*Solução de coloração		*Solução fixadora	
Metanol	450mL	Metanol	450mL
Ác. acético	100mL	Ác. acético	100mL
H ₂ O qsp	1000mL	H ₂ O qsp	1000mL
0,1g de azul brilhante de comassie			

*Solução descolorante		*Solução secante	
Metanol	400mL	Metanol	650mL
Ác. acético	70mL	Glicerol	5mL
H ₂ O qsp	1000mL	H ₂ O qsp	1000mL

*armazenar a temperatura ambiente.

5A. Conceito de distância genética, coeficientes de similaridade e dissimilaridade e polimorfismo

Distância genética

A literatura trata as diferentes medidas de distância genética de um modo pouco claro. Parece não existir consenso quanto ao conceito de distância genética. Frequentemente, o coeficiente de dissimilaridade é utilizado como sinônimo de distância genética, ocorrendo também o inverso. Também vários coeficientes de similaridade são algumas vezes referidos como distâncias. Convém ressaltar que similaridade é o complemento da divergência. Uma medida de distância genética, para ser qualificada como tal, deve apresentar um ou mais dos seguintes atributos: ser métrica, utilizar frequências alélicas para seu cálculo e refletir predomínio dos fatores de natureza genética sobre os fatores ambientais que estão sendo avaliados. Por esta conceituação, até mesmo uma medida de distância calculada a partir de dados fenotípicos pode ser de natureza genética. Basta, por exemplo, que os dados tenham sido obtidos em condições experimentais, com observação de princípios como tamanho ótimo de parcela, emprego de repetição no espaço e tempo de casualização e de controle local. A própria magnitude do coeficiente de herdabilidade, ou mesmo de repetibilidade, estimado dos caracteres avaliados no experimento permitirá inferir sobre a natureza genética ou não da medida de distância empregada (Dias e Kageyama, 1997 citado por Alfenas, 1998). Em suma, a natureza genética de um coeficiente de distância parece depender do seu tipo, do tipo de dado empregado em seu cálculo (se fenotípico, isoenzimático ou de DNA) e também do modo como foram gerados esses dados.

Coeficientes de similaridade

A expectativa de um coeficiente de similaridade é representar a reação linear entre dois itens avaliados por um conjunto comum de p variáveis. Esses coeficientes, em sua maioria, são calculados a partir de variáveis binárias,

representando presença e ausência, com valores de 1 e 0, respectivamente. Portanto, a comparação de dois itens quaisquer (população, cultivares, clones, indivíduos, etc) possibilita a construção de uma tabela 2x2 com formato de contingência, utilizando as frequências de bandas observadas no zimograma. A análise deve limitar-se às bandas nítidas, que apresentam constância e nitidez nos géis. Existem numerosos coeficientes de similaridade propostos na literatura. Neste trabalho foi utilizado o coeficiente de Jacard (S_j), cuja equação é:

$$S_j = \frac{a}{a + b + c}$$

A escolha do coeficiente de similaridade é função dos objetivos propostos na pesquisa, do tipo de itens sob estudo e das propriedades inerentes a cada coeficiente.

Polimorfismo

Para muitos genes há dois ou mais alelos comuns em uma população. Isto resulta em uma condição conhecida como polimorfismo genético – a coexistência de vários fenótipos variantes distintos, comuns e geneticamente determinados em uma população (Suzuki et al.,1992). Em outras palavras, chama-se polimorfismo a ocorrência de duas ou mais formas genéticas descontínuas de uma mesma espécie, numa mesma população, a mais rara das quais sendo condicionada por um alelo com frequência não inferior a 1% os com frequência acima de 99% são chamados monomorfos (Freire -Maia, 1974).