



**EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE RIZÓBIOS  
SELECIONADOS E DIVERSIDADE DE  
POPULAÇÕES NATIVAS QUE NODULAM  
FEIJÃO E CAUPI EM PERDÕES, MG**

**ANDRÉ LUIS DE LIMA SOARES**

**2004**

58491

049928

DESCARTADO

F.V.A.

ASSINATURA

Data 13, 11, 17

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA  
UFLA

ANDRE LUIS DE LIMA SOARES

**EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE RIZÓBIOS SELECIONADOS E  
DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES NATIVAS QUE NODULAM  
FEIJÃO E CAUPI EM PERDÕES, MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Profa. Fátima Maria de Souza Moreira

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

[REDACTED]  
UFLA  
Nº CLAS 1635.02  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

## Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da

Biblioteca Central da UFLA

Soares, André Luis de Lima

Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas que nodulam feijão e caupi em pedões/MG / André Luis de Lima Soares. -- Lavras : UFLA, 2004.

73 p. : il.

Orientador: Estelma Maria de Souza Moreira

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Feijão. 2. Caupi. 3. Rizóbio. 4. Simbiose. 5. Estirpe. 6. Inoculação. 7. Diversidade fenotípica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-581.52482

-635.652

**ANDRÉ LUIS DE LIMA SOARES**

**EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE RIZÓBIOS SELECIONADOS E  
DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES NATIVAS QUE NODULAM FEIJÃO  
E CAUPI EM PERDÕES, MG**

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 27 de julho de 2004

Prof. Messias José Bastos de Andrade

DAG/UFLA

Profª. Sui Mui Tsai

CENA/USP



Profª. Fátima Maria de Souza Moreira  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Ciência do Solo e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

A Deus e aos meus pais, Hélio Lelis Soares e Maria das Graças de Lima Soares, pelo apoio. Ao meu irmão Bruno, pela grandiosa amizade. À minha noiva Sâmia, pelo companheirismo e compreensão.

À professora Fátima Maria de Souza Moreira, pela orientação, paciência, oportunidades concedidas e pelos ensinamentos passados.

Ao professor José Oswaldo Siqueira pela primeira oportunidade no Departamento de Ciência do Solo.

Ao professor Messias José Bastos de Andrade pela co-orientação e pelo apoio nos ensaios de campo e à Professora Sui Mui Tsai, pela participação na banca e pelas sugestões que muito contribuíram para a melhoria do trabalho.

Aos colegas e amigos do curso de mestrado, Adriana Lima e Helson Mário, pelo apoio nas realizações dos trabalhos.

Aos alunos de iniciação científica, Paulo Ademar e João Paulo, pela amizade e fundamental ajuda na realização deste trabalho.

Aos professores Furtini e Bebeto, pelo apoio durante a realização do curso.

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

Aos colegas e amigos Plínio, Leozão, Renato (Pancinha), Alexandre (Fininho), Leandro (Littles), Éderson, Rafaela, Lidiane, Alexandre, José Geraldo, Isabel, Lucas, Alessandra, Carolina, Felipe, Gláucia, Valfrido e Silvana, pelo convívio.

**Aos funcionários José Roberto (Pesão), Humberto, Vitor, Daniel, João, Roberto, Marquinho e Milton.**

**A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.**

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução geral.....	01
2 Referencial teórico.....	03
2.1 Fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro.....	03
2.2 Fixação biológica de nitrogênio no caupi.....	05
2.3 Importância da biodiversidade e da seleção de bactérias nativas que nodulam leguminosas.....	07
2.4 Diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro.....	09
2.5 Diversidade de rizóbios que nodulam o caupi.....	11
3 Referências bibliográficas.....	12
CAPÍTULO 2: Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas que nodulam feijão em Perdões, MG.....	18
1 Resumo.....	18
2 Abstract.....	19
3 Introdução.....	20
4 Material e métodos.....	21
4.1 Ensaio de campo.....	21
4.2 Diversidade fenotípica de populações que nodulam o feijoeiro.....	24
4.3 Análises estatísticas.....	28
5 Resultados e discussão.....	28
5.1 Ensaio de campo.....	28

5.2 Diversidade fenotípica de populações nativas que nodulam o feijoeiro .....	32
5.2.1 Densidade da população nativa.....	32
5.2.2 Caracterização cultural .....	34
5.2.3 Análise de proteínas totais por SDS/PAGE.....	35
6 Conclusões .....	38
7 Referências bibliográficas .....	39
<b>CAPÍTULO 3: Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas que nodulam caupi em Perdões, MG .....</b>	<b>42</b>
1 Resumo .....	42
2 Abstract.....	43
3 Introdução .....	44
4 Material e métodos.....	45
4.1 Ensaio de campo .....	45
4.2 Diversidade fenotípica de populações que nodulam o caupi .. ...	49
4.3 Análises estatísticas .....	52
5 Resultados e discussão .....	53
5.1 Ensaio de campo .....	53
5.2 Diversidade fenotípica de populações nativas que nodulam o caupi .....	55
5.2.1 Densidade da população nativa.....	55
5.2.2 Caracterização cultural .....	56
5.2.3 Análise de proteínas totais por SDS/PAGE.....	59
6 Conclusões .....	63
7 Referências bibliográficas .....	64
ANEXOS .....	66

## ANEXOS

ANEXOS	Página
ANEXO A	Meios de cultura, tampões e soluções de revelação ..... 66
ANEXO B	Protocolo para análise de proteína total por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) de bactérias gram-negativas (modificado do protocolo utilizado do laboratório de microbiologia da Universidade de Gent)..... 69
ANEXO C	Solução de Jensen modificada ..... 73

## RESUMO

SOARES, André Luis de Lima. **Eficiência agrônômica 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\***

O caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) são as principais culturas da população brasileira. A simbiose destas espécies hospedeiras com bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN) pode aumentar a produção substituindo os fertilizantes nitrogenados e diminuindo os custos de produção. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência agrônômica de estirpes selecionadas de rizóbio comparadas às estirpes recomendadas: BR 2001 (caupi) e CIAT 899 (feijão). A diversidade fenotípica da população nativa de rizóbio foi avaliada de acordo com as características culturais e por meio de análise de proteína total por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A inoculação, no campo, com as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B (caupi) e UFLA 02-100, UFLA 02-86 e UFLA 02-127 (feijão) aumentou a produção de grãos similar em ambos os tratamentos: O controle com 70 kg.ha<sup>-1</sup> de N mineral e estirpes considerando o controle sem inoculação e com nitrogênio mineral. Não houve relação entre grupos fenotípicos de perfil protéico total e caracterização cultural celular. As populações nativas que nodulam caupi e feijão nestes solos são bem diversas e não incluiu estirpes similares as estirpes introduzidas como inoculantes.

---

Orientadora: Fátima Maria de Sousa Morcira

## ABSTRACT

SOARES, André Luis de Lima. **Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native soil populations able to nodulate cowpea and beans in Perdões, MG.** 2004. 73p. Dissertation (Master Program in Soil and Plant Nutrition) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are the main food crops of Brazilian populations. Symbiosis of these host species with nitrogen fixing bacteria (NFB) can increase yields replacing nitrogen fertilizers and decreasing yield costs. The first aim of this work was to evaluate the agronomic efficiency of selected rhizobia strains compared to the recommended strains: BR 2001 (cowpea) and CIAT 899 (beans). Phenotypic diversity of rhizobia native populations was evaluated by cultural characteristics and analysis of total protein profiles by polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Field inoculation with strains UFLA 03-84 and INPA 03-11B (cowpea) and UFLA 02-100, UFLA 02-86 and UFLA 02-127 (beans) increased grain yields similar to both treatments: the control with 70 kg.ha<sup>-1</sup> N-urea and recommended strains regarding to the control without inoculation and mineral nitrogen. There was no relationship among phenotypic grouping by cultural characteristics and protein profiles. Native populations nodulating cowpea and beans in this soil are quite diverse and do not include strains similar to the strains introduced as inoculants

---

Guidance Committee: Fátima Maria de Souza Morcira - UFLA (Major Professor)

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e o caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] são culturas de grande importância no Brasil.

O feijão é um dos principais constituintes da dieta do brasileiro, por ser uma excelente fonte protéica, além de possuir bom conteúdo de carboidratos e ferro. É, ainda, um produto agrícola de grande importância econômico-social (Borém & Carneiro, 1998). A produtividade média de feijão no Brasil nos últimos três anos foi pouco superior a 700 kg.ha<sup>-1</sup>, enquanto que em outros países como Estados Unidos e China estas produtividades estão em torno de 1.200 e 1.800 kg.ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Faostat, 2003).

O cultivo de feijão no Brasil é caracterizado por dois sistemas produtivos: lavouras menores que 100 ha, correspondendo a 71% da produção nacional e com produtividade média de 525 kg.ha<sup>-1</sup> e lavouras maiores que 100 ha, que empregam tecnologia superior e apresentam produtividade média de 1.440 kg.ha<sup>-1</sup>. Nas primeiras, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de tecnologias de baixo custo, capazes de melhorar os níveis de produtividade dos pequenos agricultores (Strallio, 2002).

Dentre as leguminosas cultivadas no Nordeste do Brasil, destaca-se o caupi, excelente fonte de proteína de baixo custo e alimento básico para a população, constituindo a principal cultura de subsistência no sertão semi-árido. É também bastante cultivado nas regiões tropicais dos continentes africano, asiático e americano. Representa 20% de todos os feijões produzidos no Brasil (Borém & Carneiro, 1998) e também apresenta baixos rendimentos médios, em torno de 400 a 500 kg.ha<sup>-1</sup> (Lacerda, 2002).

De modo geral, a baixa produtividade média dessas culturas está ligada ao fato de serem, em boa parte, culturas de subsistência cujos produtores não dispõem de recursos para utilização de fertilizantes, normalmente necessários. Desse modo, é gerada uma cadeia de deficiências nutricionais que, associada à suscetibilidade a pragas e doenças, vem promovendo a estagnação da produção nos atuais patamares (Cassini & Franco, 1998).

Nesse sentido, a possibilidade da interação do feijão e do caupi com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, vulgarmente denominadas de rizóbios, via utilização de inoculantes ou via fixação biológica por rizóbios nativos do solo, pode ser uma alternativa para a substituição total ou parcial dos adubos nitrogenados. Isso desde que o processo de fixação supra as culturas com o nitrogênio necessário para o seu crescimento e desenvolvimento, além de diminuir os custos de produção e economizar combustíveis fósseis para a fabricação de fertilizantes nitrogenados.

A seleção de novas estirpes, capazes de fixar quantidades significativas de nitrogênio atmosférico quando em simbiose com o feijão e caupi, tem sido realizada por diversos órgãos de pesquisa na busca de pares simbióticos mais eficientes, capazes de melhorar os níveis de produtividade, principalmente dos pequenos agricultores.

No entanto, estirpes selecionadas em laboratório e casa de vegetação podem não alcançar o máximo potencial de fixação no campo, devido, entre outros fatores, à competição com a população nativa estabelecida do solo e adaptada às condições ambientais locais. Por esta razão, reveste-se da maior importância o estudo de densidade e diversidade da população de rizóbios nativos (Pereira, 2000).

Neste trabalho avaliou-se, no campo, a eficiência de estirpes de rizóbio previamente selecionadas em simbiose com o feijão e o caupi, bem como a sua

comparação com estirpes recomendadas para a produção de inoculantes comerciais para estas culturas. Também foi avaliada a diversidade fenotípica de bactérias nativas que nodulam o feijão e o caupi da área em estudo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro

Um dos fatores mais limitantes à produtividade do feijoeiro é a baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo fósforo e nitrogênio, nos solos agrícolas. A adição de nitrogênio na forma de fertilizantes é cara e, em muitos casos ineficiente, principalmente devido às perdas do elemento causadas por práticas culturais inadequadas (Araújo, 1994).

Como muitas espécies leguminosas, o feijoeiro também é capaz de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, podendo assim garantir parte de suas exigências em nitrogênio por meio do processo de fixação biológica.

Existe um descrédito crônico na capacidade de o feijoeiro fixar nitrogênio atmosférico suficiente para expressar seu potencial produtivo quando em associação com o rizóbio, recomendando-se indistintamente o uso de fertilizantes para a cultura. Entretanto, resultados de pesquisa apontam que é possível a cultura do feijoeiro se beneficiar, no campo, da fixação biológica de nitrogênio (Araújo, 1994) e o grande desafio que se apresenta é conseguir um manejo adequado dessa simbiose, visando aumentar a sua eficiência (Cassini & Franco, 1998).

A espécie de rizóbio recomendada para a produção de inoculantes para a cultura do feijoeiro é a *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero et al., 1991), compreendendo as estirpes comerciais SEMIA 4077 (CIAT 899) e SEMIA 4080

(PRF 81). Esta espécie é geneticamente mais estável e mais tolerante a estresses, como temperaturas elevadas e acidez do meio, sendo mais adaptada às condições de solos tropicais (Graham, 1992; Hungria et al., 2000).

Segundo Tsai et al. (1993), o feijoeiro é capaz de fixar de 20 a 60 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio por ciclo cultural; entretanto, fatores ambientais e genéticos estão diretamente envolvidos no acúmulo de nitrogênio na planta via fixação biológica (Hardarson & Danso, 1993; Pereira et al., 1984). Pereira et al. (1989) consideram que a fixação biológica do nitrogênio, quando eficiente, é dependente tanto de genótipos de feijoeiro, quanto de estirpes eficientes.

Hungria et al. (2000), comparando a eficiência de novos isolados de rizóbio para o feijoeiro no estado do Paraná, juntamente com estirpes de *Rhizobium tropici*, verificaram que a inoculação proporcionou acréscimo de até 900 kg.ha<sup>-1</sup> no rendimento de grãos, em relação ao controle sem inoculação e sem adubação com N, e que a maioria dos rendimentos obtidos por meio da inoculação foi semelhante ao controle que recebeu completa adubação mineral nitrogenada. Do mesmo modo, Mostasso et al. (2001) também verificaram que no feijoeiro, a inoculação de novas estirpes de rizóbio, isoladas no Distrito Federal, proporcionou rendimentos semelhantes aos da testemunha que recebeu adubação mineral nitrogenada e das estirpes referência de *Rhizobium tropici* (CIAT 899 e PRF 81).

Utilizando as cultivares de feijão Pérola e Diamante Negro, em ensaio de campo no estado do Paraná e os mesmos isolados obtidos por Mostasso et al. (2001), Hungria et al. (2003) obtiveram resposta com a inoculação de alguns isolados, os quais proporcionaram rendimentos médios de até 1.600 kg.ha<sup>-1</sup>, igualando-se à inoculação com as estirpes referência, CIAT 899 e PRF 81, e ao controle com nitrogênio mineral.

## 2.2 Fixação biológica de nitrogênio no caupi

O caupi também é uma leguminosa nodulífera e obtém grande parte de sua exigência em nitrogênio por meio do processo de fixação biológica.

Por ser cultivado basicamente na agricultura de subsistência, o aumento de produtividade depende, além de outros fatores, do aumento da eficiência simbiótica entre o caupi e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. Segundo Oliveira & Dantas (1988), o caupi depende do nitrogênio da semente e do solo até 20 dias após a germinação, podendo dispensar a adubação mineral a partir dos 25 dias e, caso haja condições para uma boa nodulação, toda a necessidade de nitrogênio da cultura pode ser suprida pela fixação biológica.

A partir do quarto dia após a emergência das plântulas, os nódulos já podem ser vistos no eixo da raiz principal no caupi e já estarão aptos em fixar nitrogênio a partir do décimo primeiro dia após o aparecimento das folhas primárias, quando desenvolvem leghemoglobina (Ryle et al., 1979).

O caupi é capaz de responder à inoculação mesmo em áreas recém-desmatadas (Martinazzo, 1989). Em solos tropicais onde existe população nativa de rizóbios, o caupi pode estabelecer simbiose espontânea quando cultivado, por se tratar de uma leguminosa bastante promiscua (Lewin et al., 1987).

Estima-se que, em condições de campo, a fixação de nitrogênio pelo feijão caupi pode ser da ordem 73 a 354 kg.ha<sup>-1</sup> de N e este grande intervalo pode variar com a cultivar, a eficiência da estirpe utilizada, as condições de solo, o clima e a metodologia usada na determinação da fixação (FAO, 1987).

Estudando o potencial de fixação biológica de nitrogênio por diferentes cultivares de feijão caupi inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium*, Awonaike et al. (1990) determinaram que a contribuição da fixação biológica para a produção de grãos foi de 66 a 120 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, variando em função da cultivar e da estirpe inoculada.

Fening & Danso (2002), estudando 100 isolados de rizóbio de solo de Gana, na África, verificaram que a maioria dos isolados foi classificada como de eficiência moderada e que 6 % deles apresentaram alta eficiência, superando a estirpe TAL 169 de *Bradyrhizobium* e a testemunha com 70 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio.

Lacerda et al. (2004) verificaram, em um solo de Minas Gerais, que a inoculação de estirpes isoladas da região da Amazônia contribuiu significativamente para o aumento no rendimento de grãos no caupi, cultivar BR-14 Mulato, em relação à testemunha sem inoculação e sem nitrogênio mineral.

Do mesmo modo, Hara (2003), também avaliando a campo a eficiência simbiótica de seis estirpes isoladas da região da Amazônia sobre o caupi, obteve resultados semelhantes aos encontrados por Lacerda et al. (2004), verificando que a inoculação de alguns isolados proporcionou rendimento de grãos até mesmo superior à testemunha que recebeu 70 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio mineral.

Atualmente, a estirpe recomendada para a produção de inoculante comercial para o caupi é a BR 2001/SEMIA 6145 (RELARE, 1985), pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* e isolada na EMBRAPA Agrobiologia em 1967, a partir de nódulos trazidos da Libéria, África. No entanto, apesar da recomendação da estirpe BR 2001, estirpes isoladas da Amazônia e de áreas que sofreram mineração de bauxita apresentam eficiência simbiótica bastante superior (Lacerda, 2002; Motta, 2002; Lima, 2003; Lacerda et al., 2004).

Martinazzo (1989) também observou que alguns isolados da Amazônia se destacaram em relação ao acúmulo de nitrogênio, principalmente em altas temperaturas, demonstrando estarem mais adaptados a este estresse.

### 2.3 Importância da biodiversidade e da seleção de bactérias que nodulam leguminosas

Organismos fixadores de nitrogênio, ou diazotróficos, podem ser encontrados entre os aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos e na maioria dos grupos filogenéticos representativos de bactéria e de Archac. Apesar de representarem parcela relativamente pequena dos procariotos, esses organismos apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. 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 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 N<sub>2</sub> (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 sua ocorrência nos mais diferentes tipos de hábitat terrestres.

→A contribuição da fixação biológica de nitrogênio à economia da produção de leguminosas é muito significativa, uma vez que as aplicações de fertilizantes nitrogenados podem ser, em grande parte, reduzidas e até dispensadas, como no caso da soja, por meio da inoculação de estirpes eficientes de rizóbio (Doberciner & Duque, 1980), contribuindo não só para a economia como também para a sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas.

Ainda é limitado o conhecimento sobre a diversidade de bactérias que nodulam leguminosas, devido à falta de informações sobre os microssimbiontes da grande maioria das espécies leguminosas. Estima-se que a família leguminosa possua em torno de 20.000 espécies. A capacidade de estabelecer relações simbióticas efetivas com rizóbio é desconhecida em cerca de 77% das espécies

dessa família e, por consequência, também são pouco conhecidas as características das espécies de rizóbio (Moreira et al., 2000). Embora a maioria das espécies conhecidas tenha sido isolada de espécies herbáceas produtoras de grãos, como a soja e o feijão, Moreira et al. (1993) e Dupuy et al., (1994) revelam alta diversidade de rizóbio tropical, isolados de espécies florestais nativas até então desconhecidas.

Estima-se que menos de 1% dos microrganismos existentes no planeta tenha sido caracterizado e descrito. Descobertas recentes na área de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos, muito têm contribuído para os avanços da biotecnologia moderna e das ciências agrárias (Moreira & Siqueira, 2002).

→ A procura por organismos eficientes, capazes de fornecer ou disponibilizar às plantas os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, é um importante passo, que antecede a sua introdução como inoculantes para uma determinada cultura (Ferreira et al., 1998).

→ 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 agrícola. Além da eficiência, estas estirpes devem apresentar também outras características, como boa competição por sítios de infecção em relação às estirpes nativas e boa sobrevivência e adaptação às condições edáfo-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, em casa de vegetação. Nos estádios seguintes, as estirpes selecionadas são testadas em vasos com solo, em casa de vegetação e em 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).

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. Dessa 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).

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

Atualmente são descritas oito espécies de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro: *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984), *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero et al., 1991), *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* (Segovia et al., 1993), *Rhizobium gallicum* bvs. *gallicum* e *phaseoli* (Amarger et al., 1997), *Rhizobium giardinii* bvs. *giardinii* e *phaseoli* (Amarger et al., 1997), *R. (Sinorhizobium) fredii* (Scholla & Elkan, 1984), *R. (Mesorhizobium) loti* (Jordan, 1984) e *R. (Mesorhizobium) huahuii* (Chen et al., 1991). No Brasil, três espécies distintas de rizóbio são de reconhecida importância ecológica como simbiontes do feijoeiro, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* e *R. tropici* (Straliotto & Rumjanek, 1999).

Além do gênero *Rhizobium*, número bastante representativo de isolados de nódulos de feijoeiro foi por meio de análise genética de restrição do 16S rDNA, incluído no gênero *Sinorhizobium*, ocorrendo naturalmente em solos tropicais do Brasil e África (Stralio et al., 1997; Murphy et al., 1997).

Melloni (2001), estudando a diversidade de rizóbios em área de mineração de bauxita reabilitada, com base em características culturais e utilizando o feijoeiro como planta isca, verificou que aproximadamente 80% dos isolados pertenciam ao grupo formado pelas estirpes de referência dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, mas também alguns isolados pertenciam a grupos formados por estirpes referência dos gêneros *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*.

Pereira (2000) estudou a diversidade fenotípica por meio do padrão de proteína total (SDS/PAGE) de 42 isolados de solo da Amazônia, utilizando o feijoeiro como planta isca. Este autor verificou que os isolados apresentaram maior similaridade com estirpes tipo de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* do que com *Rhizobium tropici*, e que três isolados apresentaram posições distintas; estirpes tipo de *Rhizobium etli* e *Sinorhizobium fredii* também foram utilizadas neste estudo, mas apresentaram baixa similaridade com os isolados.

Aguilar et al. (2001), estudando a diversidade de rizóbios que nodulam o feijoeiro em solo do Noroeste da Argentina por meio de técnicas moleculares, verificaram que dentre 400 isolados obtidos de nódulos, a espécie *Rhizobium etli* era a predominante e alto grau de diversidade foi achado dentro das espécies.

Do mesmo modo, Mhandi et al. (2002), empregando técnicas moleculares, encontraram cinco espécies do gênero *Rhizobium* e 4 espécies do gênero *Sinorhizobium* entre 160 isolados de nódulos de feijoeiro em três regiões da Tunísia.

## 2.5 Diversidade de rizóbios que nodulam o caupi

O caupi é considerado mais promiscuo que o feijoeiro em estabelecer simbiose com populações nativas do solo, sendo mais indicado para detectar densidade e diversidade dessas populações (Melloni, 2001). Em área de mineração de bauxita reabilitada, este mesmo autor obteve um total de 200 isolados nas amostras coletadas no inverno e 420 isolados nas amostras coletadas no verão, utilizando o caupi como planta isca. Com base na caracterização cultural, foram encontrados representantes de diversos gêneros de rizóbio, como: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium*, tendo a maioria dos isolados obtidos apresentado características culturais de *Bradyrhizobium*.

Motta (2002), estudando a diversidade de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de nódulos de plantas de caupi em solo de mineração de bauxita reabilitado, por meio do padrão de proteína total (SDS/PAGE), verificou que houve alta diversidade e que algumas estirpes podem representar novas espécies do gênero. Lima (2003), também estudando a diversidade fenotípica de estirpes com características culturais semelhantes às de *Bradyrhizobium* isoladas em solos da Amazônia, verificou que vários grupos fenotípicos formados não pertenciam a nenhuma das três espécies de *Bradyrhizobium* descritas até o momento (*B. japonicum*, *B. elkanii* e *B. liaoningense*).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, O. M.; LÓPEZ, M. V.; RICCILO, P. M. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 91, n. 2/3, p. 181-188, Oct. 2001.

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v. 47, n. 4, p. 996-1006, Oct. 1997.

ARAÚJO, R. S. Fixação biológica de nitrogênio em feijão. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 91-120.

AWONAIKE, K. O.; KUMARSINGHE, K. S.; DANSO, S. K. A. Nitrogen fixation and yield of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) as influenced by cultivar and *Bradyrhizobium* strain. *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 24, n. 3/4, p. 163-171, Oct. 1990.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. *Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais*. Viçosa: UFV, 1998 p. 13-18.

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

CHEN, W. X.; LI, G. S.; QI, Y. L.; WANG, E. T.; YUAN, H. L.; LI, J. L. *Rhizobium huahuii* sp. nov. isolated from root nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v. 41, n. 2, p. 275-280, Apr. 1991.

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

DUPUY, N.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDENBRUAENE, I.; MAESTROJUAN, G.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; COLLINS, M. D.; GILLS, M. 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, July 1994.

FAO. **Legume inoculants and their use: Nifitol Project, USA x FAO fertilizer and Plant Nutrition Science**. Rome, 1987. 63 p.

FAOSTAT. **Banco de Dados da FAO**. Disponível em: <<http://www.fao.com>>. Acesso em: 30 jul. 2003.

FENING, J. O.; DANSO, S. K. A. Variation in symbiotic effectiveness of cowpea bradyrhizobia indigenous to Ghanaian soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 21, p. 23-29, 2002.

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. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5., 1998, Caxambu, MG. **Fertbio – Resumos...** Lavras: UFLA/SBCS/SBM, 1998.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 6, p. 475-484, June 1992.

HARA, F. A. S. **Ecologia de rizobia em condições ácidas e de baixa fertilidade da Amazônia**. 2003. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

HARDARSON, G.; DANSO, S. K. A. Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, n. 1, p. 19-23, May 1993.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGIAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 32, n. 11/12, p. 1515-1528, Oct. 2000.

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

JORDAN, D. C. Family III. Rhizobiaceae, p. 234-244 In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p. 234-244.

LACERDA, A. M. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por estirpes selecionadas de rizóbio. 2002. 44 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

LIMA, A. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. Isoladas de solos da Amazônia sob diferentes sistemas de uso da terra. 2003. 56 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

MARTINAZZO, A. F. Potencial de fixação em N<sub>2</sub> em *Vigna unguiculata* Walp. em diferentes condições ambientais. 1989. 154p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 41, n. 3, p. 417-426, July 1991.

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, MG.

MHAMDI, R. A.; LAGUERRE, G.; AOUANI, M. E.; MARS, M.; AMARGER, N. 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, July 2002.

MOREIRA, F. M. S.; CARVALHO, Y.; GONÇALVES, M.; HAUKKA, K.; YOUNG, P. J. W.; FARIA, S. M.; FRANCO, A. A.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O. *Azorhizobium johanense* sp. Nov. and *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. : a highly specific symbiosis. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G. Y.; Newton, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 197.

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

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

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolous vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 73, n. 2/3, p. 121-132, Jan. 2001.

MOTTA, J. S. **Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. Isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas**. 2002. 43 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MURPHY, P. J.; WILSON, K. J.; ANYANGO, B.; GILLER, K. E. *Rhizobium tropici*, *R. leguminosarum* and *Sinorhizobium fredii* are all *Phaseolus*-nodulating rhizobia indigenous to Keyan soils. In: CONGRÈS INTERNATIONAL DE FIXATION DE L'AZOTE, 11., 1997, Paris. Résumés... Paris: Institut Pasteur, INRA, CNRS, CEA, ORSTOM, CIRAD, 1997. Abstract 01-11.

OLIVEIRA, I. P.; DANTAS, J. P. Nutrição mineral do caupi. In: ARAÚJO, P. P. A.; WATT, E. E. (Org.) *O caupi no Brasil*. Brasília. EMBRAPA, 1988. 722 p.

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

PEREIRA, P. A. A.; ARAUJO, R. S.; ROCHA, R. E. M.; TEINMETZ, S. Capacidade de genótipos de feijoeiro de fixar N<sub>2</sub> atmosférico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 19, n. 7, p. 811-815, jul. 1984.

PEREIRA, P. A. A.; BURRIS, R. H.; BLISS, F. A. <sup>15</sup>N-determined dinitrogen fixation potential of genetically diverse bean lines. *Plant and Soil*, The Hague, v. 120, n. 2, p. 171-179, Dec. 1989.

REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIAS DE INOCULANTES MICROBIOLÓGICOS DE INTERESSE AGRÍCOLA – RELARE, 1., 1985.

RYLE, G. J. A.; POWELL, C. E.; GORDON, A. J. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea and white clover. I. Nitrogen fixation and the respiration of nodulated root. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 30, n. 114, p. 135-144, 1979.

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.

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, p. 374-377, Apr. 1993.

STRALIOTTO, R. A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro. Embrapa, CNPAB, 2002. Disponível em: <[http://www.cnpab.embrapa.br/pesquisas/fbml\\_inocula\\_feijoeiro.html#](http://www.cnpab.embrapa.br/pesquisas/fbml_inocula_feijoeiro.html#)>. Acesso em: 15 jul. 2003.

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. O.; FERREIRA, M. E.; RUMJANEK, N. G. 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.

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

TSAI, S. M.; BONETTI, R.; AGBALA, S. M.; ROSSETO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. *Plant and Soil*, The Hague, v. 152, n. 1, p. 131-138, May 1993.

## CAPÍTULO 2

### EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE RIZÓBIOS SELECIONADOS E DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES NATIVAS QUE NODULAM O FEIJOEIRO EM PERDÕES, MG

#### 1 RESUMO

SOARES, André Luis de Lima. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas que nodulam o feijoeiro em Perdões, MG. 2004. 73p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), um dos principais constituintes da dieta do brasileiro, é uma excelente fonte protéica e ainda, um produto agrícola de grande importância econômico-social. A possibilidade da interação do feijoeiro com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico pode aumentar os níveis de produtividade e diminuir os custos de produção. No presente trabalho avaliou-se, no campo, a eficiência agronômica de estirpes selecionadas de rizóbio em simbiose com o feijoeiro comparadas à estirpe recomendada para a produção de inoculantes comerciais (CIAT 899). A diversidade fenotípica da população nativa foi avaliada de acordo com as características culturais e por meio de análise de proteína total por eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE). Verificou-se que a inoculação no campo com as estirpes UFLA 02-100, UFLA 02-86 e UFLA 02-127 promoveu rendimento de grãos semelhante à testemunha com 70 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio e à inoculação com a estirpe referência CIAT 899. Não houve relação entre os grupos fenotípicos de perfil protéico total e caracterização cultural celular e as estirpes inoculadas e eficientes mostraram-se fenotipicamente distintas das estirpes que compõem a população nativa.

---

Orientadora: Fátima Maria de Sousa Moreira

## 2 ABSTRACT

SOARES, André Luis Lima. **Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native soil populations able to nodulate beans in Perdões, MG.** 2004. 73p. Dissertation (Master Program in Soil and Plant Nutrition) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) is the major food crop and protein source in Brazil. For these reasons it is highly relevant in both economic and social national scenarios. Symbiosis of beans and nitrogen fixing bacteria can increase yields replacing nitrogen fertilizers and decreasing yield costs. The first aim of this work was to evaluate the agronomic efficiency of selected rhizobia strains compared to the recommended strain CIAT 899. Phenotypic diversity of rhizobia native populations was evaluated by cultural characteristics and analysis of total protein profiles by polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Field inoculation with strains UFLA 02-100, UFLA 02-86 and UFLA 02-127 increased grain yields similar to both treatments: the control with 70 kg.ha<sup>-1</sup> N-urea and strain CIAT 899 regarding to the control without inoculation and mineral nitrogen. There was no relationship among phenotypic grouping by cultural characteristics and protein profiles. Native populations nodulating beans are quite diverse and do not included strains similar to the strains introduced as inoculants

---

Guidance Committee: Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA (Major Professor)

### 3 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de importância reconhecida no Brasil, pelo fundamental papel na dieta da maioria da população e por sua importância econômico-social.

No entanto, a produtividade média nacional dessa importante cultura é baixa quando comparada às produtividades de outros países como Estados Unidos e China. Esta situação é decorrente do fato de que 71% da produção nacional provêm de áreas menores que 100 ha, onde o feijão ainda é cultura de subsistência, empregando, em grande parte, mão-de-obra familiar e utilização restrita de fertilizantes, gerando, desse modo, uma cadeia de deficiências nutricionais, associada à suscetibilidade a pragas e doenças.

A seleção de novas estirpes, capazes de fixar nitrogênio atmosférico quando em simbiose com o feijoeiro, é uma ferramenta importante na busca de um par simbiótico mais eficiente. Contudo, estirpes selecionadas em laboratório e casa de vegetação podem não alcançar o máximo potencial de fixação no campo, devido, entre outros fatores, à competição com a população nativa e estabelecida do solo e à baixa adaptação às condições ambientais locais.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a eficiência de estirpes de rizóbio previamente selecionadas em condições controladas, em simbiose com o feijão no campo e a comparação destas com uma das estirpes recomendadas para a produção de inoculante comercial para a cultura. Também foi avaliada a diversidade fenotípica de populações de bactérias nativas que nodulam o feijão na área em estudo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Ensaio de campo

O ensaio de campo foi conduzido em área experimental do município de Perdões, Minas Gerais, na safra das águas de 2002/2003, em um Argissolo Vermelho distrófico típico (EMBRAPA, 2000) da Fazenda Escola Vito Crincoli, em área onde não havia sido cultivado feijão sem utilização anterior de qualquer inoculante. Os resultados da análise química de amostra do solo retirada antes da semeadura do feijão encontram-se na Tabela 1. O cultivo se deu em de condição de baixa utilização de insumos, não tendo sido aplicado nenhum tipo de micronutriente nem de defensivos fitossanitários; o nível de fertilidade do solo estava abaixo das condições ideais de plantio com relação a algumas características. O ensaio foi realizado de acordo com as recomendações da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE).

Foi utilizada a cultivar BRSMG Talismã, de grão tipo carioca, lançada em 2002, que possui resistência à antracnose e ao vírus do mosaico comum e é moderadamente resistente à mancha angular (Ramalho et al., 2002).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições e sete tratamentos: testemunha sem nitrogênio mineral e sem inoculação, testemunha que recebeu adubação nitrogenada na dose de 70 kg.ha<sup>-1</sup> de N (fonte uréia) também sem inoculação, quatro isolados de rizóbio (UFLA 02-100, UFLA 02-68, UFLA 02-86 e UFLA 02-127) e uma estirpe de referência (CIAT 899), recomendada como inoculante para a cultura do feijão. A origem e algumas características culturais das estirpes de rizóbio usadas no presente ensaio encontram-se na Tabela 2.

**[REDACTED]**

O solo foi preparado com uma aração e uma gradagem, com posterior demarcação dos sulcos no terreno. A semeadura, na densidade de 15 sementes por metro linear de sulco, foi feita em 30 de novembro de 2002, após a inoculação das sementes com seus respectivos tratamentos.

**TABELA 1. Resultados da análise química de amostra de material do solo (0 a 20 cm de profundidade) antes da adubação e da semeadura <sup>1</sup>**

Característica	Unidades	Valores
pH em H <sub>2</sub> O (1:2,5)		4,9
P (fósforo Mehlich I)	mg.dm <sup>-3</sup>	14,5
K (potássio Mehlich I)	mg.dm <sup>-3</sup>	122
Ca	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	2,0
Mg	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	0,6
Al	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	0,3
H + Al	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	4,5
Soma de bases	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	2,9
CTC	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	3,2
CTC a pH 7	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	7,4
Saturação por Al	%	9,0
Saturação por bases	%	39,3
Matéria orgânica	Dag.kg <sup>-1</sup>	1,9

<sup>1</sup> Análises realizadas nos Laboratórios do Departamento de Ciências do Solo da UFLA.

O inoculante foi preparado com turfa esterilizada em autoclave, na proporção 3:1 de turfa e culturas em meio 79 (Fred & Waksman, 1928) semi-sólido na fase log (após 5 dias de crescimento), inoculando-se 500g do inoculante para cada 50kg de sementes. Todos os tratamentos, inclusive as testemunhas, receberam adubação fosfatada e potássica à base de 70 kg.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 40 kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O,

usando como fontes superfosfato triplo e cloreto de potássio, respectivamente, incorporados a 6 cm de profundidade no sulco de semeadura. Além desta adubação, a testemunha nitrogenada recebeu 70 kg.ha<sup>-1</sup> de N, parcelados em duas vezes: 35 kg.ha<sup>-1</sup> de N aplicados na semeadura e 35 kg.ha<sup>-1</sup> de N aos 20 dias após a emergência.

TABELA 2. Origem e características culturais das estirpes de rizóbios usadas no ensaio

Identificação	Origem/Estado	Características culturais em placa				
		ACI <sup>1</sup>	D <sup>2</sup>	pH <sup>3</sup>	A I <sup>4</sup>	COR
UFLA 02-68	Theobroma, RO	3	> 2	Neutro	Tem	Branca
UFLA 02-86	Theobroma, RO	3	> 2	Neutro	Tem	Branca
UFLA 02-100	Theobroma, RO	3	> 2	Neutro	Tem	Branca
UFLA 02-127	Theobroma, RO	3	> 2	Neutro	Tem	Branca
CIAT 899	Colômbia	3	> 2	Ácido	Não	Amarela

<sup>1</sup>Tempo, em dias, para o aparecimento de colônias isoladas, <sup>2</sup>diâmetro da colônia (mm), <sup>3</sup>reação do meio de cultivo após crescimento de colônias e <sup>4</sup>absorção de indicador do meio de cultivo.

As parcelas foram constituídas por seis linhas de 6m de comprimento, espaçadas em 0,50m, totalizando 18 m<sup>2</sup> de área total e 5m<sup>2</sup> de área útil (as duas linhas centrais destinadas à colheita dos grãos, respeitando um espaço de 0,50m no início e final de cada linha).

Foi realizada apenas uma capina manual, aproximadamente 30 dias após a emergências das plantas.

Por ocasião do florescimento foram coletadas 10 plantas de cada parcela, na segunda e quinta linhas, para avaliação da nodulação (contagem e matéria seca) e parte aérea (matéria seca, teor e acúmulo de N e eficiência relativa).

A colheita foi realizada em 27 de fevereiro de 2003, durante período bastante chuvoso e com a área novamente infestada com plantas daninhas. Foi avaliado o rendimento de grãos e o teor de nitrogênio nos grãos. Para avaliação do rendimento de grãos, a sua umidade foi corrigida para 13%.

O nitrogênio total foi calculado pelo método semi-microkjedahl, de acordo com Sarruge & Haag (1979), determinando-se a percentagem de N na matéria seca da parte aérea e nos grãos. O N acumulado na parte aérea foi calculado multiplicando-se o peso da matéria seca da parte aérea e da percentagem de N.

A eficiência relativa de cada parcela foi calculada segundo a expressão:

$$Efr = \frac{MSPA_{inoculada}}{MSPA_{comN}} \times 100$$

Onde: Efr – eficiência relativa; MSPA inoculada – matéria seca da parte aérea da planta inoculada; MSPA com N – matéria seca da parte aérea da planta com N mineral.

## **4.2 Diversidade fenotípica de populações nativas que nodulam o feijoeiro**

### **4.2.1 Captura de rizóbios nativos densidade e eficiência**

Em área adjacente ao local do experimento de campo foram coletadas duas amostras de solo, em agosto de 2003 e estas foram encaminhadas ao laboratório onde foram realizadas as diluições seriadas decimais.

A captura dos rizóbios nativos foi realizada com a da utilização de plantas-isca. No propósito deste trabalho, a planta-isca foi o feijoeiro.

O experimento para a captura e contagem e avaliação da eficiência de rizóbios foi conduzido em vasos de Leonard (Vincent, 1970), no Laboratório de

Microbiologia do Solo/DCS/UFLA, nos meses de setembro e outubro de 2003, utilizando a mesma cultivar de feijão do experimento de campo.

O delineamento estatístico empregado para os dados de número e matéria seca de nódulos e matéria seca da parte aérea foi o inteiramente casualizado, com seis repetições (três em cada amostra de solo) e nove tratamentos. Os tratamentos foram as inoculações com 1 mL da suspensão de solo das diluições seriadas  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ , além de duas testemunhas (uma com adição de N mineral e outra sem N mineral, ambas sem inoculação) para verificação da ausência de contaminação e para comparações com as plantas inoculadas. O nitrogênio, quando aplicado, foi parcelado em três parcelas, a intervalos de 10 dias, totalizando 210 mg de N por vaso na forma de  $\text{NO}_3\text{NH}_3$ .

A parte superior dos vasos de Leonard continha uma mistura 1:1 de areia (250 mL) e vermiculita (250mL), enquanto a inferior continha solução nutritiva de Jensen modificada (Anexo - C), autoclavada por 30 minutos a  $1,5 \text{ kg.cm}^{-2}$  e a  $127^\circ\text{C}$ . Após o preparo, os vasos foram autoclavados por uma hora, a pressão de  $1,5 \text{ kg.cm}^{-2}$  e a  $127^\circ\text{C}$ .

As sementes utilizadas foram desinfestadas superficialmente com etanol 70% por 5 minutos e hipoclorito de sódio a 1%, por 3 minutos. Em seguida, foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Foram então semeadas quatro sementes por vaso e, posteriormente, foi feita a inoculação com as suspensões provenientes das diluições seriadas, colocando-se 1 mL junto a cada semente.

Também foi colocada, sobre a superfície do vaso, uma fina camada de mistura esterilizada de areia, benzeno e parafina (proporção de 5:1:0,015, respectivamente), com a finalidade de evitar possíveis contaminações.

Manteve-se o nível de solução nutritiva nos vasos com reposição periódica de solução autoclavada. Decorridos três a cinco dias após a

germinação, foi feito o desbaste, deixando-se somente uma planta por vaso. As plantas foram colhidas por ocasião do florescimento para a determinação da nodulação (contagem e matéria seca) e matéria seca da parte aérea, além do isolamento das bactérias nativas presentes nos nódulos.

Para a estimativa do número mais provável (NMP) de células de rizóbio nas duas amostras coletadas, considerou-se positivo para presença e negativo para ausência de nódulos, em cada diluição, usando o programa “Most Probable Number Estimate” (MPNES) (Woomer et al., 1988).

#### **4.2.2 Isolamento dos rizóbios presentes nos nódulos**

Três nódulos de cada planta-isca foram utilizados para o isolamento de rizóbios. Estes nódulos foram primeiramente imersos em álcool etílico 95%, por 30 segundos, com o objetivo de quebrar a tensão superficial e posteriormente imersos em  $H_2O_2$  por 1 minuto, para esterilizar a superfície do nódulo e, depois, lavados seis vezes em água esterilizada para a retirada do  $H_2O_2$ . Os nódulos foram então esmagados com o auxílio de uma pinça devidamente esterilizada, em placas contendo meio de cultura YMA com azul de bromotimol, sendo o material interno espalhado nas placas para a obtenção de colônias isoladas (Vincent, 1970).

#### **4.2.3 Caracterização cultural dos isolados**

Após a obtenção de colônias isoladas e puras, os isolados foram então identificados e crescidos em placas contendo meio de cultura 79, para caracterização cultural e armazenamento em “deep freezer” (-80° C).

Foram avaliadas as seguintes características culturais dos isolados: taxa de crescimento medido pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (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, conforme Morcira et al., 1993), diâmetro médio no aparecimento de colônias isoladas (< 1 mm, 1 a 2 mm e > 2 mm), modificação do pH do meio (acidificação, alcalinização e neutro), produção de goma (baixa, média e alta) e coloração das colônias (amarela ou branca).

#### **4.2.4 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Anexo B)**

Após o crescimento em placa, as estirpes em estudo (Tabela 2), os isolados nativos, estirpes tipo e de referência de espécies conhecidas foram então crescidos por dois cultivos sucessivos em meio TY sólido, nas mesmas condições de temperatura e luminosidade para todas as estirpes e os isolados utilizados. Posteriormente, foi feita a inoculação de colônias isoladas em 50 mL de meio de cultura líquido TY (Anexo A). O crescimento se deu com agitação constante a 120 rpm por 4 dias, à temperatura de 28°C . O meio de crescimento com as bactérias foi então centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao “pelet” formado foi adicionado o tampão NaPBS (Anexo A), que foi novamente centrifugado, repetindo-se esse processo 3 vezes até a total lavagem das células.

Foram pesados 70 mg de células de cada isolado em tubo Eppendorf e, em seguida, adicionou-se 0,9 mL do tampão da amostra (TTA) (Anexo A) mais 0,1 mL SDS 20%, para a solubilização das proteínas. Posteriormente, aqueceu-se a mistura em banho maria a 95°C, por 10 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos, à temperatura de 4°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pelo método Laemmli (1970), com modificações descritas por Jackmam (1985).

Para a eletroforese utilizou-se um gel de sistema descontinuo, 12% para o gel separador e 5% para o gel de concentração (Anexo C). Foram aplicadas ao gel 30 $\mu$ L de cada amostra.

Uma matriz binária dos dados originais foi construída, compreendendo 15 cadeias polipeptídicas (bandas) representativas dos perfis gerados.

Os grupos formados foram comparados com as estirpes tipo e com as estirpes usadas como inoculante no ensaio de campo.

#### **4.3 Análises estatísticas**

Os dados do ensaio de campo e do ensaio com vasos de Leonard 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 de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os dados de caracterização cultural e perfil protéico total não foram submetidos à análise de variância, sendo as estirpes e os isolados obtidos agrupados utilizando o método UPGMA (“average linkage clustering”), cujo princípio baseia-se na distância intergrupo, que é a média das distâncias pareadas dos membros dos dois grupos e representados por um dendograma de similaridade (NTSYS-pc, versão 2.01, Slice et al., 1994).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Ensaio de campo**

Os resultados médios das características avaliadas encontram-se nas Tabelas 3 e 4. Os tratamentos afetaram todas as características avaliadas, exceto a eficiência relativa dos isolados. Sabe-se que o pico da atividade da nitrogenase (enzima responsável pelo processo de fixação biológica de nitrogênio) em

feijoeiro ocorre depois da floração (Franco et al., 1979), período em que foram coletadas as plantas para determinação da MSPA. Contudo, a produção de MSPA foi afetada significativamente e a estirpe UFLA 02-127 se destacou das demais, ficando no mesmo grupo da Test. c/N (Tabela 3). Estes resultados de eficiência relativa e de MSPA assemelham-se aos obtidos por Oliveira (1996), ao testar os efeitos da inoculação de estirpes de rizóbio sobre o feijoeiro, também coletando as plantas no período do florescimento.

Em relação ao número de nódulos (NN), todas as estirpes permaneceram no mesmo grupo, igualando-se à Test s/N, indicando boa nodulação por populações nativas de rizóbio. A dose de 70 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio foi suficiente para inibir a nodulação por rizóbios nativos, tendo em vista que a Test c/N foi a que apresentou menor NN e ficou no grupo inferior ao dos demais tratamentos.

Todas as estirpes testadas apresentaram matéria seca de nódulos (MSN) semelhantes e ficaram no mesmo grupo. As duas testemunhas apresentaram MSN inferior aos das estirpes, ou seja, apesar da Test s/N não ter diferido das estirpes quanto ao NN, estes nódulos não apresentaram o mesmo peso em relação aos nódulos dos tratamentos que receberam inoculação, indicando a baixa eficiência da população, por serem nódulos pouco eficientes. O tamanho dos nódulos das testemunhas também foi menor do que os nódulos dos tratamentos inoculados, cerca de 2 mm para as testemunhas e 3 mm para os tratamentos inoculados.

TABELA 3. Valores médios do número de nódulos por planta (NN), matéria seca de nódulos (MSN) (mg.planta<sup>-1</sup>), matéria seca da parte aérea (MSPA) (g.planta<sup>-1</sup>), eficiência relativa (Efr %), acúmulo de N na parte aérea (mg.planta<sup>-1</sup>), em função das fontes de nitrogênio sobre o feijoeiro, cultivar BRSMG-Talismã, no experimento de campo em Perdões, MG<sup>1</sup>

Fontes de N	NN	MSN	MSPA	Efr	Acúmulo de N PA
Test s/N	56,00 a	118,35 b	3,87 b	66,64 a	128,85 b
UFLA 02-100	69,32 a	195,85 a	4,17 b	73,15 a	166,59 b
CIAT 899	70,87 a	206,90 a	4,37 b	77,95 a	162,71 b
UFLA 02-68	77,35 a	209,32 a	4,87 b	96,03 a	175,90 b
UFLA 02-86	70,90 a	208,65 a	5,02 b	88,78 a	174,35 b
UFLA 02-127	79,92 a	226,77 a	6,58 a	116,60 a	245,35 a
Test c/N	31,52 b	116,52 b	5,92 a	100,00 a	219,38 a
CV (%)	26,40	11,14	21,84	26,81	23,29

<sup>1</sup> Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 4. Valores médios de rendimento de grãos (kg.ha<sup>-1</sup>), teor de N nos grãos (%) e acúmulo de N nos grãos (kg.ha<sup>-1</sup>), em função das fontes de nitrogênio sobre o feijoeiro, cultivar BRSMG-Talismã, no experimento de campo em Perdões, MG<sup>1</sup>

Fontes de N	Rendimento	Teor N grãos	Acúmulo N grãos
Test sem N	422,15 b	3,28 b	13,79 c
UFLA 02-100	909,65 a	3,76 a	34,42 a
CIAT 899	974,64 a	3,82 a	37,04 a
UFLA 02-68	682,67 b	3,58 a	24,59 b
UFLA 02-86	877,61 a	3,62 a	31,58 a
UFLA 02-127	826,43 a	3,54 a	29,33 a
Test com N	1041,81 a	3,74 a	38,55 a
CV (%)	22,78	5,31	21,73

<sup>1</sup> Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O rendimento médio de grãos variou de 422 a 1.041 kg.ha<sup>-1</sup>. A inoculação com as estirpes UFLA 02-100, UFLA 02-86 e UFLA 02-127 proporcionou rendimentos de grãos semelhantes aos da estirpe referência CIAT 899 e da Test c/N. Somente a estirpe UFLA 02-68 foi inferior às demais, permanecendo no mesmo grupo da Test s/N. Hungria et al. (2000), estudando a eficiência de novos isolados, obtiveram rendimentos de grãos superiores aos encontrados neste trabalho; houve resposta em função da inoculação de novas estirpes, tendo algumas também proporcionado rendimento de grãos semelhantes ao da estirpe referência CIAT 899 e da testemunha com nitrogênio mineral. Mostasso et al. (2001) também obtiveram rendimento de grãos superiores a 2.000 kg.ha<sup>-1</sup> em função da inoculação com estirpes selecionadas. Ainda que o nível de fertilidade do solo e das adubações de base com fósforo e potássio usados por Hungria et al. (2000) e Mostasso et al. (2001) tenha sido superior aos usados no presente ensaio, os rendimentos obtidos com os isolados não diferiram estatisticamente das estirpes referência e da testemunha que recebeu nitrogênio mineral.

A inoculação com a estirpe UFLA 02-127 proporcionou maior acúmulo de N na parte aérea e se destacou das demais estirpes, permanecendo no mesmo grupo da Test c/N, mostrando-se superior à estirpe referência CIAT 899.

Todas as estirpes apresentaram teor de nitrogênio nos grãos semelhantes e permaneceram no mesmo grupo da Test c/N, sendo superiores à Test s/N. Já para acúmulo total de nitrogênio nos grãos, a estirpe UFLA 02-68 foi inferior às demais, permanecendo no grupo intermediário. Este resultado é explicado pelo fato dessa mesma estirpe também ter proporcionado menor rendimento de grãos em relação às outras.

## **5.2 Diversidade fenotípica de populações nativas que nodulam o feijoeiro**

### **5.2.1 Densidade da população nativa**

Os dados de número e matéria seca de nódulos e matéria seca da parte aérea das plantas obtidas no ensaio em vasos de Leonard encontram-se na Tabela 5.

Neste experimento, ficou evidenciado visualmente o baixo crescimento das plantas inoculadas com as suspensões de solo (Figura 1), indicando baixa eficiência das populações de rizóbios nativos.

Somente as plantas inoculadas com suspensão de solo até à diluição  $10^{-4}$  apresentaram nódulos. Não houve contaminação do experimento porque nenhuma das testemunhas apresentou nódulos em suas raízes. As inoculações com suspensão de solo diferiram estatisticamente em relação ao número e matéria seca de nódulos até à diluição  $10^{-4}$  (Tabela 5).

As inoculações de suspensão de solo não promoveram aumento na matéria seca da parte aérea (MSPA) e somente a testemunha que recebeu nitrogênio mineral ( $210 \text{ mg.planta}^{-1}$ ) produziu maior MSPA, corroborando com a constatação da ineficiência das populações nativas de rizóbio.

A população de rizóbio calculada pelo método das diluições sucessivas variou de  $1,4 \times 10^3$  rizóbios por grama de solo (Amostra 1) a  $4,2 \times 10^3$  rizóbios por grama de solo (Amostra 2). Estes valores estão dentro dos encontrados por Pereira (2000), que avaliou a densidade de populações nativas de rizóbio em 15 amostras de solo de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia, utilizando o siratro como planta isca.

TABELA 5. Valores médios do número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN) e matéria seca da parte aérea (MSPA), em função das diluições utilizadas e da ausência ou presença de nitrogênio mineral<sup>1</sup>

Tratamentos	NN	MSN (mg.planta <sup>-1</sup> )	MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )
Diluição 10 <sup>-1</sup>	270 a	155 a	0,75 b
Diluição 10 <sup>-2</sup>	125 b	98 b	0,70 b
Diluição 10 <sup>-3</sup>	77 c	55 c	0,62 b
Diluição 10 <sup>-4</sup>	3 d	6 d	0,58 b
Diluição 10 <sup>-5</sup>	0 d	0 d	0,52 b
Diluição 10 <sup>-6</sup>	0 d	0 d	0,44 b
Diluição 10 <sup>-7</sup>	0 d	0 d	0,36 b
Test s/N	0 d	0 d	0,35 b
Test c/N	0 d	0 d	2,87 a
CV (%)	85,26	69,09	66,36

<sup>1</sup> Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

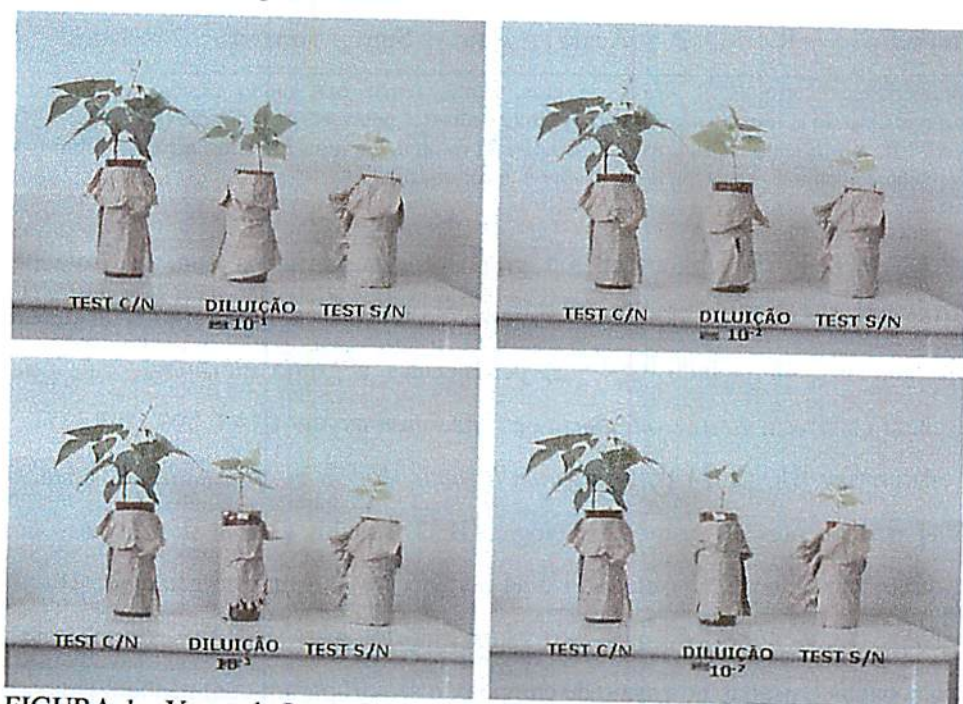


FIGURA 1. Vasos de Leonard do experimento de captura de rizóbios, no início do florescimento

### 5.2.2 Caracterização cultural

Os 57 isolados obtidos de nódulos das plantas de feijoeiro foram agrupados com base em suas características culturais, conforme a Tabela 6 e representados em um dendograma de similaridade, conforme a Figura 2.

TABELA 6. Agrupamento e número de isolados de rizóbio de nódulos de feijoeiro, conforme suas características culturais

Grupos	Características culturais						Nº de isolados
	1	2	3	4	5	6	
Grupo A	R	> 2	Ácido	Alta	Sim	Amarela	48 isolados
Grupo B	R	1 a 2	Ácido	Alta	Sim	Amarela	4 isolados
Grupo C	R	> 2	Ácido	Média	Sim	Amarela	2 isolados
Grupo D	R	> 2	Neutro	Alta	Não	Branca	1 isolado
Grupo E	R	> 2	Ácido	Alta	Sim	Amarela	2 isolados

Características culturais: 1 -Taxa de crescimento, sendo MR muito rápida (1 dia para aparecimento de colônias isoladas), R rápido (2-3 dias), I intermediário (4-5 dias), L lento (6-10 dias), ML muito lento (> 10 dias), 2 Diâmetro da colônia, em mm, 3 -pH do meio de cultura, 4 Produção de goma, 5 Absorção do indicador e 6 cor da colônia

A 80% de similaridade, 5 grupos foram formados com os isolados nativos da área em estudo. Os 57 isolados de feijoeiro apresentaram o seguinte agrupamento: 48 isolados (84,5%) pertencentes a grupo morfológico A, que também conteve a estirpe referência de *Rhizobium tropici* CIAT 899 (BR 322) e a estirpe tipo BR 10051 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseolii*, 4 isolados (7%) pertencentes ao grupo morfológico B, 2 isolados (3,5%) pertencentes ao grupo morfológico C, 1 isolado (1,5%) pertencente ao grupo morfológico D e 2 isolados (3,5%) pertencentes ao grupo morfológico E. As estirpes pré-selecionadas e usadas no ensaio de campo não se agruparam com nenhum isolado

nativo da área em estudo, a 80% de similaridade, com base em suas características culturais.

Pereira (2000), utilizando o siratro como planta isca para isolamento de rizóbios nativos da Amazônia, também verificou que a maioria dos isolados de crescimento rápido pertencia ao grupo que continha a estirpe referência CIAT 899 (BR 322).

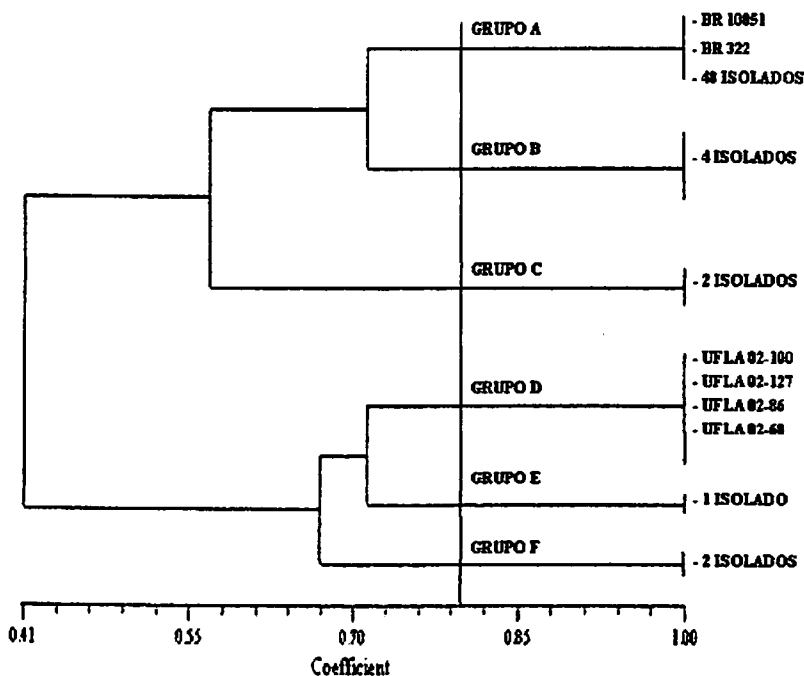


FIGURA 2. Dendrograma de similaridade construído de acordo com as características culturais dos isolados de feijoeiro e as estirpes referência CIAT 899 (BR 322), UFLA 02-68, UFLA 02-86, UFLA 02-100 e UFLA 02-127 e da estirpe tipo BR 10051-*Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*

### 5.2.3 Análise de proteínas totais por SDS-PAGE

Os isolados formaram 6 grupos com base no perfil eletroforético de proteína total. Os perfis eletroforéticos de proteína total dos isolados e das

estirpes referência e as estirpes tipo encontram-se na Figura 3. O dendograma de similaridade, obtido a partir dos perfis eletroforéticos dos isolados e das estirpes referência e as estirpes tipo, pode ser visualizado na Figura 4.

O grupo A foi formado por 47 isolados e a estirpe tipo BR 10.051 de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. Nenhuma outra estirpe referência, nem as estirpes tipo agruparam-se, a 80% de similaridade, com os demais isolados nativos da área em estudo.

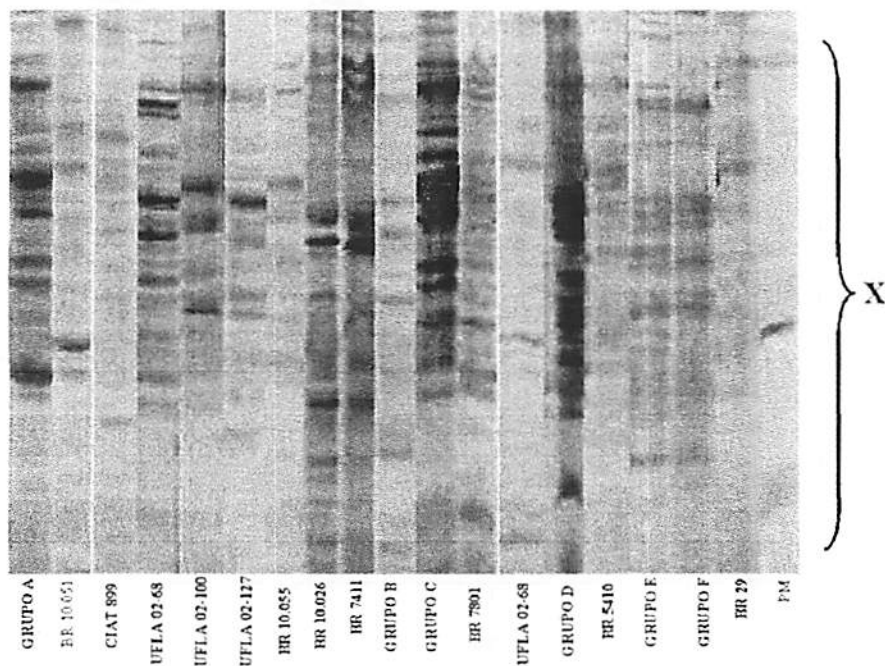


FIGURA 3. Perfis de proteína celular total de estirpes isoladas do solo da área em estudo, das estirpes referência e das estirpes tipo obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) X = área utilizada – 15 bandas; PM = padrão de peso molecular LMWM

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 *R. tropici*, em solos que não receberam calagem e portanto, com valores menores de pH, o que também foi observado nesse trabalho. Mhandi et al. (1999) obtiveram isolados de feijoeiro em solos da Tunísia, sendo 1/3 classificado como *R. gallicum*, 1/3 como *R. etli* e *R. leguminosarum* e o restante em outras espécies que nodulam o feijoeiro. O resultado desse trabalho contraria os encontrados por Hungria et al. (2000), que discutem o domínio de isolados com características de *R. tropici* nas regiões tropicais, devido à sua estabilidade genética, tolerância à acidez e altas temperaturas e concorda com os resultados obtidos por Pereira (2000), que encontrou maior similaridade dos isolados estudados com *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* do que com *Rhizobium tropici*.

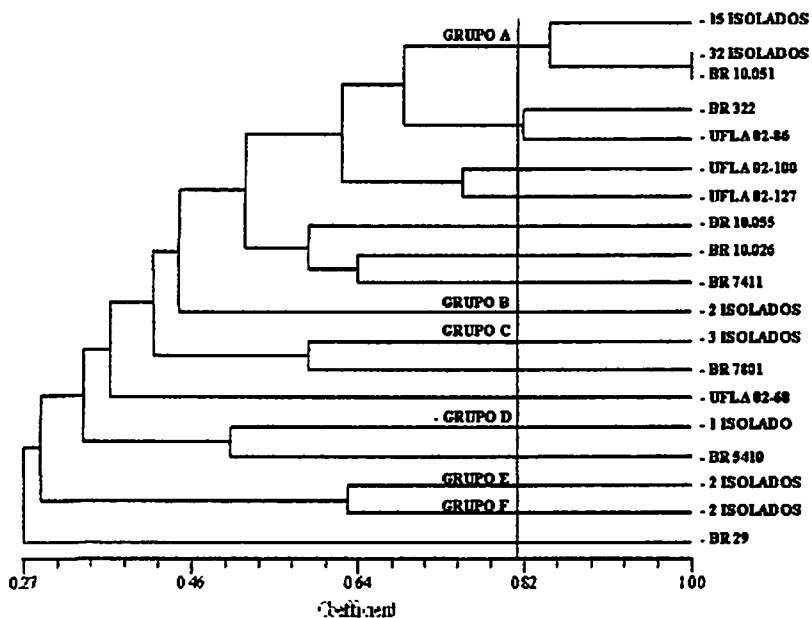


FIGURA 4. Dendrograma de similaridade construído com o perfil protéico total dos isolados, das estirpes referência (BR 322, UFLA 02-68, UFLA 02-86, UFLA 02-100 e UFLA 02-127) e das estirpes tipo LMG 4285 (BR 10.051-*Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoloi*); CNF 42<sup>T</sup> (BR 10.026-*Rhizobium etli*); HAMBÍ 540<sup>T</sup> (BR 10.055-*Rhizobium galegae* bv *orientalis*); NZP 4027<sup>T</sup> (BR 7411-*Sinorhizobium melioli*); NZP 2213<sup>T</sup> (BR 7801-*Mesorhizobium loti*); ORS 571<sup>T</sup> (BR 5410-*Azorhizobium caulinodans*) e BR 29-*Bradyrhizobium elkanii*

## 6 CONCLUSÕES

A inoculação com as estirpes UFLA 02-86, UFLA 02-100 e UFLA 02-127 contribuiu de forma significativa para o aumento no rendimento e acúmulo de N em grãos no feijoeiro e não diferiu da inoculação com a estirpe referência CIAT 899.

A população nativa apresentou alta diversidade fenotípica cultural e padrões protéicos.

Não houve relação entre os grupos fenotípicos de perfil protéico total e caracterização cultural celular.

Com base no perfil protéico total, a maioria dos isolados da população nativa foi classificada, a 80% de similaridade como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*.

As estirpes inoculadas e eficientes são fenotipicamente distintas das estirpes que compõem a população nativa.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (ed.). *Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity*. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 546.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília: Embrapa, 2000. 412 p.

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. NEYRA, C. A. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 63, n. 3, p. 421-424, Mar. 1979.

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

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGIAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L. ) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11/12, p. 1515-1528, Oct. 2000.

JACKMAN, P. J. H. Bacterial taxonomy based on eletrophoretic whole-cel protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (Ed.). **Chemical methods in bacterial systematics**. London: Academic Press, 1985. p. 119-129.

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.

MANDHI, R.; JEBARA, M.; AOUANI, M. E.; GHRIR, R.; MARS, M. Genotypic diversity and symbiotic efetiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grow in Tunisian soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 28, n. 3, p. 313-320, Jan. 1999.

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

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolous vulgaris* L. ) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 73, n. 2/3, p. 121-132, Jan. 2001.

OLIVEIRA, W. S. **Interação *Rhizobium*/Feijoeiro sob as condições de agricultura de subsistência na região de Cunha-SP**. 1996. 68 p. Dissertação (Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

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

**RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; CARNEIRO, J. E. S.; GONCALVES, F. M. A.; SANTOS, J. B.; PELOSO, M. J. D.; FARIA, L. C.; CARNEIRO, G. E. S. O “talismã” de sua lavoura de feijoeiro. Local: EMBRAPA-CNPAP, 2002. 4 p. (EMBRAPA-CNPAP. Comunicado Técnico ; 36).**

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

**SLICE, D. E.; KIM, J.; WALKER, J. NTSYS-Numerical taxonomy and multivariate analysis system: versão 1. 80. [S. l.: s. n. ], 1994.**

**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.**

**VINCENT, J. M. A. Manual for the Pratical Study of root-nodule bacteria. Oxford and Edinburgh, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.**

## CAPÍTULO 3

### EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE RIZÓBIOS SELECIONADOS E DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES NATIVAS QUE NODULAM O CAUPI EM PERDÕES/MG

#### 1 RESUMO

SOARES, André Luis de Lima. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas que nodulam o caupi em Perdões, MG. 2004, 73p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

O caupi (*Vigna unguiculata* L.) é considerado alimento básico da população menos favorecida no nordeste do Brasil. A possibilidade da interação do caupi com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico pode aumentar os níveis de produtividade e diminuir os custos de produção. No presente trabalho avaliou-se, no campo, a eficiência agronômica de estirpes selecionadas de rizóbio em simbiose com o caupi, comparadas à estirpe recomendada para a produção de inoculantes comerciais (BR 2001). A diversidade fenotípica das populações nativas foi avaliada de acordo com as características culturais por meio de análise de proteína total por eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE). Verificou-se que a inoculação no campo com as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B contribuiu de forma significativa para o aumento no rendimento de grãos, sendo semelhantes à testemunha com 70 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio e superior à estirpe BR 2001 até então recomendada para a produção de inoculantes comerciais. A população nativa apresenta alta diversidade fenotípica cultural e padrões protéicos. As estirpes inoculadas são bastante distintas fenotipicamente de estirpes que compõem a população nativa. As estirpes utilizadas foram diferentes das estirpes isoladas da população nativa.

---

Orientadora: Fátima Maria de Sousa Morcira

## 2 ABSTRACT

SOARES, André Luis Lima. Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native populations able to nodulate cowpea in Perdões, MG. 2004. 73p. Dissertation (Master Program in Soil and Plant Nutrition) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.

Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) is the main food crop of poor populations in North and Northeast regions, Brazil. Symbiosis of cowpea and nitrogen fixing bacteria (NFB) can increase yields replacing nitrogen fertilizers and decreasing yield costs. The first aim of this work was to evaluate the agronomic efficiency of selected rhizobia strains compared to the recommended strain BR 2001. Phenotypic diversity of rhizobia native populations was evaluated by cultural characteristics and analysis of total protein profiles by polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Field inoculation with strains UFLA 03-84 and INPA 03-11B increased grain yields similar to both treatments: the control with 70 kg.ha<sup>-1</sup> N-urea and strain BR2001 regarding the control without inoculation and mineral nitrogen. There was no relationship among phenotypic grouping by cultural characteristics and protein profiles. Native populations nodulating cowpea are quite diverse and do not included strains similar to the strains introduced as inoculants

---

Guidance Committee: Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA (Major Professor)



### 3 INTRODUÇÃO

Dentre as leguminosas cultivadas no Nordeste do Brasil, destaca-se o caupi como a principal cultura de subsistência no sertão semi-árido da região, excelente fonte de proteína de baixo custo e alimento básico para a população menos favorecida. O caupi também é bastante cultivado nas regiões tropicais dos continentes africano, asiático e americano. Esta cultura representa aproximadamente 20% de todos os feijões produzidos no Brasil (Borém & Carneiro, 1998) e apresenta baixos rendimentos médios, em torno de 400 a 500 kg.ha<sup>-1</sup> (Lacerda, 2002).

A possibilidade da interação do caupi com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, vulgarmente denominadas de rizóbios, via utilização de inoculantes, pode permitir o aumento de rendimento da cultura. Este processo pode ser uma alternativa para a substituição total ou parcial dos adubos nitrogenados, desde que supra a cultura com o nitrogênio necessário para o seu crescimento e desenvolvimento, além de diminuir os custos de produção e economizar combustíveis fósseis utilizados para a fabricação de fertilizantes nitrogenados.

A seleção de novas estirpes, na busca de um par simbiótico mais eficiente, capaz de fixar maiores quantidades de nitrogênio atmosférico quando em simbiose com caupi, é extremamente importante para a produção de inoculantes.

No entanto, as estirpes selecionadas em laboratório e casa de vegetação podem não alcançar o máximo potencial de fixação no campo, devido, entre outros fatores, à competição com a população nativa estabelecida do solo e à adaptação às condições ambientais locais, tornado-se necessário também o estudo de densidade e diversidade da população de rizóbios nativos (Pereira, 2000).

Neste trabalho, avaliou-se a eficiência de estirpes de rizóbio previamente selecionadas em condições controladas (Lacerda et al., 2004), em simbiose com o caupi no campo, bem como a comparação destas com a estirpe recomendada para a produção de inoculante comercial para a cultura. Também foi avaliada a diversidade fenotípica de populações nativas que nodulam o feijão caupi da área em estudo.

## 4 MATERIAL MÉTODOS

### 4.1 Ensaio de campo

O ensaio de campo foi conduzido em área experimental do município de Perdões, Minas Gerais, de novembro de 2002 a março de 2003, em um Argissolo Vermelho distrófico típico (EMBRAPA, 2000), da Fazenda Escola Vito Crincoli, em área onde não havia sido cultivado caupi e sem utilização anterior de qualquer inoculante. Resultados de análise química de amostra de material desse solo antes do plantio encontram-se na Tabela 1. O cultivo se deu em condição de baixa utilização de insumos, não tendo sido aplicado nenhum tipo de micronutrientes nem de defensivos fitossanitários; o nível de fertilidade do solo estava abaixo das condições ideais de plantio com relação a algumas características. O ensaio foi realizado de acordo com as recomendações da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE).

Foi utilizada a cultivar BR-14 Mulato (Cardoso et al., 1990), portadora de imunidade ao vírus do mosaico severo do caupi, e altamente resistente à sarna (*Sphaceloma* sp.).

O delineamento experimental foi blocos casualizados com quatro repetições e sete tratamentos: uma testemunha sem nitrogênio mineral e sem inoculação, outra que recebeu adubação nitrogenada na dose de 70 kg.ha<sup>-1</sup> de N

(fonte uréia) também sem inoculação, quatro estirpes de rizóbio (UFLA 03-36, UFLA 03-84, UFLA 03-129 e INPA 03-11B) e a estirpe referência (BR 2001), recomendada desde 1985 como inoculante para a cultura do caupi. A origem e algumas características culturais das estirpes de rizóbio usadas no presente ensaio encontram-se na Tabela 2.

TABELA 1. Resultados da análise química de amostra de material do solo (0 a 20 cm de profundidade) antes da adubação e da semeadura<sup>1</sup>

Característica	Unidades	Valores
pH em H <sub>2</sub> O (1:2,5)		4,9
P (fósforo Mehlich I)	mg.dm <sup>-3</sup>	14,5
K (potássio Mehlich I)	mg.dm <sup>-3</sup>	122
Ca	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	2,0
Mg	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	0,6
Al	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	0,3
H + Al	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	4,5
Soma de bases	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	2,9
CTC	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	3,2
CTC a pH 7	Cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	7,4
Saturação por Al	%	9,0
Saturação por bases	%	39,3
Matéria orgânica	Dag.kg <sup>-1</sup>	1,9

<sup>1</sup> Análises realizadas nos Laboratórios do Departamento de Ciências do Solo da UFLA

O solo foi preparado com uma aração e uma gradagem, com posterior demarcação dos sulcos no terreno. A semeadura foi feita no dia 30 de novembro de 2002, após a inoculação das sementes, com a densidade de 10 sementes por metro de sulco.

O inoculante foi preparado com turfa esterilizada em autoclave, na proporção 3:1 de turfa e culturas em meio 79 (Fred & Waksman 1928), semi-sólido na fase log (após 5 dias de crescimento), inoculando-se 500g do inoculante para cada 50kg de sementes. Todos os tratamentos, inclusive as testemunhas, receberam adubação fosfatada e potássica à base de 70 kg.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 40 kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, usando como fontes superfosfato triplo e cloreto de potássio, respectivamente, incorporados nos sulcos de semadura a 6 cm de profundidade. Além desta adubação, a testemunha nitrogenada recebeu 70 kg.ha<sup>-1</sup> de N, parcelados em duas vezes: 35 kg.ha<sup>-1</sup> de N no plantio e 35 kg.ha<sup>-1</sup> de N aos 20 dias após a emergência.

TABELA 2. Origem e características culturais das estirpes de rizóbios usadas no ensaio

Identificação	Origem/Estado	Características culturais em placa				
		ACI <sup>1</sup>	D <sup>2</sup>	pH <sup>3</sup>	A I <sup>4</sup>	COR
UFLA 03-36	Theobroma, RO	4	1-2	Neutro	Não	Branca
UFLA 03-84	Ji-Paraná, RO	6	1-2	Alcalino	Não	Branca
UFLA 03-129	Pedro Peixoto, AC	7	1-2	Neutro	Não	Amarela
INPA 03-11B	Terra Firme, AM	7	1	Alcalino	Não	Branca
BR 2001	Libéria, África	8	1-2	Alcalino	Não	Branca

<sup>1</sup>Tempo em dias, para aparecimento de colônias isoladas, <sup>2</sup>diâmetro da colônia em mm, <sup>3</sup>reação do meio de cultivo após crescimento de colônias e <sup>4</sup>absorção de indicador do meio de cultivo

As parcelas foram constituídas por seis linhas de 6m de comprimento, espaçadas em 1,0m, totalizando 36m<sup>2</sup> de área total e 10m<sup>2</sup> de área útil (as duas linhas centrais destinadas à colheita dos grãos, respeitando um espaço de 0,50m no início e final de cada linha).

Foi realizada uma única capina manual, aproximadamente, aos 30 dias após a emergência das plantas.

Por ocasião do florescimento, foram coletadas 10 plantas de cada parcela, na segunda e quinta linhas, para avaliação da nodulação (contagem e matéria seca) e parte aérea (matéria seca, teor e acúmulo de N e eficiência relativa).

A colheita foi realizada no dia 6 de março de 2003, durante período bastante chuvoso e com a área novamente infestada com plantas daninhas. Avaliaram-se o rendimento de grãos e o teor de nitrogênio nos grãos. Para avaliação do rendimento de grãos, a sua umidade foi corrigida para 13%.

O nitrogênio total foi calculado pelo método semi-microkjedahl, de acordo com Sarruge & Haag (1979), determinando-se a percentagem de N na matéria seca da parte aérea e nos grãos. O N acumulado na parte aérea foi calculado a partir do peso da matéria seca da parte aérea e da percentagem de N.

A eficiência relativa de cada parcela foi calculada segundo a

expressão:

$$E_{fr} = \frac{MSPA_{inoculada}}{MSPA_{comN}} \times 100$$

Onde: Efr – eficiência relativa; MSPA inoculada – matéria seca da parte aérea da planta inoculada; MSPA com N – matéria seca da parte aérea da planta com N mineral.

## **4.2 Diversidade fenotípica de populações nativas que nodulam o caupi**

### **4.2.1 Captura de rizóbios nativos densidade e eficiência**

O experimento para a captura e contagem e avaliação da eficiência de rizóbios foi conduzido em vasos de Leonard (Vincent, 1970), no Laboratório de Microbiologia do Solo/DCS/UFLA, nos meses de setembro e outubro de 2003, utilizando como planta isca a mesma cultivar de caupi do experimento de campo.

Foram coletadas duas amostras de solo em área adjacente ao local do experimento de campo, em agosto de 2003 e estas foram encaminhadas ao laboratório, onde foram realizadas as diluições seriadas decimais.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições (três de cada amostra de solo) e nove tratamentos. Os tratamentos foram as inoculações com 1 mL da suspensão de solo das diluições seriadas  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ , além de duas testemunhas (uma com adição de N mineral e sem inoculação e outra sem N mineral e também sem inoculação) para controle da possível contaminação e para comparações com as plantas inoculadas. O nitrogênio, quando aplicado correspondeu a três parcelas com intervalos de 10 dias, totalizando 210 mg de N por vaso, na forma de  $\text{NO}_3\text{NH}_3$ .

A parte superior dos vasos de Leonard continha uma mistura 1:1 de areia (250 mL) e vermiculita (250mL), enquanto a inferior continha solução nutritiva de Jensen modificada (Anexo - C), autoclavada por 30 minutos a  $1,5 \text{ kg.cm}^{-2}$  e a  $127^\circ\text{C}$ . Após o preparo, os vasos foram autoclavados por uma hora, a pressão de  $1,5 \text{ kg.cm}^{-2}$  e a  $127^\circ\text{C}$ .

As sementes utilizadas foram desinfestadas superficialmente com etanol 70% por 5 minutos e hipoclorito de sódio a 1%, por 3 minutos. Em seguida, foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Foram então semeadas

quatro sementes por vaso e, posteriormente, foi feita a inoculação, colocando-se, junto a cada semente, 1 mL da suspensão proveniente das diluições seriadas.

Também foi colocada, sobre a superfície do vaso, uma fina camada de mistura esterilizada de areia, benzeno e parafina (proporção de 5:1:0,015, respectivamente), com a finalidade de evitar possíveis contaminações.

Manteve-se o nível de solução nutritiva nos vasos, repondo periodicamente com solução autoclavada. Decorridos três a cinco dias após a germinação foi feito o desbaste, deixando-se somente uma planta por vaso. As plantas foram colhidas por ocasião do florescimento, para determinação da nodulação (contagem e matéria seca), matéria seca da parte aérea e para o isolamento das bactérias nativas presentes nos nódulos.

Para a estimativa do número mais provável (NMP) de células de rizóbio nas duas amostras coletadas, considerou-se positivo para presença e negativo para ausência de nódulos, em cada diluição, usando o programa “Most Probable Number Estimate” (MPNES) (Woomer et al., 1988).

#### **4.2.2 Isolamento dos rizóbios presentes nos nódulos**

Três nódulos de cada planta-isca foram utilizados para o isolamento de rizóbios. Estes nódulos foram primeiramente imersos em álcool etílico 95%, por 30 segundos, com o objetivo de quebrar a tensão superficial, sendo posteriormente imersos em  $H_2O_2$  por 1 minuto, para esterilizar a superfície do nódulo, e depois lavados seis vezes em água esterilizada para a retirada do  $H_2O_2$ . Os nódulos foram então esmagados com o auxílio de uma pinça devidamente esterilizada, em placas contendo meio de cultura 79 (Fred & Waksman 1928), com azul de bromotimol, sendo o material interno espalhado nas placas para a obtenção de colônias isoladas (Vincent, 1970).

### **4.2.3 Caracterização cultural dos isolados**

Após a obtenção de colônias isoladas e puras, os isolados foram então identificados e crescidos em placas contendo meio de cultura 79 (Fred & Waksman 1928), para futura caracterização cultural e armazenamento em “deep freezer”(-80° C).

Foram avaliadas as seguintes características culturais dos isolados: taxa de crescimento medido pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (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), diâmetro médio das colônias (< 1 mm, 1 a 2 mm e > 2 mm), modificação do pH do meio (acidificação, alcalinização e neutro), produção de goma (baixa, média e alta) e coloração das colônias (amarela e branca).

### **4.2.4 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Anexo B)**

As estirpes usadas como inoculante, os isolados nativos e estirpes tipo e referência de espécies conhecidas, após o crescimento em placa, foram então crescidos por dois cultivos sucessivos em meio TY sólido, nas mesmas condições de temperatura e luminosidade para todas as estirpes e os isolados utilizados, fazendo-se, posteriormente, a inoculação de colônias isoladas em 50 mL de meio de cultura líquido TY (Anexo A). O crescimento se deu com agitação constante de 120 rpm por 4 dias, à temperatura de 28°C. O meio de crescimento com as bactérias foi então centrifugado a 10.000 rpm, por 10 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao “pelet” formado foi adicionado o tampão NaPBS (Anexo A), que foi novamente centrifugado, repetindo-se esse processo três vezes até a total lavagem das células.

Foram pesados 70mg de células de cada isolado em tubo Eppendorf e, em seguida, adicionou-se 0,9 mL do tampão da amostra (TTA) (Anexo A) e 0,1 mL SDS 20%, para a solubilização das proteínas. Posteriormente, aqueceu-se a mistura em banho-maria a 95°C, por 10 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos, à temperatura de 4°C, para em seguida, serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pelo método Laemmli (1970), com modificações descritas por Jackmam (1985). Para a eletroforese utilizou-se um gel de sistema descontínuo, 12% para o gel separador e 5% para o gel de concentração (Anexo C). Foram aplicados ao gel 30µL de cada amostra.

Uma matriz binária dos dados originais foi construída, compreendendo 15 cadeias polipeptídicas (bandas) representativas dos perfis gerados.

Os grupos formados foram comparados com as estirpes tipo e referência e com as estirpes usadas como inoculante no ensaio de campo.

### **4.3 Análises estatísticas**

Os dados do ensaio de campo e do ensaio com vasos de Leonard 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 de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Os dados de caracterização cultural e perfil protéico total não foram submetidos à análise de variância, sendo as estirpes e os isolados obtidos agrupados utilizando-se o método UPGMA (“Average Linkage Clustering”), cujo princípio baseia-se na distância intergrupo, que é a média das distâncias pareadas dos membros dos dois grupos e representados por um dendograma de similaridade (NTSYS-pc, versão 2.01, Slice et al., 1994).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ensaio de campo

Os resultados médios das características avaliadas encontram-se nas Tabelas 3 e 4. Os tratamentos afetaram todas as características avaliadas, de forma significativa.

A inoculação com as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B promoveu maior nodulação das plantas. Estas estirpes ficaram em um grupo superior ao das demais estirpes, o qual incluiu a estirpe referência, BR 2001. A nodulação por rizóbios nativos não foi significativa, tendo em vista que Test s/N permaneceu no grupo inferior, juntamente com a Test c/N. Lacerda et al. (2004), estudando as mesmas estirpes, não encontraram diferenças significativas em relação a esta característica. As mesmas estirpes (UFLA 03-84 e INPA 03-11B) sobressaíram em relação à matéria seca de nódulos (MSN), cujos valores mostraram-se coerentes com os encontrados por Lacerda et al. (2004) e Martinazzo (1989).

Com relação à matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (E<sub>Fr</sub> %) e acúmulo de N na parte aérea, foi observado o mesmo comportamento das estirpes, tendo em vista a relação direta entre as características. A estirpe INPA 03-11B foi a que se destacou, permanecendo em um grupo isolado, superior aos demais tratamentos e semelhante à Test c/N.

O rendimento de grãos variou de 341 a 952 kg.ha<sup>-1</sup> e foi afetado negativamente pela ocorrência de chuvas por ocasião da colheita (Tabela 4). As estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B se destacaram das demais, promovendo rendimentos de grãos semelhantes à Test c/N, que recebeu uma adubação mineral de 70 kg.ha<sup>-1</sup> de N. Lacerda et al. (2004) também verificaram alta eficiência destas estirpes, porém, o rendimento de grãos foi superior aos encontrados no presente trabalho.

A estirpe referência para inoculação no caupi, BR 2001, mostrou-se ineficiente em relação à produção de grãos, situando-se no mesmo grupo da Test s/N. Este resultado e os de outros trabalhos (Martins et al., 1997; Pereira, 2000; Motta, 2002; Lacerda et al., 2004 e Lima, 2003) indicam a baixa eficiência da BR 2001 e melhor eficiência simbiótica de outras estirpes de rizóbio.

TABELA 3. Valores médios do número de nódulos por planta (NN), matéria seca de nódulos (MSN) ( $\text{mg.planta}^{-1}$ ) matéria seca da parte aérea (MSPA) ( $\text{g.planta}^{-1}$ ), eficiência relativa (Efr %), acúmulo de N na parte aérea ( $\text{mg.planta}^{-1}$ ), em função das fontes de nitrogênio sobre o caupi, cultivar BR 14-Mulato, no experimento de campo em Perdões, MG<sup>1</sup>

Fontes de N	NN	MSN	MSPA	Efr	Acúmulo de N PA
Test s/N	15,52 c	180,30 b	7,53 b	56,62 b	261,20 b
BR 2001	24,55 b	197,50 b	8,21 b	62,97 b	296,92 b
UFLA 03-36	25,67 b	202,37 b	8,36 b	61,58 b	296,67 b
UFLA 03-129	23,67 b	199,77 b	8,34 b	63,86 b	300,99 b
UFLA 03-84	31,17 a	226,57 a	8,97 b	72,98 b	353,06 b
INPA 03-11B	31,10 a	250,77 a	11,24 a	84,40 a	436,42 a
Test c/N	18,07 c	149,65 b	13,63 a	100,00 a	510,87 a
CV (%)	12,76	14,01	19,93	19,71	20,18

<sup>1</sup>Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

**TABELA 4. Valores médios de rendimento de grãos (kg.ha<sup>-1</sup>), teor de N nos grãos (%) e acúmulo de N nos grãos (kg,ha<sup>-1</sup>), em função das fontes de nitrogênio sobre o caupi, cultivar BR 14-Mulato, no experimento de campo em Perdões, MG<sup>1</sup>**

Fontes de N	Rendimento	Teor N grãos	Acúmulo N grãos
Test s/N	341,80 c	3,22 b	10,93 c
BR 2001	473,68 c	3,46 b	16,45 c
UFLA 03-36	703,63 b	3,45 b	24,49 b
UFLA 03-129	717,46 b	3,78 a	27,29 b
UFLA 03-84	949,13 a	3,79 a	36,07 a
INPA 03-11B	957,25 a	4,00 a	38,34 a
Test c/N	952,00 a	3,98 a	37,82 a
CV (%)	12,71	8,68	18,27

<sup>1</sup> Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

As estirpes UFLA 03-129, UFLA 03-84 e INPA 03-11B proporcionaram teores de nitrogênio nos grãos semelhantes ao teor encontrado na Test c/N. Já para o acúmulo de N nos grãos, as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B, que proporcionaram maior rendimento, foram também as que mais promoveram acúmulo de nitrogênio nos grãos.

## **5.2 Diversidade fenotípica de populações nativas que nodulam o caupi**

### **5.2.1 Densidade da população nativa**

Os dados de número e matéria seca de nódulos e matéria seca da parte aérea das plantas, obtidos no experimento em vasos de Leonard, encontram-se na Tabela 5.

Neste experimento, ficou evidenciado visualmente o baixo crescimento da plantas inoculadas com as suspensões de solo (Figura 1), indicando baixa eficiência das populações nativas.

Somente as plantas inoculadas com suspensão de solo até à diluição  $10^{-2}$  apresentaram nódulos, tendo a diluição  $10^{-1}$  diferido da diluição  $10^{-2}$  quanto a esta característica (Tabela 5). Não houve contaminação do experimento porque nenhuma das testemunhas apresentou nódulos em suas raízes. Com relação à matéria seca de nódulos, somente são apresentados resultados para a diluição  $10^{-1}$ , tendo em vista que os nódulos obtidos por inoculação da suspensão de solo da diluição  $10^{-2}$  foram utilizados para o isolamento dos rizóbios nativos.

As inoculações de suspensão de solo não promoveram aumento na matéria seca da parte aérea (MSPA) e somente a testemunha que recebeu nitrogênio mineral ( $210 \text{ mg.planta}^{-1}$ ) produziu maior MSPA.

TABELA 5. Valores médios do número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN) e matéria seca da parte aérea (MSPA) em função das diluições utilizadas e da ausência ou presença de nitrogênio mineral<sup>1</sup>

Tratamentos	NN	MSN ( $\text{mg.planta}^{-1}$ )	MSPA ( $\text{g.planta}^{-1}$ )
Diluição $10^{-1}$	18,33 a	0,03 a	0,82 b
Diluição $10^{-2}$	0,83 b	ND	0,75 b
Diluição $10^{-3}$	0 b	0 b	0,62 b
Diluição $10^{-4}$	0 b	0 b	0,57 b
Diluição $10^{-5}$	0 b	0 b	0,62 b
Diluição $10^{-6}$	0 b	0 b	0,43 b
Diluição $10^{-7}$	0 b	0 b	0,51 b
Test s/N	0 b	0 b	5,82 a
Test c/N	0 b	0 b	0,45 b
CV (%)	133,21	321,15	64,98

<sup>1</sup> Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

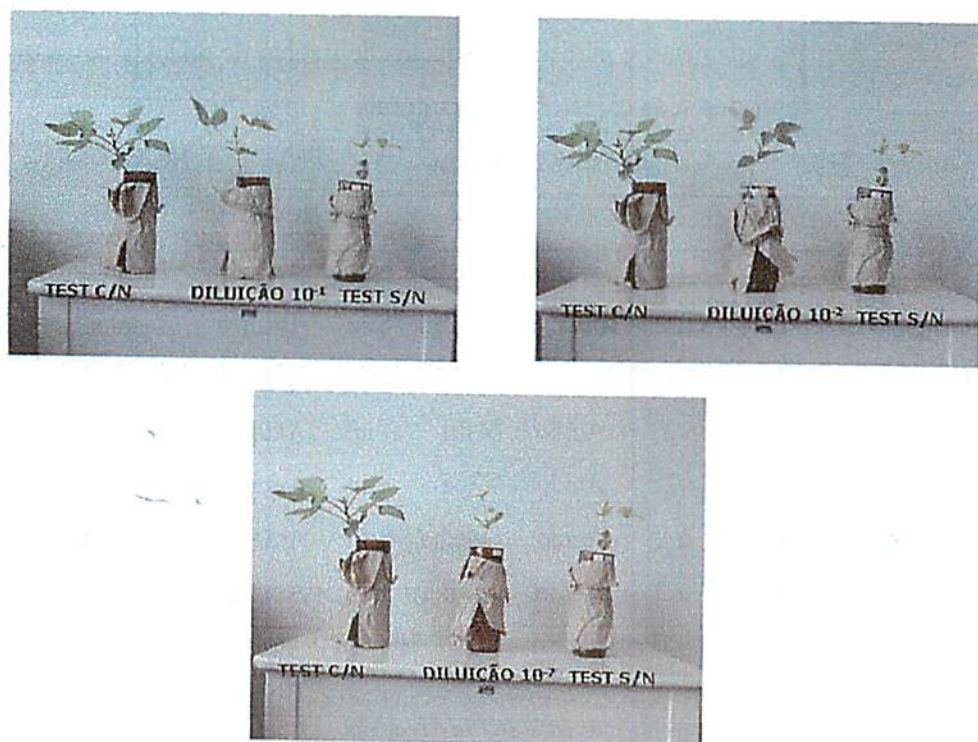


FIGURA 1. Vasos de Leonard do experimento de captura de rizóbios, no início do florescimento

A população nativa de rizóbio, calculada pelo método das diluições sucessivas, variou de 23 rizóbios por grama de solo (Amostra 2) a 38 rizóbios por grama de solo (Amostra 1). Estes valores são bem inferiores aos encontrados para a cultura do feijoeiro na mesma área, indicando que, apesar do caupi ser considerado mais promiscuo do que o feijoeiro (Melloni, 2001), este fato não foi observado no presente estudo.

### 5.2.2 Caracterização cultural

Os 15 isolados obtidos de nódulos das plantas de caupi foram agrupados com base em suas características culturais, conforme a Tabela 6 e representados em um dendograma de similaridade, conforme a Figura 2.

TABELA 6. Agrupamento e número de isolados de rizóbio de nódulos de caupi, conforme suas características culturais

Grupos	Características culturais						Nº de isolados
	1	2	3	4	5	6	
Grupo A	I	1 a 2	Alcalino	Média	Não	Amarela	1 isolado
Grupo B	I	1 a 2	Alcalino	Média	Sim	Branca	2 isolados
Grupo C	R	< 1	Alcalino	Média	Sim	Amarela	1 isolado
Grupo D	R	> 2	Ácido	Alta	Sim	Amarela	7 isolados
Grupo E	R	> 2	Ácido	Média	Sim	Amarela	2 isolados
Grupo F	R	1 a 2	Ácido	Média	Sim	Amarela	1 isolado
Grupo G	R	1 a 2	Ácido	Baixa	Sim	Amarela	1 isolado

Características culturais: 1 Taxa de crescimento, sendo MR muito rápida (1 dia para aparecimento de colônias isoladas), R rápido (2-3 dias), I intermediário (4-5 dias), L lento (6-10 dias), ML muito lento (> 10 dias), 2 Diâmetro da colônia, em mm, 3 pH do meio de cultura, 4 Produção de goma, 5 Absorção do indicador e 6 Cor da colônia.

A 80% de similaridade, 7 grupos foram formados com os isolados nativos da área em estudo (Figura 2).

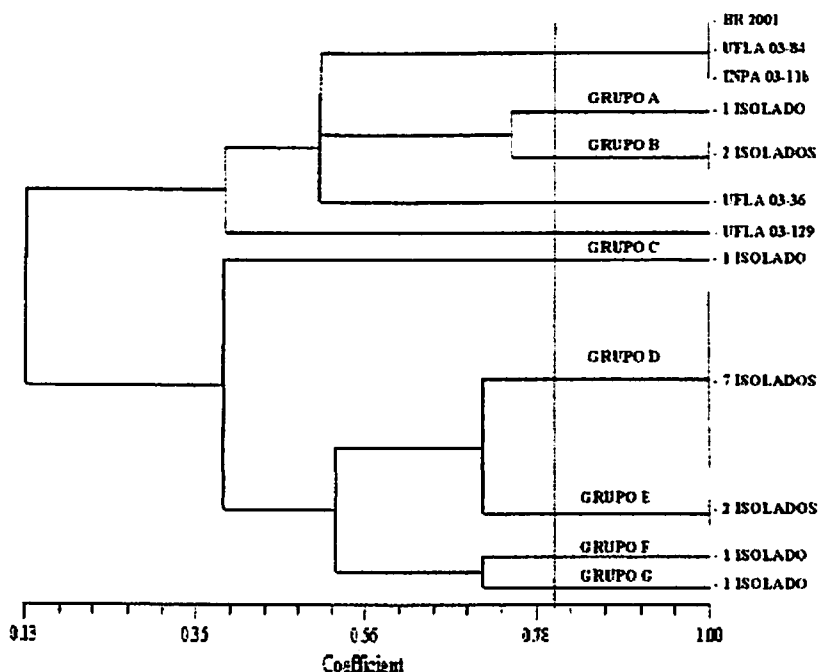


FIGURA 2. Dendrograma de similaridade construído de acordo com as características culturais dos isolados de feijoeiro e as estirpes referência BR 2001, UFLA 03-36, UFLA 03-84, UFLA 03-129 e INPA 03-11B

Os 15 isolados de caupi apresentaram o seguinte agrupamento: 1 isolado (7%) pertencente ao grupo morfológico A, 2 isolados (13%) pertencentes ao grupo morfológico B, 1 isolado (7%) pertencente ao grupo morfológico C, 7 isolados (46%) pertencentes ao grupo morfológico D, 2 isolados (13%) pertencentes ao grupo morfológico E, 1 isolado (7%) pertencente ao grupo morfológico F e 1 isolado (7%) pertencente ao grupo morfológico G. Com base em suas características culturais, as estirpes pré selecionadas e usadas no ensaio de campo não se agruparam com nenhum isolado nativo da área em estudo, a 80% de similaridade. Melloni (2001), utilizando o caupi como planta isca para captura de rizóbios nativos de área minerada de bauxita reabilitada, encontrou

número bem superior de isolados do que os encontrados neste trabalho (200 isolados em amostras de solo coletadas no inverno e 420 no verão) e a maioria apresentava características culturais semelhantes às de espécies de *Bradyrhizobium*, diferentemente dos encontrados no presente trabalho, em que a maioria dos isolados apresentou características culturais de espécies do gênero *Rhizobium*.

Dentre 41 isolados, Pereira (2000) encontrou 20 isolados pertencentes ao grupo formado pela estirpe tipo de referência de *Rhizobium tropici*.

### 5.2.3 Análise de proteínas totais por SDS-PAGE

Os isolados formaram cinco grupos com base no perfil eletroforético de proteína total. Os perfis eletroforéticos de proteína total dos isolados, das estirpes inoculadas, da estirpe referência e das estirpes tipo encontram-se na Figura 3, enquanto o dendograma de similaridade, obtido a partir dos perfis eletroforéticos, pode ser visualizado na Figura 4.

O grupo A foi formado por 9 isolados e a estirpe tipo BR 7411 de *Sinorhizobium meliloti*. Nenhuma outra estirpe referência, nem as estirpes tipo agruparam-se, a 80% de similaridade, com os demais isolados nativos da área em estudo. Melloni (2001) verificou que 22% dos isolados de nódulos de plantas de caupi eram pertencentes ao grupo formado com as estirpes tipo de espécies de *Sinorhizobium* e a grande maioria desses isolados (74%) era pertencente ao grupo formado com as estirpes tipo de *Bradyrhizobium*.

Pereira (2000) não encontrou nenhuma relação entre isolados de nódulos de plantas de caupi com espécies conhecidas de *Bradyrhizobium* e de *Rhizobium*, a 80% de similaridade, com base no perfil protéico total. Somente com similaridades inferiores é que foi encontrada alguma relação.

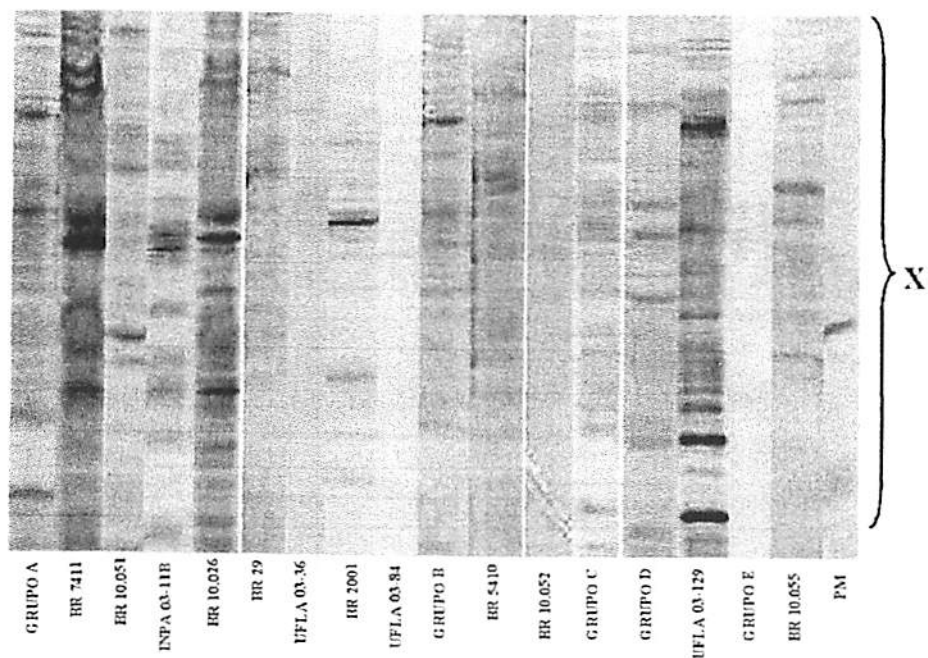


FIGURA 3. Perfis de proteína celular total de estirpes isoladas de caupi do solo da área em estudo, das estirpes referência e das estirpes tipo obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) X = área utilizada - 15 bandas; PM = padrão de peso molecular LMWM

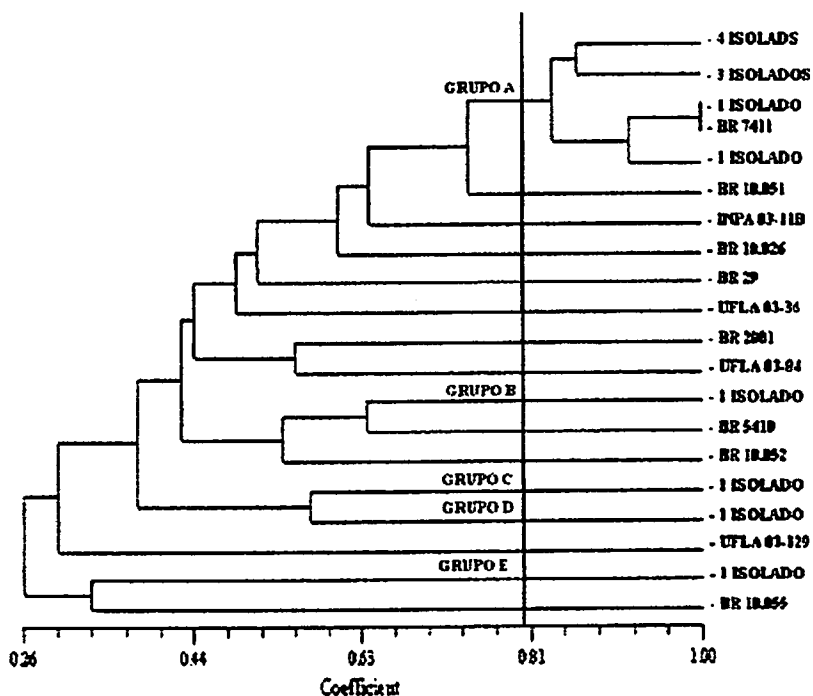


FIGURA 4. Dendograma de similaridade construído com o perfil protéico total dos isolados de caupi, das estirpes referência (BR 322, UFLA 02-68, UFLA 02-86, UFLA 02-100 e UFLA 02-127) e das estirpes tipo LMG 4285 (BR 10.051-*Rhizobium leguminosarum* bv *phaseolii*); CNF 42<sup>T</sup> (BR 10.026-*Rhizobium etli*); HAMBÍ 540<sup>T</sup> (BR 10.055-*Rhizobium galegae* bv *orientalis*); NZP 4027<sup>T</sup> (BR 7411-*Sinorhizobium meliotti*); NZP 2213<sup>T</sup> (BR 7801-*Mesorhizobium loti*); ORS 571<sup>T</sup> (BR 5410-*Azorhizobium caulinodans*) e BR 29-*Bradyrhizobium elkanii*

## 6 CONCLUSÕES

A inoculação com as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B contribuiu de forma significativa para o aumento no rendimento de grãos do caupi, sendo superior à inoculação com a estirpe referência BR 2001.

A população nativa apresenta alta diversidade fenotípica cultural e padrões protéicos.

Não houve relação entre os grupos fenotípicos de perfil protéico total e caracterização cultural celular.

Com base no perfil protéico total, a maioria dos isolados da população nativa foi classificada a 80% de similaridade, como *Sinorhizobium melilotii*.

As estirpes inoculadas são bastante distintas fenotipicamente de estirpes que compõem a população nativa.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C.: PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais. Viçosa: UFV, 1998 p. 13-18.
- CARDOSO, M. J.; FREIRE FILHO, F. R.; SOBRINHO, C. A. BR14 Mulato: Nova cultivar de feijão macassar para o estado do Piauí. EMBRAPA/UEPAI, 1990, p. 4. (EMBRAPA/UEPAI. Comunicado Técnico ; 48).
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: EMBRAPA, 2000. 412 p.
- 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.
- FRED, E.B. & WAKSMAN, S.A. Laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw-Hill Book Company, 1928. 143p.
- JACKMAN, P. J. H. Bacterial taxonomy based on eletrophoretic whole-cel protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (Ed.). Chemical methods in bacterial systematics. London: Academic Press, 1985. p. 119-129.
- LACERDA, A. M. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L. ) Walp. por estirpes selecionadas de rizóbio. 2002. 44 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. de L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. Revista Ceres, Viçosa, v. 51, n. 293, p. 67-82, jan./fev. 2004.
- 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

LIMA, A. S. **Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. Isoladas de solos da Amazônia sob diferentes sistemas de uso da terra.** 2003. 56 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARTINAZZO, A. F. **Potencial de fixação em N<sub>2</sub> em *Vigna unguiculata* Walp. em diferentes condições ambientais.** 1989. 154 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil.** *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 1005-1110, May/June 1997.

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, MG.

MOTTA, J. S. **Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. Isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas.** 2002. 43 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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

SLICE, D. E.; KIM, J.; WALKER, J. **NTSYS-Numerical taxonomy and multivariate analysis system: versão 1.80.** [S. l. :s. n. ], 1994.

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.

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



## ANEXOS

### ANEXO A

Meios de cultura, tampões e soluções de revelação

Meio de cultura TY		Observação
Tryptona	5g	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)
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		

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

#### A - Tampão do gel de separação B - Tampão gel de Empilhamento

Tris (1,5M)	18,15 g	Tris base (0,5M)	6,0 g
H <sub>2</sub> O	completar para 100 mL	H <sub>2</sub> O	completar para 100 mL
pH 8,8	Estocar a 4°C	pH	6,8 Estocar a 4°C

**Observação:**

A- Pesar o Tris e adicionar 50mL de água bidestilada + 24,2 mL de HCl 1,72 N. Elevar o pH para 8,8 e 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 de 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	9,6 mL	H <sub>2</sub> O bidestila	6 mL
Bis acrilamida	12,5 mL	Bis acrilamida	1,34 mL
Tris-HCl 1,5M pH:8,8	7,5 mL	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

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

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

Solução de monômeros	Observação
Acrilamida	29,2g
Bis-acrilamida	0,8g
H <sub>2</sub> O bidestilada	completar para 100 mL.
Filtrar e armazenar a 4° C.	
Imediatamente após dissolver os compostos em água (processos endotérmico) o volume é ajustado e a solução deverá sempre permanecer gelada.	

### ***Solução estoque de SDS (20%)***

20 g 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 a 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**

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

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

## **ANEXO B**

Protocolo para Análise de Proteína Total por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) de Bactérias Gram-Negativas (modificado do protocolo utilizado do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Gent).

### **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 10000 rpm por 10 min., a 4° C.
- 4) Descarte o sobrenadante
- 5) Lave as células por meio de ressuspensão do “pellet” em 30 mL de tampão NaPBS (apêndice) e nova centrifugação.
- 6) Descarte sobrenadante e repita a lavagem por mais duas vezes.
- 7) Pese, para cada isolado, as células em um Eppendorf limpo. O peso úmido das células deve ser de 70 mg.
- 8) Adicione 0,9 mL do tampão de tratamento da amostra (STB sem SDS) (apêndice, para volume de STB) e misture com misturador tipo Vórtex.
- 9) Adicione 0,1 mL 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 centrifuga 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 com ponta tipo agulha - 127 mm, 4mm diâmetro), durante 5 segundos, posição “low”, máximo de 50 W.

**PREPARAÇÃO 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 (bidestilada)</i>	<i>13.4 mL</i>
1.5M Tris-HCl, pH 8,8 (tampão do gel de separação)	10. mL
Bis-Acrilamida (solução de monômeros) (30% T; 2,67%C)	16 mL

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

3) Adicione o seguinte na mistura:

<i>SDS 10%</i>	<i>0,4 mL</i>
TEMED	20 µL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> 10% (APS)	0,14 mL

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

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% (pelo menos 1 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
0,5 M Tris HCl (pH 6.8) (tampão do gel empilhamento)	2,5mL
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:

*SDS* 10% 0.1mL

*TEMED* 10 µL

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 10% (APS) 0,05ml

(pH da solução de APS preparada fresca deveriam estar entre 5-6).

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 15µL (com tampão de tratamento de amostra contendo 0.001% azul de Bromofenol) (linha de corrida) (veja apêndice).

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 (correspondendo a aproximadamente 18 volts) e deixe correr a corrente constante até que a linha de corrida alcance um nível de aproximadamente 9,5 cm do topo de gel de separação (comprimento total de gel de separação: aproximadamente 12,6 cm; comprimento total de gel de separação + empilhando gel / (fundo de aberturas): aproximadamente 14 cm).
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.
8. Quanto 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 sanduiche. 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.

## ANEXO C

### *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*
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,035 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

---