

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

TESE

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO RIZÓBIO QUE NODULA O
FEIJOEIRO EM SOLOS TROPICAIS BRASILEIROS.**

ROSÂNGELA STRALIOTTO

1999

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO RIZÓBIO QUE NODULA O
FEIJOEIRO EM SOLOS TROPICAIS BRASILEIROS.**

ROSÂNGELA STRALIOTTO

Sob orientação da Prof. Dra.:
NORMA GOUVÊA RUMJANEK

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Philosophiae Doctor em
Agronomia. Área de concentração
em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Outubro de 1999

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO RIZÓBIO QUE NODULA O
FEIJOEIRO EM SOLOS TROPICAIS BRASILEIROS.**

AUTORA

ROSÂNGELA STRALIOTTO

APROVADA em 20 de outubro de 1999.

Prof. Dr. RICARDO L. L. BERBARA
(UFRRJ)

Prof. Dra. EDNA RIEMKE DE SOUZA
(UFRRJ)

Dr. MARCELO GRANDI TEIXEIRA
(Embrapa Agrobiologia)

Dr. JOSÉ IVO BALDANI
(Embrapa Agrobiologia)

Dra. NORMA GOUVÊA RUMJANEK
(Embrapa Agrobiologia)

Dedico este trabalho aos meus pais,
Paulino e Therezinha,
pelo grande amor que sempre me dedicaram
e pelo constante incentivo
aos meus estudos e trabalho,
e ao meu amado filho Vítor,
pelas muitas alegrias, confiança e incentivo.

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, pelas incontáveis bênçãos recebidas durante toda a minha vida.
- À Dra. Norma Gouvêa Rumjanek pela cooperação, incentivo, apoio e amizade durante a realização desta tese.
- Ao Dr. Avílio Antônio Franco pelos meus primeiros passos nos estudos de fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro.
- Ao Cláudio de Oliveira Cunha, pelas valiosas sugestões no planejamento e condução do trabalho e pela amizade.
- Aos Drs. Márcio Elias Ferreira e Dário Grattapaglia pela orientação e disponibilização da infraestrutura do Laboratório de Genética de Plantas da Embrapa Cenargen, Brasília, DF, para condução dos experimentos de análise genotípica dos isolados de rizóbio.
- Ao Fábio Martins Mercante, pela colaboração no trabalho, incentivo e amizade.
- Ao Dr. Marcelo Grandi Teixeira pelos instigantes questionamentos e discussões sobre os aspectos aplicados desta área de pesquisa.
- Aos colegas José Carlos Polidoro e Marcelo Gomes da Silva pelo auxílio nas análises estatísticas.
- Aos meus amigos pelo incentivo, confiança e apoio nos momentos mais difíceis desta jornada, pela alegria da convivência e do compartilhar;
- Aos funcionários da Casa de Vegetação da Embrapa Agrobiologia, Jorge Carlos, Naldo, Hélio, José Vicente (atualmente no Laboratório de Solos), em especial ao Cláudio Pereira Ferreira pelo auxílio na condução dos experimentos de choque térmico.
- Aos funcionários da Biblioteca, especialmente a Sra. Dorimar dos Santos Félix pelo auxílio na normalização bibliográfica, como também ao Sérgio e Motônio que apoiaram os demais trabalhos de consulta.
- A todos os demais funcionários da Embrapa Agrobiologia que, sem exceção, com muito boa vontade contribuíram para a realização deste trabalho.
- Aos professores da UFRRJ e também da UFRJ, onde cursei parte das disciplinas, que muito contribuíram para a minha formação profissional.
- À Embrapa Agrobiologia pela oportunidade de realização do curso.

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO GERAL.....	1
ABSTRACT.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	

2.1. A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CULTURA DO FEIJOEIRO COMUM (*PHASEOLUS VULGARIS* L.).

2.1.1. Introdução.....	6
2.1.2. Melhoramento genético do feijoeiro visando a fixação biológica de nitrogênio.....	8

2.2. BIODIVERSIDADE DO RIZÓBIO QUE NODULA O FEIJOEIRO E PRINCIPAIS FATORES QUE AFETAM A SIMBIOSE

2.2.1. Introdução.....	13
2.2.2. Evolução no conhecimento da biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro...	14
2.2.3. O efeito das temperaturas elevadas na simbiose feijoeiro-rizóbio.....	29

2.3. MÉTODOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES PARA O ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DO RIZÓBIO

2.3.1. Introdução.....	36
2.3.2. A abordagem polifásica e as aplicações da biologia molecular nos estudos de taxonomia e diversidade do rizóbio.....	37
2.3.3. Métodos fenotípicos.....	40
2.3.3.1. Métodos fenotípicos clássicos.....	40
2.3.3.2. Análise numérica de dados fenotípicos.....	41
2.3.3.3. Análise de isoenzimas.....	44
2.3.3.4. Métodos sorológicos.....	45

2.3.3.5.	Outros métodos quimiotaxonômicos.....	46
2.3.4.	Métodos genotípicos.....	48
2.3.4.1.	Estudos baseados no DNA ribossomal.....	48
2.3.4.2.	A reação da polimerase em cadeia.....	54
2.3.4.3.	Técnicas de “fingerprinting” do DNA baseadas em PCR.....	57

3. Capítulo I

DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIO QUE NODULAM O FEIJOEIRO RECUPERADOS DE SOLOS TROPICAIS BRASILEIROS.

3.1.	Introdução.....	65
3.2.	Material e Métodos:	
3.2.1.	Amostragem do solo.....	70
3.2.2.	Cultivo das plantas.....	72
3.2.3.	Isolamento do rizóbio.....	72
3.2.4.	Parâmetros morfofisiológicos analisados.....	73
3.2.5.	Análise numérica de dados fenotípicos.....	74
3.2.6.	Teste de infectividade.....	74
3.3.	Resultados e Discussão.....	76
3.4.	Conclusões.....	96

4. Capítulo II

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE RIZÓBIO QUE NODULA O FEIJOEIRO ATRAVÉS DA ANÁLISE DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO DNAr 16S AMPLIFICADO POR PCR (ARDRA).

4.1.	Introdução.....	98
4.2.	Material e Métodos:	
4.2.1.	Estirpes bacterianas utilizadas e condições de crescimento.....	101
4.2.2.	Extração do DNA bacteriano.....	101

4.2.3. Reação de amplificação do DNAr 16S.....	102
4.2.4. Digestão do DNA.....	103
4.2.5. Análise de agrupamento.....	103
4.3. Resultados e Discussão.....	104
4.4. Conclusões.....	119

5. Capítulo III

EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE A SIMBIOSE DO FEIJOEIRO NODULADO COM DIFERENTES ESPÉCIES DE RIZÓBIO PRESENTES EM SOLOS TROPICAIS.

5.1. Introdução.....	120
5.2. Material e Métodos:	
5.2.1. Estirpes de rizóbio e inoculação das sementes.....	124
5.2.2. Condições de crescimento das plantas e parâmetros avaliados.....	126
5.3. Resultados e Discussão.....	128
5.4. Conclusões.....	140
7. Referências Bibliográficas.....	141
6. Anexo.....	169

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Capítulo 1	
<u>Tabela 1</u> : Análise química da fertilidade dos solos das diferentes áreas de coleta.....	74
<u>Figura 1</u> : Porcentagem de isolados de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i>) ou leucena (<i>Leucaena leucocephala</i>) que apresentaram crescimento positivo ou negativo em meio YMA (Vincent, 1970) a 39°C.....	78
<u>Figura 2</u> : Porcentagem de isolados de <i>Leucaena leucocephala</i> apresentando crescimento positivo ou negativo em meio LB e tolerância <i>in vitro</i> a temperaturas elevadas avaliada pela capacidade de crescer ou não em meio YMA a 39°C.....	79
<u>Figura 3</u> : Porcentagem de isolados de <i>Phaseolus vulgaris</i> apresentando crescimento positivo ou negativo em meio LB e tolerância <i>in vitro</i> a temperaturas elevadas avaliada pela capacidade de crescer ou não em meio YMA a 39°C.....	80
<u>Figura 4</u> : Análise de agrupamento mostrando a distribuição de 137 isolados recuperados de leucena (<i>Leucaena leucocephala</i>) crescida a temperatura ambiente e de 125 isolados recuperados a temperaturas elevadas.....	81
<u>Figura 5</u> : Análise de agrupamento mostrando a distribuição de 124 isolados recuperados de feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i>) crescido a temperatura ambiente e de 219 isolados recuperados a temperaturas elevadas.....	83
<u>Tabela 2</u> : Teste de infectividade em feijoeiro dos isolados obtidos das plantas-iscas (feijoeiro e leucena) sob duas temperaturas de crescimento.....	84
<u>Figura 6</u> : Eficiência na fixação biológica de nitrogênio, em simbiose com o feijoeiro, dos isolados obtidos a partir de feijoeiro e leucena, em duas temperaturas de incubação das plantas, medida em valores relativos a estirpe BR855.....	86
Capítulo 2	
<u>Figura 1</u> : Reação de amplificação do DNA de estirpes padrão obtido pelo método da fervura.....	105
<u>Figura 2</u> : Reação de amplificação do DNA de estirpes padrão obtido através do método da fervura e da lise alcalina.....	106

<u>Figura 3:</u> Amplificação do DNA dos isolados de leucena e feijoeiro extraído pelo método da lise alcalina.....	107
<u>Figura 4:</u> Padrões de restrição do DNAr 16S, obtidos pela incubação com a enzima <i>Ddel</i>	108
<u>Figura 5:</u> Padrões de restrição do DNAr 16S, obtidos pela incubação com a enzima <i>HaeIII</i>	109
<u>Figura 6:</u> Dendrograma de agrupamento dos 83 isolados representativos dos grupos fenotípicos obtidos no Capítulo I.....	111
<u>Tabela 1:</u> Caracterização por ARDRA dos isolados representativos dos diferentes grupos fenotípicos obtidos pela análise de similaridade no Capítulo I.....	113
<u>Figura 7:</u> Distribuição dos isolados dentro das espécies definidas por ARDRA, de acordo com a planta-isca e temperatura de crescimento utilizada para recuperação do rizóbio do solo.....	114
<u>Tabela 2:</u> Eficiência dos isolados recuperados de leucena e feijoeiro nas duas temperaturas de crescimento das plantas, agrupados segundo a análise genotípica por ARDRA.....	117

Capítulo 3

<u>Tabela 1:</u> Estirpes de utilizadas no primeiro experimento e tolerância ao crescimento <i>in vitro</i> a 39°C.....	125
<u>Tabela 2:</u> Estirpes de utilizadas no segundo experimento e tolerância ao crescimento <i>in vitro</i> a 39°C.....	126
<u>Figura 1:</u> Produção de matéria seca dos nódulos de feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Experimento 1.....	130
<u>Figura 2:</u> Atividade de redução de acetileno de raízes noduladas de feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Experimento 1.....	130
<u>Figura 3:</u> Produção de matéria seca da parte aérea de feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Experimento 1.....	132
<u>Figura 4:</u> Produção de matéria seca dos nódulos de feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Experimento 2.....	135
<u>Figura 5:</u> Produção de matéria seca e nitrogênio total das vagens de feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Experimento 2.....	136
<u>Figura 6:</u> Produção de matéria seca e nitrogênio total da parte aérea de feijoeiro, cv. Carioca 80, inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Experimento 2.....	137

Anexo

Quadros de análise de variância referentes aos experimentos 1 e 2 do capítulo III.

1. Experimento 1:

Tabela 1: Análise de variância dos dados de matéria seca dos nódulos.....169

Tabela 2: Análise de variância dos dados de atividade de redução de acetileno.....169

Tabela 3: Análise de variância dos dados de matéria seca da parte aérea.....170

2. Experimento 2:

Tabela 4: Análise de variância dos dados de matéria seca dos nódulos.....170

Tabela 5: Análise de variância dos dados de matéria seca das vagens.....171

Tabela 6: Análise de variância dos dados de nitrogênio total das vagens.....171

Tabela 7: Análise de variância dos dados de matéria seca da parte aérea.....172

Tabela 8: Análise de variância dos dados de nitrogênio total da parte aérea.....172

1. RESUMO GERAL

O feijoeiro se constitui numa importante cultura de subsistência e principal fonte de proteínas na dieta de populações pobres, especialmente na América Latina e África. Sua associação com as bactérias do grupo dos rizóbios é uma importante alternativa para o fornecimento de nitrogênio à planta, perfeitamente adaptado ao sistema produtivo de subsistência, predominante nesta cultura. No entanto, a tecnologia de inoculação com o rizóbio, em feijoeiro, continua com baixo índice de adoção junto aos agricultores, devido, principalmente, a inconsistência dos resultados obtidos em condições de campo. Recentemente percebeu-se que as estirpes de rizóbio que vinham tradicionalmente sendo recomendadas como inoculante para o feijoeiro eram inadequadas às condições tropicais. A tolerância a temperaturas elevadas tem sido um dos fatores levantados como limitantes a fixação biológica de nitrogênio nesta simbiose, afetando tanto a planta hospedeira quanto a bactéria. Os estudos da diversidade e taxonomia bacteriana, especialmente aplicados aos simbioses do feijoeiro apresentaram uma grande evolução nos últimos anos, especialmente devidos às novas metodologias moleculares de avaliação e caracterização. Novas espécies de rizóbio foram descritas e caracterizadas como resultado de diversos levantamentos. Atualmente, o rizóbio que nodula o feijoeiro pertence às espécies: *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. tropici*, *R. etli*, *R. gallicum* e *R. giardinii*.

Neste estudo, foi feito um levantamento da diversidade do rizóbio presente em solos com longo histórico de cultivo do feijoeiro, dos Estados da Bahia e Espírito Santo. O rizóbio foi recuperado do solo utilizando o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e a leucena (*Leucaena leucocephala*) como plantas-isca, uma vez que esta é eficiente na recuperação

de estirpes de *R. tropici*, consideradas mais adaptadas às condições tropicais. O rizóbio foi recuperado do solo sob duas temperaturas de crescimento das plantas-isca: temperatura ambiente e temperatura elevada (38°C durante 5 horas por dia). O tratamento de temperatura elevada visou exercer uma pressão de seleção para recuperação de rizóbio tolerante a este estresse. Os isolados recuperados dos nódulos foram avaliados quanto a infectividade, crescimento em meio LB, em meio YMA a temperatura de 39°C, e em diferentes fontes de carbono (xilose, sacarose, celobiose, frutose, lactato de sódio, glicerol e lactose). As características fenotípicas avaliadas nos testes de utilização de carboidratos foram analisadas por taxonomia numérica obtendo-se o agrupamento dos isolados em relação à estirpes padrão de rizóbio pertencentes a diferentes gêneros e espécies. Isolados representativos de cada agrupamento fenotípico obtido nesta análise preliminar de diversidade foram analisados genotipicamente por ARDRA (Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado por PCR). Na última etapa do trabalho, isolados eficientes pertencentes a cada um dos grupos de rizóbio representativos identificados na população em estudo, foram avaliados quanto à tolerância a um período de choque térmico aplicado durante três dias às raízes noduladas de feijoeiro cv. Carioca 80.

Foram identificados, nesta população, três grupos distintos de rizóbio nodulando o feijoeiro, a saber: *R. tropici* IIA, *Sinorhizobium* sp. e estirpes do tipo I (*R. leguminosarum* bv. phaseoli/*R. etli*). Dentro da população recuperada de leucena, houve predomínio dos isolados de *R. tropici* IIA, quando a planta foi crescida a temperatura ambiente, e de *Sinorhizobium* sp., quando a planta foi crescida a temperatura elevada. Isolados de *Sinorhizobium* sp. somente foram recuperados de feijoeiro quando a planta foi crescida a temperatura elevada, sugerindo uma maior tolerância desta espécie ao estresse térmico, pelo menos no processo de infecção das raízes. Houve predomínio das estirpes do tipo I dentro da população recuperada de feijoeiro, nas duas temperaturas de crescimento das plantas. Em condições de temperatura elevada foram recuperados isolados de *Sinorhizobium* sp e de *R. tropici* IIA. Estas duas espécies não foram encontradas na população de feijoeiro crescido a temperatura ambiente. Cerca de 89% dos isolados de *R. tropici* e 75% dos isolados de *Sinorhizobium* sp foram considerados eficientes a muito eficientes, em simbiose com o feijoeiro, em comparação com a estirpe BR855. Por outro lado, dentre os isolados do tipo I, predominantes nos grupo de isolados de nódulos de feijoeiro crescido a temperatura ambiente, apenas 38% foram enquadrados nos grupos de

maior eficiência. Foi grande a perda de infectividade dentro dos grupo de estirpes do tipo I, atingindo 18% dos isolados.

Na etapa final do trabalho, foi avaliada a tolerância ao choque térmico dentro de cada um dos agrupamentos genotípicos. Isolados pertencentes aos principais agrupamentos mostraram tolerância a este estresse. Houve diferenças entre as estirpes para os parâmetros de nodulação, atividade da nitrogenase, acúmulo de matéria seca da parte aérea e produção de vagens. Não houve correlação entre o crescimento *in vitro* a temperaturas elevadas e a tolerância ao choque térmico, bem como entre a temperatura de crescimento da planta-isca de onde o isolado foi obtido e a maior eficiência sob este estresse.

ABSTRACT

Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are an essential part of the daily food of the population in Latin America because of their importance as a source of proteins. The use of biological nitrogen fixation in this culture, however, is not always profitable, and the rhizobia-common beans symbiosis has been considered inefficient due to many biotic and abiotic factors, such as low efficiency and sensitivity to high temperature and soil acidity of indigenous rhizobia. This study aimed to evaluate the rhizobial phenotypic and genotypic diversity in tropical soils under traditional bean cultivation and submitted to very hot temperature during the summer, from the States of Bahia and Espírito Santo. Isolates were recovered using common beans and leucaena (*Leucaena leucocephala*) as trap hosts under low (maximum of 28°C) and high temperature regimes (38°C 5h/day). Leucaena is a high temperature tolerant plant in symbiosis and nodulates with a group of rhizobial species that also nodulates common bean.

Morphophysiological characterization of the 605 isolates obtained was performed based on the utilization of 8 different carbon source and the data was analysed through numerical cluster analysis. Growth on yeast mannitol agar (YMA) medium at 39°C and on Luria broth (LB) medium was correlated for isolates from both trap hosts and most of the leucaena isolates were able to grow at 39°C. High temperatures influenced the diversity of isolates recovered using both trap hosts, which were phenotypically more diverse at 38°C

than at ambient temperature. Common beans isolates were significantly more diverse at both temperatures of recovery compared to the isolates obtained from leucaena.

Representative isolates from each phenotypic group obtained through the cluster analysis were genotypically analysed by ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) using 8 different restriction enzymes. Three main different rhizobial groups were identified among the bean population: *Rhizobium tropici* IIA, *Sinorhizobium* sp and Type I strains (*R. leguminosarum*/*R. etli* group). Among leucaena isolates recovered under low temperature regime *R. tropici* IIA predominates, but at high temperature of plant growth *Sinorhizobium* sp. isolates occupied the majority of the nodules. *Sinorhizobium* sp isolates were recovered from beans only under high temperature of plant growth, which suggests a higher temperature tolerance of this group of isolates, at least at the infection process level. Among the bean population, Type I strains predominates at both temperature of plant growth, but at high temperature, besides *Sinorhizobium* sp isolates, strains of *R. tropici* IIA were also recovered. These two species were not recovered from beans under low plant growth temperature. There was some correlation between the phenotypic and genotypic cluster analysis, but *Sinorhizobium* sp. isolates were phenotypically difficult to distinguish from Type I strains.

The symbiotic efficiency of these groups of isolates was evaluated on beans grown at ambient temperature. The majority of *R. tropici* IIA strains (89%) and *Sinorhizobium* sp (75%) strains were considered very efficient when compared to an efficient reference strain of *R. tropici* IIB. Among Type I strains, only 38% of the isolates belonged to the more efficient groups, and many of these isolates (18%) showed loss of infectivity after long periods of storage.

At last, the most efficient isolates belonging to the main groups of each population (bean and leucaena grown at low and high temperature regimes) were evaluated for the tolerance to a heat stress in symbiosis with beans, at flowering stage. Isolates showed differences on nodulation parameters, nitrogenase activity, shoot dry matter and shoot nitrogen accumulation after the heat shock treatment (three days at 38°C 5h/day). Some isolates were more efficient in nitrogen translocation to the pods after the heat stress. There was no relation between the tolerance to this stress condition and the ability of the different groups of rhizobia to grow at high temperature *in vitro*, as well as between the temperature of the trap-host growth from which the isolate was recovered and efficiency under heat shock treatment.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1. A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CULTURA DO FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.).

2.1.1 Introdução:

O feijoeiro se constitui numa importante cultura de subsistência e na principal fonte de proteínas presente na dieta humana de populações pobres, especialmente na América Latina e alguns países africanos (CIAT, 1990). O feijão possui de 20 a 25% de proteínas ricas em lisina e treonina, exercendo assim, um efeito complementar aos cereais que também compõem esta dieta, mas que são deficientes nesses aminoácidos (Evans & Bandemer, 1967). No Brasil, segundo maior produtor mundial, o feijoeiro é cultivado em vastas áreas, porém com níveis médios de produtividade considerados baixos, na ordem de 732 kg/ha (IBGE, 1995). Grande parte da produção brasileira de feijão provém de pequenas e médias propriedades, onde o nível de utilização de tecnologias é baixo e, como consequência, ocorre um fornecimento inadequado de nutrientes, especialmente de nitrogênio e de fósforo.

Extensas áreas irrigadas com elevado uso de insumos têm-se destacado nos cerrados (Goiás e Minas Gerais) e nos Estados da Bahia (região de Barreiras, Santa Maria e Bom Jesus da Lapa) e Espírito Santo (Yokoyama et al., 1996). Estas regiões

apresentam produtividades médias bem mais elevadas, na ordem de 1.225 kg/ha, nos chamados plantios da terceira safra ou de “inverno”, embora representem apenas 11% da produção nacional total, segundo dados compilados por Yokoyama et al. (1996). Apesar de pequena, esta produção é extremamente importante como estoque regulador de preços, no período de entressafra das regiões de cultivo tradicional, e ainda supre o mercado com grãos de boa qualidade ao longo do ano.

Historicamente, entretanto, a maior parte da produção é oriunda de cultivos em pequena escala, predominantemente de minifúndios. Propriedades, com áreas de até 100ha, respondiam até 1985, por 79% da produção nacional (Censo Agropecuário, 1985) com uma produtividade média entre 352 e 394 kg/ha. Produtividades médias maiores, chegando a 734 kg/ha, são alcançadas apenas nas maiores propriedades, com 10.000 ha ou mais. Analisando-se a evolução da cultura do feijão no Brasil, percebe-se que a pesquisa tem produzido resultados e tecnologias suficientes para garantir produtividades de até 2,0 a 3,0 t/ha, através de tecnologias direcionadas aos grandes produtores que envolvem grande investimento de capital. A geração de tecnologias adaptadas aos pequenos produtores é uma necessidade premente, tendo em vista o potencial produtivo da cultura e os baixos níveis de produtividade obtidos nas pequenas propriedades.

Assim como no Brasil, nos demais países onde é cultivado, o feijoeiro é parte integrante do sistema agrícola de subsistência, ocupando uma grande variedade de tipos de solo. Enquanto alguns agricultores escolhem suas melhores áreas ou regiões de baixada, que ainda dispõem de matéria orgânica em níveis razoáveis para o sustento da cultura, os dados levantados pelo CIAT (1990) mostram que 40% das áreas na América Latina e 60% na África são deficientes em nitrogênio. Considerando-se o custo dos fertilizantes nitrogenados, os fatores determinantes de perdas por volatilização e lixiviação e a conseqüente poluição das águas, os estudos visando a inoculação com o rizóbio

constituem uma alternativa para o fornecimento do nitrogênio necessário à cultura, perfeitamente adequado ao principal sistema produtivo destes países. Produtividades em torno de 1.500 a 2000kg/ha são possíveis de serem atingidas com a inoculação, utilização de cultivares adequadas e condições ambientais favoráveis. Este nível de produtividade encontra-se ainda bem abaixo do potencial desta leguminosa, mas acima da produtividade média atingida por estes produtores. As novas linhas de pesquisa tem sido desenvolvidas mais recentemente tem resultado num maior conhecimento desta simbiose e as novas abordagens do problema têm buscado melhorar o aproveitamento desta interação visando aumentar, não só a produtividade da cultura sob condições simbióticas mas também sua adequação ao clima tropical.

2.1.2. Melhoramento genético do feijoeiro visando a fixação biológica de nitrogênio:

Dentre as leguminosas mais comumente utilizadas na agricultura, o feijoeiro é tido como uma das mais ineficientes na capacidade de fixação de nitrogênio. Este conceito geral provém da análise dos vários resultados experimentais obtidos por diferentes grupos de pesquisa na América Latina e em outras partes do mundo. Há, no entanto, uma grande variabilidade na capacidade de nodulação e eficiência na fixação biológica de nitrogênio entre os cultivares de feijoeiro (Graham & Rosas, 1977; Andriolo, 1990; Kipe-Nolt et al., 1993; Tsai et al., 1993 e Franco, 1993). Em condições de campo, Hardarson et al. (1993) compilaram dados de diversos experimentos utilizando a técnica de diluição isotópica, conduzidos coordenadamente em diferentes países da América do Sul, tendo verificado que há grandes diferenças na capacidade de fixação de nitrogênio entre as cutivares, com valores médios variando entre 35 a 70% de nitrogênio derivado do ar. Os valores mais elevados foram observados somente em locais que apresentaram condições ambientais

mais favoráveis. Bliss (1985) aponta diferenças significativas entre acessos de feijoeiro, mostrando que a variabilidade para este parâmetro está presente no germoplasma. No entanto, os ganhos foram bastante limitados nos cruzamentos envolvendo as linhagens mais eficientes quanto à capacidade de fixação de nitrogênio.

Vários parâmetros têm sido utilizados como indicadores da fixação biológica de nitrogênio, os quais são considerados como uma integração de diversas características quantitativas cuja herdabilidade varia de baixa a moderadamente alta (Pereira et al., 1993; Nodari, 1993b). As principais características utilizadas para a seleção dos genótipos com maior eficiência simbiótica são o número de nódulos por planta e outras características associadas, tais como a nodulação precoce e aumento na matéria seca ou tamanho dos nódulos (Herridge & Danso, 1995).

A infecção com o rizóbio tem alguma similaridade com a infecção por alguns patógenos (Sharifi, 1984), sendo que, neste caso, a seleção para maior resistência aos microrganismos patogênicos é o procedimento utilizado nos programas de melhoramento. No caso do rizóbio, a seleção para maior susceptibilidade à infecção pode resultar em uma simbiose mais eficiente, dado que a planta seja capaz de sustentar esta maior nodulação, aliada a condições ambientais favoráveis à simbiose. A busca por genótipos com características de supernodulação, através de mutações genéticas, é uma tentativa de se obter aumentos no número e massa nodular em feijoeiro (Park & Buttery, 1989). Entretanto, estas plantas mutantes nem sempre apresentam maior acúmulo de nitrogênio pela fixação biológica devido a efeitos deletérios associados a esta mutação.

A seleção de genótipos bem adaptados mas com maior capacidade de nodulação apresenta-se como uma alternativa viável (Pereira et al., 1993). Neste caso, há a dificuldade de avaliação da nodulação a nível de campo, tendo sido testado, por Pereira et al. (1993), um método de avaliação precoce, não destrutivo, no qual as plantas são

crecidas em vasos de Leonard, sob condições de casa de vegetação. No entanto Herridge & Danso (1995), numa compilação dos principais resultados obtidos pelos mais importantes programas de melhoramento a nível mundial, visando a fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro, concluem que, quando a nodulação é usada como principal critério de seleção, o progresso é limitado. Sugerem que os parâmetros mais adequados sejam a fixação de nitrogênio, medida através do acúmulo de nitrogênio total na planta ou na semente, sob condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. Neste caso, tanto os dados de nodulação, como número e peso de nódulos, servem apenas para confirmar a ocorrência da nodulação.

Um dos programas de melhoramento visando a fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro que apresenta bons resultados foi conduzido por Bliss e colaboradores, na Universidade de Wisconsin. Neste trabalho, foram utilizados vários métodos para avaliação da fixação de nitrogênio, incluindo: nitrogênio total da planta e sementes, produção, métodos baseados em ^{15}N , redução de acetileno e índices de nodulação (Attewell & Bliss, 1985; Bliss et al., 1989; Pereira et al., 1989; St Clair et al., 1988.).

Bliss (1993) sugere que os programas de melhoramento levem em consideração a capacidade dos genótipos em nodular e fixar nitrogênio na presença de nitrato no solo. Segundo este autor, a tolerância ao nitrato deve ser prioritária devido à alta sensibilidade da simbiose feijoeiro-rizóbio ao efeito supressivo do nitrato presente no solo (Henson & Bliss, 1991; George & Singleton, 1992).

Outro programa importante de melhoramento, visando a fixação biológica de nitrogênio, tem sido desenvolvido no CIAT, no qual os parâmetros de avaliação utilizados foram, novamente: a redução de acetileno, nodulação, produtividade e outros caracteres agronômicos (Graham, 1981; Kipe-Nolt & Giller, 1993, Kipe-Nolt et al., 1993).

A sensibilidade desta simbiose a diversos fatores ambientais, como os níveis de fertilidade do solo e temperaturas elevadas, aspectos fisiológicos da hospedeira e outros ligados ao microsimbionte, tem limitado o desempenho, sob condições de campo, das cultivares superiores provenientes destes programas de melhoramento (Hungria et al., 1997).

Atualmente, apesar de muitos avanços, a falta de conhecimento sobre parâmetros geneticamente bem definidos para a seleção de combinações planta/bactéria, com alta efetividade para a fixação de nitrogênio, requer a demorada seleção de combinações mais eficientes de ambos os parceiros, inicialmente sob condições controladas em casas de vegetação para, posteriormente, ser feito o teste em campo. No entanto, embora laboriosa, este tipo de experimentação é básica e particularmente importante no caso do feijoeiro devido a grande diversidade genética de seus simbioses e a grande variabilidade existente quanto a sua efetividade simbiótica (Pacovsky et al., 1984; Rennie & Kemp, 1983a e b).

Como há, pelo menos, 9 pools gênicos de *P. vulgaris* e vários grupos diferentes de rizóbio nodulando o feijoeiro nas condições tropicais, podem ser encontradas marcantes interações entre estes grupos. Esta possibilidade começa a ser estudada em alguns experimentos exploratórios (Franco, 1993; Andriolo et al., 1994).

Grupos contrastantes de rizóbio foram testados em simbiose com feijoeiros silvestres e domesticados, de diferentes origens, observando-se que, de modo geral, não há preferência na nodulação (Kipe-Nolt et al., 1992). No entanto, há uma tendência dos materiais de origem mesoamericana em formar nódulos mais rapidamente com a estirpe de *R. etli* CIAT 632, do que com a de *R. tropici* CIAT 899, sendo que um efeito oposto foi observado para os materiais de origem andina. Nestes experimentos foram identificados

alguns genótipos selvagens que restringem a nodulação pela estirpe CIAT 899 de *R. tropici* (Kipe-Nolt et al., 1992).

Como o potencial de utilização desta característica depende da extensão da capacidade de restrição contra diferentes estirpes de rizóbio, foram realizados estudos mais detalhados visando avaliar este efeito contra 9 isolados de *R. tropici* e 15 de *R. etli*, tendo-se analisado, também, a possibilidade desta restrição ser suplantada pela presença de estirpes eficientes (Montealegre & Kipe-Nolt, 1994). Os resultados mostraram que oito dentre as nove estirpes de *R. tropici*, assim como seis dentre as quinze de *R. etli*, foram restringidas na capacidade de nodulação pelos acessos selvagens testados (G21117 e G10002). Estas estirpes apresentaram nodulação normal em cultivares comerciais de feijoeiro. A presença de estirpes efetivas não foi capaz de inibir o efeito de restrição destas cultivares sobre as inefetivas, e estas não afetaram a capacidade noduladora das estirpes efetivas. A herança dos genes que controlam a capacidade de restrição precisa ser determinada, pois irá afetar a facilidade com que estes possam ser incorporados em cultivares comerciais.

O sucesso desta abordagem, sob condições de campo depende do conhecimento da população de rizóbio predominante nas diferentes regiões onde se pretenda tirar proveito da capacidade de restrição e do efeito das condições ambientais sobre a nodulação dos diferentes grupos de rizóbio.

2.2. BIODIVERSIDADE DO RIZÓBIO QUE NODULA O FEIJOEIRO E O EFEITO DAS TEMPERATURAS ELEVADAS NA SIMBIOSE.

2.2.1. Introdução:

A pesquisa sobre a simbiose do feijoeiro teve bastante progresso nos últimos anos, especialmente quanto ao conhecimento do microsimbionte e quanto ao estudo de novas abordagens buscando maior variabilidade no macrosimbionte para esta característica (Andriolo et al., 1994; Franco, 1998; Nodari et al., 1993). No entanto, a tecnologia de inoculação com o rizóbio nesta cultura continua com baixo índice de adoção junto aos agricultores, fato confirmado pelos dados de comercialização fornecidos pelas firmas produtoras de inoculante. Estes dados mostram que a venda de inoculante, para o feijoeiro no Brasil, representa menos de 1% do que é produzido para a soja (Solon Araújo, comunicação pessoal).

Recentemente detectou-se a inadequação às condições tropicais das estirpes de rizóbio que vinham tradicionalmente sendo recomendadas para a produção de inoculante. A partir desta constatação, novas espécies de rizóbio, capazes de nodular esta planta, foram identificadas e caracterizadas após diversos levantamentos. Os estudos da diversidade e taxonomia bacteriana, especialmente aplicados aos simbiossantes do feijoeiro,

apresentaram uma grande evolução nos últimos anos, devido a aplicação das novas metodologias moleculares de avaliação e caracterização de estirpes bacterianas.

A combinação favorável dos vários fatores bióticos e abióticos, presentes no ecossistema em estudo, vai determinar o sucesso da inoculação, sendo que é preciso partir do conhecimento das características do microrganismo a ser introduzido, sua adaptabilidade e capacidade competitiva. Precisam ser estudados os fatores que afetam esta simbiose, levando-se em consideração a diversidade genotípica do rizóbio presente nas diferentes regiões produtoras.

Será discutida, a seguir, a evolução nos estudos da diversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro, com ênfase nos recentes estudos taxonômicos que identificaram novos simbiontes, sua caracterização e abrangência geográfica. Serão também destacados os principais fatores bióticos e abióticos que afetam os diferentes grupos de rizóbio que nodulam o feijoeiro e a sua eficiência simbiótica.

2.2.2. Evolução no conhecimento da biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro:

Inicialmente, a classificação taxonômica do rizóbio foi baseada em sua especificidade hospedeira, a qual, embora ambígua, tinha um aspecto prático pela sua utilidade para os usuários e fabricantes de inoculantes. Baseado essencialmente nesta especificidade, as bactérias que nodulam o feijoeiro foram classificadas como pertencentes à espécie *R. phaseoli* (Fred et al., 1932). A classificação posterior, proposta por Jordan (1984), levando em consideração o relacionamento entre certas características fisiológicas, e ainda, a especificidade hospedeira, dividiu o gênero *Rhizobium* em três espécies, englobando as bactérias de crescimento rápido em meio de cultura específico, *R. meliloti*, *R. loti* e *R. leguminosarum*. A espécie *R. leguminosarum* foi, então, dividida em

três biovares, definidos com base na planta hospedeira que nodulam: *R. leguminosarum* bv. *viciae* que nodula ervilha (*Pisum sativum*), ervilhaca (*Vicia sativa*) e a fava (*V. fava*); *R. leguminosarum* bv. *trifoli* que nodula os trevos (*Trifolium* spp.) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, que nodula o feijoeiro.

As bases para esta classificação em biovares foram: (1) os simbiossomas de ervilha, trevo e feijoeiro não podiam ser distinguidos facilmente com base em características fenotípicas (Graham, 1964); (2) sob condições de laboratório, podia ser obtida facilmente a recombinação dos genes cromossomais, através da conjugação, entre estirpes de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Kondorosi et al., 1980); (3) os determinantes genéticos de círculo de hospedeiras e outras funções simbióticas são em grande parte, quando não totalmente, codificados por plasmídeos, os quais permanecem funcionais quando transferidos entre estirpes isoladas de ervilha, trevo e feijoeiro (Lamb et al., 1982); e (4) em média, há um maior nível de similaridade, nas seqüências de nucleotídeos do DNA total, entre estirpes pertencentes aos três biovares de *R. leguminosarum* do que entre estes biovares e outras espécies como *R. meliloti* ou *R. loti* (Crow et al., 1981).

De acordo com esta classificação, todas as estirpes de rizóbio isoladas do feijoeiro passaram a ser, indistintamente, considerados como pertencentes à espécie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. No entanto, este novo arranjo taxonômico não foi totalmente aceito, havendo muitas evidências contrárias. Uma delas é a reconhecida diversidade genética dos simbiossomas de *P. vulgaris*, a qual é bem maior do que a presente nos demais biovares (Graham & Parker, 1964; Jarvis et al., 1980; Jordan, 1984). Inicialmente, os estudos de hibridização de DNA demonstraram que havia uma marcante heterogeneidade na seqüência de nucleotídeos cromossomais entre estirpes de cada um dos biovares de *R. leguminosarum* (Crow et al., 1981) e, dados de análise por eletroforese bidimensional

de proteínas celulares totais não permitiram diferenciar os isolados de *R. leguminosarum* bv. *viciae* e *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, mas mostraram que os isolados de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* eram bem distintos e bastante diversos geneticamente (Roberts et al., 1980). Finalmente foi demonstrado que estirpes de rizóbio, pertencentes aos diversos grupos de homologia de DNA são capazes de nodular o feijoeiro (Crow et al., 1981). De fato, conforme observações anteriores, diversas estirpes de *Rhizobium* spp., obtidos de de nódulos diferentes gêneros e espécies de leguminosas selvagens, são capazes de nodular o feijoeiro (Graham & Parker, 1964).

Todos estes primeiros estudos referentes à taxonomia deste grupo de estirpes, foram baseados em isolados de rizóbio que nodulam o feijoeiro que têm ocorrência natural em solos de países de clima temperado, resultando de comparações feitas com o rizóbio isolado de plantas originárias destas regiões, como a ervilha e o trevo. Por outro lado, sabe-se que o feijoeiro é originário das regiões andinas e mexicanas e, provavelmente, os isolados objeto destes estudos iniciais foram introduzidos nestes países de clima temperado, juntamente com as sementes levadas após o período de colonização das Américas. A partir de 1985, foi publicada uma série de estudos sobre os simbiontes de feijoeiro isolados nas Américas, incluindo os provenientes das regiões brasileiras de cerrado, liderados pelo grupo de pesquisa da Universidade Autônoma do México (UNAM), com a colaboração da Embrapa Agrobiologia (CNPAB).

Em 1988, um extensivo estudo sobre a diversidade dos isolados que nodulam o feijoeiro coletados no México e América do Sul, até então classificados como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, revelou a existência de um complexo de estirpes bastante heterogêneo e composto de diferentes linhagens filogeneticamente bem diferenciadas (Piñero et al., 1988). Esta diversidade contrastou com o fraco polimorfismo detectado entre os isolados que nodulam o feijoeiro coletados nos campos da Inglaterra (Young,

1985). Utilizando dados de análise por eletroforese de isoenzimas (MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis), foram observadas as variações alélicas em 15 locus enzimáticos de 51 isolados de *R. leguminosarum* bv. phaseoli obtidos de várias regiões geográficas, principalmente do México (Piñero et al., 1988). Os resultados destas análises mostraram que as estirpes deste biovar eram muito heterogêneas em seus genes estruturais cromossomais e que havia um nível de diversidade e divergência genotípica muito maior do que os até então descritos para qualquer espécie de bactéria, inclusive *E.coli*. Foram detectados 46 tipos eletroforéticos (ET's), com base nos perfis alélicos dos locus enzimáticos analisados, sendo que a diversidade genotípica média por locus enzimático entre estes ET's foi de 0,691. A grande diversidade no genoma cromossomal detectada neste estudo levantou a possibilidade de que *R. leguminosarum* bv. phaseoli consistisse, na verdade, de uma mistura polifilética de estirpes e não numa unidade monofilética. Como outros autores já haviam sugerido, ficou claro que a inclusão de todas as estirpes que nodulam o feijoeiro numa única espécie ou biovar era geneticamente irreal e taxonomicamente confusa. As estimativas de distância genética obtidas entre os pares de ET's de *R. leguminosarum* bv. phaseoli indicaram, de acordo com a convenção adotada para os membros da família Enterobacteriaceae, que poderiam ser definidas cerca de sete espécies entre as estirpes analisadas.

Piñero et al. (1988) sugeriram que uma classificação biologicamente mais representativa de *Rhizobium* spp. deveria ser baseada na análise da variação dos genes cromossomais, mais do que em características fenotípicas, especialmente as codificadas total ou parcialmente por plasmídeos, tais como círculo de hospedeiras. A classificação proposta por Jordan em 1984 mostrou-se deficiente no sentido de que baseou-se em critérios fisiológicos e ecológicos, e não em critérios genéticos e evolucionários que refletissem a similaridade total das estirpes e suas prováveis linhas genealógicas de

evolução. Devido ao fato de que a transferência horizontal de genes cromossomais, embora ocorra, é menos provável do que a freqüente transferência de genes codificados por plasmídeos, os genótipos definidos por MLEE refletem muito melhor a história genealógica destas estirpes. De acordo com Piñero et al. (1988), uma hipótese que explicaria esta diversidade neste grupo de estirpes seria de que, através do tempo evolucionário, numerosas linhagens clonais divergentes de rizóbio, associadas com várias espécies de leguminosas, tenham adquirido a capacidade de colonizar *Phaseolus* spp pela aquisição de plasmídeos que continham genes que conferiam características de nodulação desta planta.

Estes estudos levaram à separação das estirpes de *R. leguminosarum* bv. phaseoli em dois tipos, I e II, de acordo com diferenças nos plasmídeos simbóticos (pSym), como a presença ou ausência de reiteraões (múltiplas cópias) de genes ligados à fixação de nitrogênio e a capacidade de nodular outros hospedeiros (Martínez et al., 1985; Flores et al., 1987). Inicialmente acreditava-se que a presença destas reiteraões representassem uma vantagem evolutiva para este biovar (Martínez et al., 1985; Romero et al., 1988), no entanto verificou-se, posteriormente, que estão relacionadas à constante variabilidade de diversos fenótipos (Soberón-Chaves et al., 1986; Flores et al., 1988). As estirpes do tipo I possuem múltiplas cópias do gene *nifH* e, acreditava-se, que possuíssem um círculo restrito de hospedeiras, centralizado no feijoeiro, enquanto que as estirpes do tipo II, que possuem uma única cópia deste gene, eram capazes de nodular, também, *Leucaena* spp (Martínez, et al., 1985; Brom et al., 1988). Recentemente ficou comprovado que o círculo de hospedeiras destas espécies é bem menos restrito e definido do que anteriormente estipulado (Hernandez-Lucas et al., 1995). Estes grupos diferem, ainda, na estrutura de seus polissacarídeos extracelulares (Zevenhuizen & Bertocchi, 1989; Gil-Serrano et al., 1990).

Logo a seguir, as estirpes do tipo II foram reclassificadas como *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), a partir de uma caracterização genotípica baseada nos dados de: MLEE, sequenciamento parcial do RNAr 16S, hibridização DNA-DNA e organização do DNA ribossomal. Foram descritos os dois subgrupos, IIA e IIB, para esta espécie, de modo a acomodar o baixo nível de homologia de DNA (36%) e as diferenças nas características fenotípicas e genotípicas, diferenças estas que foram recentemente confirmadas pela detecção de um megaplasmídeo específico em cada grupo (Geniaux et al., 1995). A espécie *R. etli* (Segovia et al., 1993) foi descrita posteriormente incluindo as estirpes que haviam sido classificadas como *R. leguminosarum* bv. phaseoli do tipo I de origem americana (Martínez et al., 1988), as quais constituem um biovar, *R. etli* bv. phaseoli, e isolados não simbióticos originários do México (Segovia et al., 1991). O sequenciamento parcial do RNAr 16S foi utilizado para diferenciar *R. leguminosarum* de *R. etli* (Segovia et al., 1993), sendo que, atualmente, somente são consideradas como *R. leguminosarum* bv. phaseoli as estirpes que estiverem estreitamente relacionadas com os genes cromossomais dos outros biovars (bv. trifolii e bv. viceae) desta espécie (Lindström et al., 1995).

A definição da espécie *R. tropici* foi baseada em dados de MLEE de 64 estirpes do tipo II, isoladas em diferentes regiões geográficas, comparadas com outras espécies de rizóbio, seguida de uma caracterização fenotípica (Martínez-Romero et al., 1991). Foi possível subdividir as estirpes do tipo II nos dois subgrupos IIA e IIB pelos dados de MLEE, os quais mostraram-se distintos das estirpes do tipo I. As estirpes do tipo II ficaram a uma distância genética de 0,86 das do tipo I, enquanto que a distância entre os dois subgrupos, IIA e IIB, foi de 0,79. As estirpes do tipo IIA apresentaram maior homogeneidade do que as do tipo IIB, com um nível médio de diversidade de 0,289 enquanto que para as estirpes do tipo IIB foi obtido um índice de 0,363. Foram escolhidas

estirpes representativas para hibridização de DNA total e ribossomal e para a determinação da seqüência parcial do RNAr 16S. Quatro estirpes do tipo IIA e cinco do tipo IIB constituíram grupos homogêneos, com níveis relativamente altos de homologia de DNA, 91,7% com a estirpe de referência do subgrupo IIA (CFN 299) e 81,4% para as estirpes do tipo IIB com a estirpe de referência deste subgrupo (CIAT 899). DNAs de outras espécies de *Rhizobium* (*R. leguminosarum* bv. phaseoli, *R. leguminosarum* bv. viceae e *R. leguminosarum* bv. trifolii) mostraram menos de 30% de hibridização com o DNA total, tanto da estirpe CFN 299 quanto da CIAT 899. Os dados de RFLP (restriction fragment length polymorphism – polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição) dos operons de RNAr foram determinados e revelaram que os padrões de hibridização para as estirpes do tipo I e tipos IIA e IIB são claramente distintos.

A caracterização fenotípica destes isolados foi baseada em 118 diferentes características, incluindo diferentes fontes de carbono e nitrogênio, tolerância a antibióticos e metais pesados, temperatura máxima de crescimento entre outras. Os resultados da análise de agrupamento mostrou que, de modo geral, os resultados estão de acordo com o dendrograma resultante da análise de MLEE, mas a distinção entre os dois agrupamentos (IIA e IIB), com base nos dados fenotípicos, foi mais evidente. As estirpes do tipo IIA requerem cálcio para crescimento em meio PY e não crescem em meio LB, são imóveis em meio contendo 0,3% de agar e a temperatura máxima de crescimento é de 35 a 37°C. Entretanto, as estirpes do tipo IIB não requerem cálcio para crescimento e não crescem em meio LB, são móveis em meio 0,3% de agar e sua temperatura máxima de crescimento é de 40°C. As estirpes do tipo IIB são mais resistentes à antibióticos e metais pesados do que as do tipo IIA. Devido a todas estas diferenças, os autores sugerem que estes subgrupos devam ser futuramente considerados como subespécies.

As estirpes do tipo II, agora *R. tropici*, chamaram a atenção dos pesquisadores devido a uma série de características genéticas e outras de interesse agrônomo. Seu plasmídeo simbiótico, quando transferido para estirpes de *Agrobacterium tumefaciens*, promove um processo simbiótico efetivo e completamente diferenciado (Brom et al., 1988; Martínez et al., 1987). Estas células recipientes são geneticamente estáveis, retendo seu plasmídeo mesmo depois de uma incubação prolongada a 37°C. Alguns isolados de *R. tropici* são tolerantes a temperaturas altas (Karanja & Wood, 1988b; Mercante, 1993), acidez e alumínio (Cunningham & Munns, 1984; Graham & Parker, 1964; Karanja & Wood, 1988a; Vargas et al., 1990).

A posição filogenética de *R. tropici* foi distinta de *R. leguminosarum* de acordo com as metodologias acima citadas, no entanto, a partir da definição de *R. tropici* até 1993, todas as estirpes isoladas de feijoeiro que não se enquadrassem na descrição desta espécie eram classificadas como *R. leguminosarum* bv. phaseoli. Analisando a estrutura genética de uma população não simbiótica de *R. leguminosarum*, por eletroforese de isoenzimas, Segovia et al. (1991) observou que as estirpes de origem americana de sua coleção, até então classificadas como *R. leguminosarum* bv. phaseoli, formavam um agrupamento separado de *R. leguminosarum* bv. viciae e *R. leguminosarum* bv. trifolii. Logo a seguir, foi observada uma grande diferença entre a seqüência parcial de nucleotídeos do DNAr 16S dos isolados de feijoeiro de origem americana e a seqüência da estirpe de referência de *R. leguminosarum* bv. viciae (Eardly et al., 1992). Esta evidência levou os autores a sugerirem que as estirpes de feijoeiro de origem americana deveriam ser referidas como *Rhizobium* spp. do tipo I, e não *R. leguminosarum* bv. phaseoli. Um estudo mais detalhado de várias estirpes originárias de feijoeiro crescido nas Américas, baseado da determinação da seqüência parcial de nucleotídeos do 16S RNAr, onde foram incluídas diferentes estirpes representando as linhagens principais de

Rhizobium spp. do tipo I e um isolado mexicano de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, levou à reclassificação de *Rhizobium* spp. do tipo I como *R. etli*.

Conforme já destacado acima, *R. etli* passou a incluir os isolados não simbióticos de *Rhizobium* spp do tipo I e, pelo menos um biovar, o *R. etli* biovar *phaseoli*, o qual nodula e fixa nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L., embora não exclusivamente (Hernandez-Lucas et al., 1995) como foi definido inicialmente (Segovia et al., 1993), possui reiteraões nos genes que codificam para a nitrogenase redutase e duas unidades transcricionais separadas para os genes *nodA* e *nodBC* (Segovia et al., 1993). *R. etli* também apresenta hibridização com o gene *psi* (polysacharide inhibition) e pode ser distinguido das outras espécies, a nível molecular, pelos resultados de hibridização de DNA, isoenzimas e seqüenciamento dos genes ribossomais (Segovia et al., 1993).

Os limites interespecíficos entre *R. leguminosarum* e *R. etli* são bastante flexíveis. Os níveis de homologia detectados para o DNA (45%) e para várias regiões cromossômicas, tais como para os genes *lac* e os que codificam para lipopolissacarídeos, observados para as duas espécies (Laguerre et al., 1993a), sugerem que possam ter ocorrido transferências gênicas e recombinações entre estas duas espécies (Amarger et al., 1997). Além disso, os genes dos plasmídeos simbióticos destas duas espécies são homólogos e organizados similarmente (Davis & Johnston, 1990; Vasquez et al., 1991). Acredita-se que *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* possa ter surgido através da transferência horizontal do plasmídeo simbiótico de *R. etli* para *R. leguminosarum* (Segovia et al., 1993). Seja qual for a origem, estas duas espécies mostram-se mais proximamente relacionadas do que os dois subgrupos de *R. tropici*.

Estudando o relacionamento genético evolucionário entre isolados de rizóbio que nodulam o feijoeiro, Eardly et al. (1995) observou a presença de um alelo do RNAr 16S (alelo "I") em isolados pertencentes ao tipo eletroforético, analisado por MLEE,

característico de *R. etli*, bem como em isolados pertencentes a outras duas linhagens divergentes. Várias cópias dos genes ribossomais são encontradas no genoma bacteriano, sendo que a bactéria possui diversos mecanismos de conservação e recombinação genética de genes presentes em múltiplas cópias. Através da análise por MLEE, os isolados possuindo os alelos “I” não foram puderam ser agrupados dentro do mesmo tipo eletroforético, o que caracteriza a sua divergência a nível cromossomal. A explicação encontrada para estes resultados seria a ocorrência de transferência horizontal e recombinação do gene, completo ou em parte, entre estas linhagens de relacionamento distante. É relevante observar que os alelos “I” (*R. leguminosarum*) e “e” (*R. etli*), também ocorrem em estirpes atualmente classificadas como *R. leguminosarum* bv. trifolii e divergentes pela análise de MLEE a uma distância genética de 0,55 (Eardly, 1993). Pela análise destes dados fica evidente que são necessários maiores estudos envolvendo variações alélicas dos genes ribossomais e, mesmo, de outros genes cromossomais, para elucidar as relações evolucionárias entre as espécies de *Rhizobium* que nodulam o feijoeiro, e para determinar o envolvimento dos eventos de recombinação de genes que sofrem transferência horizontal, na evolução destas espécies e das espécies relacionadas, como *R. leguminosarum* bv. trifolii e viciae (Eardly et al., 1995).

Filogeneticamente, uma análise da seqüência total do RNAr 16S indica que *R. etli*, *R. leguminosarum* e *R. tropici* formam um grupo monofilético coerente, o qual também inclui uma linhagem independente contendo um único isolado de nódulos de feijoeiro (van Berkum et al., 1996) e *Agrobacterium rhizogenes*, a qual é proximamente relacionada a *R. tropici* (Willems & Collins, 1993).

R. etli é considerada como a espécie que, mais provavelmente, coevoluiu com o feijoeiro, pelo seu freqüente isolamento nas regiões consideradas como centro de diversificação da hospedeira, tendo sido relatada a presença de bactérias relacionadas a

esta espécie nodulando diferentes leguminosas mesoamericanas (Hernandez-Lucas et al., 1995). Estas bactérias são consideradas linhagens divergentes que, provavelmente, tiveram um ancestral comum com *R. etli* (Martínez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). Num estudo sobre a diversidade de populações de *R. etli* associadas ao feijoeiro, nos altiplanos mexicanos, numa mesma área, esta espécie foi detectada nodulando tanto *Phaseolus vulgaris* quanto *Phaseolus coccineus*, assim como, feijoeiros selvagens (Souza et al., 1994). Quanto a sua distribuição geográfica, acredita-se que *R. etli* tenha sido introduzido na Europa pela Espanha, à época da colonização das Américas, no século XVI, juntamente com as sementes de feijoeiro. Sabe-se que há abundantes populações nativas de *R. etli* neste país, sendo que o alelo do RNAr 16S de *R. etli* também é encontrado na França (Amarger, dados não publicados, citada por Amarger et al., 1997), na Indonésia e África (Tjahjolenksono, 1993, citado por Amarger et al., 1997; Anyango et al., 1995).

R. tropici foi originalmente isolado de *P. vulgaris* e *Leucaena*, em solos ácidos do cerrado brasileiro (Martínez-Romero et al., 1991; Mercante et al., 1998). Uma vez que tanto o feijoeiro quanto a leucena são plantas introduzidas nas regiões do cerrado, acredita-se que *R. tropici* tenha sido, originalmente, simbiote de alguma outra leguminosa destas regiões. Em solos africanos, esta espécie foi recuperada de nódulos de *Bolusanthus* e *Spartium* (Dagut & Stein, 1995), e de feijoeiro cultivado em solos do Kenya (Anyango et al., 1995). A sua dispersão em solos africanos teria sido a sua introdução, pelos portugueses, juntamente com as sementes do feijoeiro (Martínez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). *R. tropici* foi recuperado de nódulos de feijoeiro provenientes de três localidades diferentes da França, em áreas caracterizadas como de solos arenosos e ácidos (Amarger et al., 1994).

Vários isolados de rizóbio, eficientes quanto à nodulação e fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro, têm sido detectados em solos africanos sem nenhum histórico de cultivo anterior ou inoculação (Anyango et al., 1995). Além disso, foram detectados em solos franceses quatro grupos distintos de rizóbio nodulando o feijoeiro: *R. leguminosarum* bv. phaseoli, as espécies genômicas 1 e 2, descritas a seguir (Geniaux et al., 1993; Laguerre et al., 1993c) e *R. tropici* (Amarger et al., 1994). Embora o feijoeiro não seja originário da Europa Ocidental, continente que possui um histórico de cultivo de feijoeiro com cerca de 500 anos, a grande diversidade de microsimbiontes existentes nestes solos sugere que as estirpes de *Rhizobium* spp, capazes de nodular o feijoeiro, sejam pré-existentes nestas regiões, o que explicaria a rápida disseminação dessa cultura na Europa.

A classificação com base na especificidade hospedeira, inicialmente descrita para *R. etli* e *R. tropici*, segundo a qual *R. etli* nodularia apenas o feijoeiro e *R. tropici* teria um círculo amplo de hospedeiras, incluindo o feijoeiro e a leucena, foi totalmente descartada. Algumas estirpes, identificadas como *R. etli* através do padrão de proteínas, foram isoladas de *Desmodium*, *Memolobium* e *Indigofera*, além das leguminosas arbóreas *Acacia melonoxylon* e *Chamaecrista stricta*, na África do Sul (Dagut & Stein, 1995). Atualmente, ambas espécies são consideradas como possuidoras de um amplo, embora distinto, círculo de hospedeiras (Martínez-Romero et al., 1991; Hernandez-Lucas et al., 1995). Os dados de Hernandez-Lucas et al. (1995) permitiram que se chegasse a importantes conclusões sobre o círculo de hospedeiras destas duas espécies, como: (a) nenhuma das espécies é simbioticamente restrita às duas leguminosas que, até então haviam sido testadas: *P. vulgaris* e *L. leucocephala*; (b) a habilidade de nodulação, embora algumas vezes específica da estirpe, é bem mais ampla do que estas duas leguminosas e se estende a diversas outras leguminosas, sendo que todos os isolados

testados, tanto de *R. etli* como de *R. tropici*, nodularam *Albizia lebbbeck*, *Gliricidia maculata* e *Leucaena leucocephala*; (c) a resposta de *L. leucocephala* às estirpes testadas foi bem diferente dos resultados anteriores, pelos quais apenas as estirpes de *R. tropici*, não as de *R. etli*, nodulariam esta planta. Embora a estirpe padrão de *R. etli* (CFN 42) forme apenas nódulos pequenos e sem leghemoglobina nesta planta, outra estirpe pertencente à mesma espécie, a F16, induz nodulação bastante semelhante à de *R. tropici*. Consequentemente, tanto *R. tropici* quanto *R. etli* podem ser considerados como simbiontes desta leguminosa, uma hospedeira comum aos rizóbios isolados de um grupo bastante diverso de leguminosas: *Astragalus onobrychis*, *Calliandra spp.*, *Coronilla varia*, *Gliricidia maculata*, *Lablab atropurpureus*, *Lotus divaricatus*, *Onobrychis viciifolia* e outros (Bromfield & Barran, 1990; Jarvis, 1983; Trinick, 1980; Turk & Keyser, 1992).

Estudos da diversidade de rizóbio que nodula o feijoeiro na França (Laguerre et al., 1993a, b e c) levaram à descrição de duas novas espécies *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger et al., 1997). Inicialmente, estes isolados formaram dois agrupamentos que diferiam de *R. leguminosarum*, *R. etli* e *R. tropici*, principalmente pela análise de restrição do DNA total utilizando-se diferentes sondas de DNA (Geniaux et al., 1993; Laguerre et al., 1993c). As análises de hibridização de DNA-DNA e sequenciamento parcial do rRNA 16S mostraram que estes isolados constituíam espécies genômicas distintas, sendo que, para a espécie genômica 1, a espécie mais próxima era a *R. etli* e as mais próximas à espécie genômica 2, eram a *R. galegae* e a *R. loti*. Amarger et al. (1997) procederam a um estudo das características fenotípicas de 90 estirpes, isoladas de nódulos de *Phaseolus spp.*, previamente caracterizadas como pertencentes a cada uma das duas espécies genômicas ou a uma das três espécies de rizóbio que nodula o feijoeiro, até então descritas. Os dados fenotípicos destas estirpes foram comparados aos de estirpes de referência de rizóbio, por taxonomia numérica, de modo a preencher os requisitos

listados por Graham et al. (1991), dentro da abordagem polifásica para a descrição de novas espécies. A posição filogenética de cada uma das espécies genômicas, dentro do subgrupo alfa-2 de *Proteobacteria*, foi determinada pelo sequenciamento total de nucleotídeos do RNAr 16S pertencente a uma estirpe representativa.

Através destas análises, os isolados de *R. gallicum* agruparam-se com as espécies que nodulam o feijoeiro, *R. leguminosarum*, *R. etli* e *R. tropici*, enquanto que *R. giardinii* apresentou um relacionamento distante com as outras espécies de *Rhizobium*, ficando mais proximamente relacionado com *R. galegae* e várias espécies de *Agrobacterium*. Cada uma destas espécies foi dividida em dois subgrupos com base em características simbióticas, de natureza fenotípica, como o círculo de hospedeiros e a efetividade na fixação de nitrogênio e de natureza genotípica, com base na análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição das regiões simbióticas. Tais critérios permitiram identificar as espécies genômicas 1 e 2 como associadas a genótipos distintos (Geniaux et al., 1993). Um desses genótipos é característico da espécie, e o outro comum a ambas. Sendo assim, *R. gallicum* foi subdividido em dois biovares: *R. gallicum* bv. *gallicum* e *R. gallicum* bv. *phaseoli*; semelhantemente, *R. giardinii* compõe-se dos biovares *R. giardinii* bv. *giardinii* e *R. giardinii* bv. *phaseoli*. Os biovares *phaseoli*, com características simbióticas comuns a ambas espécies, têm as mesmas características simbióticas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli* bv. *phaseoli*, ou sejam: homologia à sonda *nodB* de CFN 42, usada para identificar o plasmídeo simbiótico desses biovares; três cópias dos genes *nifH*; nodulação do gênero *Phaseolus* e nodulação tardia em *Macroptilium atropurpureum*. Estes dois biovares, de ambas espécies, com características genotípicas simbióticas e fenotípicas de nodulação semelhantes a *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli* bv. *phaseoli*, provavelmente receberam seus plasmídeos simbióticos,

através de transferência horizontal, de estirpes de *R. leguminosarum*, presentes nos locais de onde foram isolados.

Estas novas espécies podem ser diferenciadas das outras espécies de rizóbio relacionadas através de hibridização de DNA, sequenciamento do RNAr 16S e análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (Amarger et al., 1997). A descrição das espécies inclui as seguintes características (Amarger et al., 1997): os isolados de *R. gallicum* bv. *gallicum* nodulam o feijoeiro e, também, *Leucena leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum* e *Onobrychis viciifolia*. Ambos biovars desta espécie fixam nitrogênio em *P. vulgaris*, e, a nível molecular, *R. gallicum* bv. *gallicum* pode ser distinto do outro biovar, por possuir apenas uma cópia do gene *nifH*. *R. giardinii* bv. *giardinii* nodula os mesmos hospedeiros do bv. *gallicum*, mas os biovars desta espécie não fixam nitrogênio em *P. vulgaris* (*R. giardinii* bv. *giardinii*) ou são muito pouco eficientes (*R. giardinii* bv. *phaseoli*). Pela análise molecular, este biovar se distingue do bv. *giardinii* pela ausência de hibridização com uma sonda contendo os genes *nifH*, mesmo sob condições de baixa estrigência.

A abrangência geográfica das novas espécies isoladas na França, *R. gallicum* e *R. giardini*, ainda precisa ser estabelecida, tendo sido relatada a ocorrência de *R. gallicum* bv. *gallicum* em solos da Áustria (Sessitsch et al., 1997). Foi proposto, por Sessitsch et al. (1997), que o isolado mexicano FL27 seja classificado como *R. gallicum* bv. *gallicum*, com base nos dados de homologia de DNA e seqüenciamento do RNAr 16S. Apesar da homologia de DNA ser considerada baixa (35 a 61%), está dentro dos padrões sugeridos por Stackebrandt & Goebel (1994) e pode estar relacionada à presença de plasmídeos nesta estirpe, capazes de conter até 25% da informação genética em *Rhizobium* (Prakash & Atherly, 1986). Novamente, a presença desta espécie em solos europeus, devido à similaridade com este isolado mesoamericano, foi associada à importação como

contaminante das sementes de feijoeiro. No entanto, a baixa eficiência simbiótica desta espécie em simbiose com o feijoeiro levanta a hipótese de que esta planta não seja o verdadeiro hospedeiro original de *R. gallicum* bv. *gallicum*, principalmente pelo fato do isolado FL27 ter sido obtido de plantas de feijoeiro, crescidas em um campo de cultivo de leucena (Sessitsch et al., 1997).

No Brasil, três espécies distintas de rizóbio são de reconhecida importância ecológica como simbioses do feijoeiro: *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* e *R. tropici*. Diversas espécies de rizóbio, assim como estirpes isoladas de leguminosas florestais foram relatadas como capazes de nodular esta planta, embora não se conheça sua importância ecológica, uma vez que resultam de experimentos de inoculação em laboratório e não de ocorrência natural (Wilson, 1944; Eardly et al., 1985; Bromfield & Barran, 1990; Sadowsky et al., 1988; Lange, 1961, Bal et al., 1982; Herrera et al., 1985; Martínez-Romero et al., 1991; Hungria et al., 1993; Thomas et al., 1994; Hernandez-Lucas et al., 1995).

2.2.3. O efeito das temperaturas elevadas na simbiose feijoeiro-rizóbio:

O inoculante para o feijoeiro no Brasil foi, durante muito tempo, produzido com base em estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli*, sendo muitas delas obtidas no exterior e testadas pelas instituições de pesquisa no Brasil. Com a evolução dos estudos taxonômicos, revelando diferentes agrupamentos de isolados com características simbióticas e adaptação ecológica distintas, inclusive envolvendo isolados obtidos nas regiões de clima tropical, verificou-se a inadequação das estirpes tradicionalmente recomendadas para as condições de cultivo brasileiras. Atualmente, sabe-se que as estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli* estão sujeitas a um elevado grau de instabilidade genética (Soberón-Chaves et al., 1986; Flores et al., 1988), o que pode

explicar, pelo menos parcialmente, a grande variabilidade na eficiência simbiótica verificada nestes experimentos.

Vários fatores interferem na eficiência simbiótica das estirpes de rizóbio em condições de campo, sendo alguns intrínsecos da bactéria e outros extrínsecos, envolvendo outros microrganismos do solo, fatores de clima e solo ou determinados pela planta hospedeira. Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos visando elucidar os efeitos dos diferentes fatores bióticos e abióticos do solo e do clima nesta interação.

Um dos fatores limitantes à simbiose rizóbio-leguminosas sob condições tropicais é a ocorrência de temperaturas altas no solo, as quais atingem médias superiores a 38°C, nas camadas superficiais (Mercante, 1993), onde se concentra a nodulação de leguminosas, como o feijoeiro e a soja. As temperaturas altas afetam a sobrevivência do rizóbio no solo, o processo de infecção, a formação dos nódulos e, ainda, a atividade de fixação biológica de nitrogênio. Além disso, quando se considera o rizóbio no inoculante, afeta a sua sobrevivência no veículo, tanto durante o período de transporte quanto de armazenamento.

As leguminosas diferem quanto a sua tolerância ao estresse térmico, sendo a soja uma planta bastante tolerante, cuja fixação de nitrogênio só é limitada por temperaturas diurnas acima de 41°C, e estimulada a 36°C (La Favre & Eaglesham, 1987). Com base em diversos dados de literatura, a temperatura crítica para a fixação biológica de nitrogênio varia entre 30°C, para trevo e ervilha, e entre 35 a 40°C, para soja, amendoim e caupi. O funcionamento dos nódulos de feijoeiro encontra seu valor ótimo entre as temperaturas de 25 e 30°C, diminuindo para temperaturas do solo entre 30 e 33°C (Hernandez-Armenta et al., 1989; Pankhurst & Sprent, 1976; Piha & Munns, 1987b; Hungria et al., 1985). Neste aspecto, o feijoeiro é considerado um hospedeiro bastante sensível, havendo diferenças entre as diferentes espécies de *Phaseolus* (Piha & Munns,

1987b) e entre as espécies de rizóbio que nodulam esta planta, quanto à tolerância a este estresse (Mercante, 1993), indicando perspectivas para o melhoramento da simbiose visando sua melhor adequação ao clima tropical.

Vários genótipos de feijoeiro foram testados por Piha & Munns (1987b) quanto à tolerância a temperaturas altas em simbiose, e observou ser o peso da parte aérea seca dos genótipos cultivados a 33°C consideravelmente menor quando comparado ao das plantas crescidas a 27°C. Uma redução similar foi observada para linhagens provenientes de cruzamentos entre *P. vulgaris* e *P. acutifolius*. Outras espécies de *Phaseolus*, como *P. acutifolius*, *P. lunatus* e *P. filiformis*, assim como caupi e soja foram menos sensíveis às temperaturas altas no sistema radicular. Plantas de feijoeiro crescidas com nitrogênio mineral não foram afetadas pelas temperaturas altas, indicando que a assimilação de nitrogênio, via fixação biológica, é mais sensível do que as vias de assimilação de nitrogênio mineral.

Para a maioria das espécies de rizóbio a temperatura ótima de crescimento está entre 28 e 31°C, sendo que muitas são incapazes de crescer abaixo de 10°C ou acima de 31°C (Graham, 1992). No caso de feijoeiro, já foram detectadas estirpes capazes de crescerem a temperaturas médias mais elevadas do que a hospedeira (Graham, 1979; Josephson & Pepper, 1984; Piha & Munns, 1987b; Karanja & Wood, 1988b; Gitonga et al., 1989; Hungria et al., 1993). Foram também descritas estirpes de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro e fixar nitrogênio em um regime térmico de 40/23°C (dia/noite) foram descritas (Hungria et al., 1993). As espécies de *R. tropici* parecem suportar melhor as condições de temperaturas elevadas em simbiose, e os resultados obtidos por Mercante (1993) indicam que plantas inoculadas com estas estirpes recuperam a atividade da nitrogenase mais rapidamente do que as demais espécies, após serem submetidas a um estresse de temperaturas altas (38°C, durante 5 horas por dia), por um período de três

dias. Por outro lado, quando esta mesma cultivar é inoculada com estirpes de *R. etli* e submetida a este estresse, a recuperação da atividade é lenta e dependente da formação de nódulos novos, uma vez que o choque térmico provoca senescência dos nódulos formados por estas estirpes (Straliotto et al., 1992). Este efeito drástico na redução da atividade da nitrogenase e, conseqüentemente, no acúmulo de nitrogênio total em plantas bem noduladas foi também observado por Hungria & Franco (1993).

O crescimento *in vitro* em temperaturas altas é um dos parâmetros que permitem diferenciar as espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro (Hungria et al., 1997). De modo geral, considera-se que as estirpes anteriormente classificadas como de tipo I (*R. leguminosarum* bv. phaseoli e *R. etli*) são menos tolerantes a temperaturas altas em meio de cultivo, sendo sua temperatura máxima de crescimento em torno de 35°C. Já *R. tropici* é mais tolerante, sendo que as estirpes do tipo IIA toleram até 37°C e as do tipo IIB, até 40°C. Atualmente, a capacidade de nodular leucena não é mais um parâmetro confiável na separação das espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro, no entanto, é interessante observar que dados de diversos autores, estudando populações de rizóbio dos cerrados (Vargas et al., dados não publicados; Mercante, 1993) ou de regiões de clima semi-árido (Straliotto et al., 1995) mostram que os isolados que nodulam o feijoeiro, recuperados do solo utilizando leucena com planta-isca, são mais tolerantes às temperaturas altas *in vitro*. Mercante (1993) observou uma correlação entre a temperatura máxima de crescimento *in vitro* e *in vivo*, sendo que estes isolados de leucena mostraram-se mais tolerantes às temperaturas elevadas em simbiose. Embora este e outros autores (Munévar & Wollum II, 1981; Kishinevsky et al., 1992) apontem para uma correlação positiva entre estas avaliações, outros trabalhos demonstram que não há uma correlação significativa entre o crescimento *in vitro* a temperaturas altas e a infectividade da bactéria e sua capacidade

de fixar nitrogênio nestas condições (La Favre & Eaglesham, 1986; Kluson et al., 1986; Karanja & Wood, 1988b).

Raghuwanshi et al. (1994) observaram que sob diferentes condições de temperatura há uma modificação na concentração e na qualidade dos flavonóides excretados pelas raízes de guandu (*Cajanus cajan* (L) Millsp). Além de afetar a sinalização molecular a nível da hospedeira, a temperatura também afeta a expressão dos genes *nod* das bactéria (McKay & Djordjevic, 1993; Hungria, 1995).

A indução de proteínas do tipo “heat shock”, tanto na bactéria (Krishnan & Pueppke, 1991; Fischer et al., 1993; Ogawa & Long, 1995) quanto na planta hospedeira (Araújo, 1997) tem sido investigada como uma alternativa para a identificação de genótipos resistentes. Estas proteínas foram estudadas tanto em diferentes cultivares de feijoeiro, selecionadas em condições de estresse (Araújo, 1997), como também em *R. tropici* e *R. etli* (Michiels et al., 1994), porém o significado da presença destas proteínas e sua possível ligação com uma maior tolerância da simbiose ao estresse térmico ainda necessita ser elucidado.

A temperatura afeta um outro nível de expressão gênica, que são os eventos de recombinação e deleção, especialmente a nível do plasmídeo simbiótico (Zurkowsky, 1982; Trevors, 1986; Toro & Olivares, 1986). A perda (cura) de plasmídeos foi observada em *R. leguminosarum* bv. phaseoli (Soberón-Chaves et al., 1986; Karanja & Wood, 1988b), enquanto que as estirpes de *R. tropici* IIB foram consideradas como geneticamente mais estáveis, tendo retido o seu plasmídeo simbiótico, mesmo após prolongada incubação a 37°C (Martínez-Romero et al., 1991). Este fator pode ser, em parte, responsável pela maior competitividade da estirpe de *R. tropici* IIB, CIAT 899 (de Oliveira & Graham, 1990). A cura de plasmídeos pode ser responsável pela perda de infectividade de estirpes capazes de sobreviver a uma temperatura de 45°C (Karanja &

Wood, 1988b). Mesmo a temperaturas de 37°C foi observada a perda das propriedades simbióticas, como capacidade infectiva ou eficiência na fixação biológica de nitrogênio (Soberón-Chaves et al., 1986), a qual pode ser atribuída a rearranjos genômicos. Segovia et al. (1991) observou um grande número de isolados de rizóbio não simbióticos na rizosfera do feijoeiro, em número muito superior aos simbióticos, afetando diretamente a competitividade das estirpes inoculadas. A ocorrência de temperaturas altas nos solos tropicais, aliada à predominância de estirpes mais susceptíveis à estas perdas, podem estar contribuindo para a frequência alta nos solos de isolados não infectivos.

Temperaturas elevadas provocam um retardo ou restringem a nodulação às zonas subsuperficiais do solo, onde as temperaturas não são tão extremas. Munns et al. (1977) observaram que, em zonas desérticas, a nodulação é muito mais expressiva abaixo dos 5 cm de solo. A maior exposição do solo, em plantios mais espaçados, também provoca uma redução no número de nódulos superficiais (Graham & Rosas, 1978). Por outro lado, na prática do plantio direto, as temperaturas do solo são de 5 a 10°C inferiores às encontradas no plantio convencional (Hungria et al., 1997), favorecendo a sobrevivência do rizóbio, a nodulação e a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (Hungria et al., 1995).

A metodologia de estudo envolvendo um choque térmico, aplicado durante o período de crescimento das plantas, parece simular mais de perto as condições de campo. Hernandez-Armenta et al. (1989) observaram que a transferência das plantas noduladas de feijoeiro de uma temperatura diurna de 26 para 35°C provocou uma inibição drástica na fixação de nitrogênio. Hungria & Franco (1993) observaram o mesmo efeito para todas as estirpes inoculadas, transferindo feijoeiros nodulados de um ciclo diurno a 28°C para 40°C. Por outro lado, Mercante (1993) conseguiu detectar diferenças na tolerância ao estresse térmico entre estirpes pertencentes à espécies distintas,

transferindo plantas, no estágio reprodutivo, de 28 para 38°C durante 5 horas por dia, por 2 a 3 dias, procedimento que se tornou um padrão para a seleção de estirpes mais tolerantes, nos trabalhos subsequentes (Straliotto et al., 1997).

Os efeitos das temperaturas altas nas plantas noduladas são diversos, provocando decréscimo na atividade da nitrogenase, no nitrogênio total acumulado na planta, na eficiência relativa da nitrogenase, na atividade da GS e GOGAT, no transporte de nitrogênio e na concentração de ureídeos na seiva xilemática (Piha & Munns, 1987a,b; Hernandez-Armenta et al., 1989; Hungria & Franco, 1993; Hungria et al., 1993; Hungria et al., 1989). É também um dos fatores associados à senescência precoce dos nódulos (Hungria et al., 1993). Conforme destacado acima, as plantas noduladas com estirpes tolerantes ao estresse térmico recuperam a atividade nodular mais rapidamente, não havendo a senescência dos nódulos, mesmo após um período de estresse térmico (Straliotto et al., 1992).

As estirpes de *R. tropici*, apesar de mais tolerantes ao estresse térmico, não apresentaram boa sobrevivência no solo após cultivos sucessivos do feijoeiro (Vlassak et al., 1996). Esta pode ser uma característica benéfica e até mesmo desejável, uma vez que permite a substituição destas estirpes no inoculante comercial, a medida que o conhecimento sobre a diversidade do rizóbio em solos tropicais permita a seleção de estirpes mais adequadas.

2.3. MÉTODOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES PARA O ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DO RIZÓBIO.

2.3.1. Introdução:

Os estudos taxonômicos e filogenéticos são necessários para estruturar a biodiversidade do rizóbio presente no solo, facilitar a comunicação entre os cientistas e buscar um maior entendimento da biologia e evolução desta simbiose, com importantes aplicações práticas. De acordo com Haukka (1997), a filogenia pode ser definida simplesmente como uma história evolucionária de organismos e genes, cujo entendimento é um pré-requisito para estudos ecológicos e de genética de populações. A identificação correta de um microrganismo de acordo com suas correlações filogenéticas nos ajuda a prever propriedades genotípicas e fenotípicas esperadas para cada espécie. Em termos de microbiologia, durante muito tempo, foi dada pouca importância aos estudos taxonômicos, em vista das grandes dificuldades de classificação impostas pelos métodos tradicionais baseados essencialmente em características fenotípicas, tanto morfológicas como fisiológicas.

As primeiras modificações nestes estudos, extremamente empíricos, começaram a ser introduzidas pela utilização dos métodos de taxonomia numérica. Este tipo de abordagem permite a análise conjunta dos dados de fisiologia, morfologia, serologia e

outros, utilizando métodos estatísticos de avaliação das diferenças e similaridades entre os microrganismos, de uma forma menos subjetiva e mais rigorosa, fornecendo medidas quantitativas de similaridade entre as bactérias. Há uma grande aplicabilidade destes estudos na avaliação da biodiversidade de diferentes grupos de microrganismos (Bull et al., 1992), que, além de permitir um levantamento preliminar da diversidade presente no ambiente em estudo, fornecem dados sobre a expressão de características fisiológicas que podem ser correlacionados com determinados fatores ambientais.

Os métodos moleculares baseados no estudo do genoma bacteriano constituíram-se, logo a seguir, numa fonte abundante de dados, facilmente reprodutíveis e passíveis de serem gerados sem a interferência de problemas técnicos importantes, como condições de cultivo, estado fisiológico e outros fatores que, muitas vezes, mascaram os dados fenotípicos.

2.3.2. A abordagem polifásica e as aplicações da biologia molecular nos estudos de taxonomia e diversidade do rizóbio.

Os estudos taxonômicos foram, por muito tempo, relegados a um segundo plano dentro da chamada “ciência aplicada”, objeto de estudos de abnegados cientistas, às voltas com inúmeros problemas relativos à definição de espécies, especialmente quando se considera o estudo da taxonomia bacteriana. Uma definição interessante desta ciência foi dada por Wilson (1985), já prevendo as mudanças que iniciavam a ocorrer neste campo de estudo: “Systematics, the study of biological diversity, is sometimes portrayed as the mere classification of organisms, but in fact its range and challenges are among the greatest in biology”.

Este extenso campo de ação só pode ser melhor compreendido no contexto da nova sistemática microbiana, surgida a partir da introdução e aplicação de novos

conceitos taxonômicos e técnicas surgidas a partir do final dos anos 50 e início dos anos 60 (Bull et al., 1992). O desenvolvimento mais significativo iniciou-se com a aplicação dos métodos de taxonomia numérica, molecular e química e, especialmente nos últimos 10 anos, com o rápido desenvolvimento no campo do sequenciamento do DNA e dos genes que codificam para o RNAr (DNAr) que vem contribuindo para a filogenia bacteriana e taxonomia de todos os organismos vivos, além das técnicas de “fingerprinting” molecular. Com o advento da análise fenética numérica e das técnicas de biologia molecular dentro da taxonomia bacteriana, foi possível determinar objetivamente as relações inter e intra-específicas.

A chamada taxonomia polifásica, iniciou-se 25 anos atrás, e seu objetivo é a integração dos diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genéticas e filogenéticas) sobre o microrganismo e essencialmente indica uma taxonomia de consenso (Vandamme et al., 1996). O termo “taxonomia polifásica” foi utilizado pela primeira vez por Colwell (1970) e é utilizado para o delineamento de taxa em todos os níveis (Murray et al., 1990). Os recentes desenvolvimentos na taxonomia polifásica, também chamada de classificação polifásica ou identificação polifásica, constituem um enorme avanço na moderna taxonomia bacteriana (Vandamme et al., 1996).

A questão da definição de espécies em bacteriologia, ou seja, se as bactérias, assim como plantas e animais, podem ser ordenadas em taxa distintos, como gêneros e espécies, permanece em aberto. A definição zoológica de espécie não pode ser aplicada aos organismos procariotos, pois pressupõe que a “espécie é um grupo de populações que podem ser, ou são potencialmente, inter cruzadas naturalmente e que são reprodutivamente isoladas de outros grupos ou espécies” (Ravin, 1963, citado por Stackebrandt & Goebel, 1994). Mesmo após muitos anos de pesquisas, a extensão da sexualidade em bactérias é virtualmente desconhecida e o isolamento reprodutivo de

estirpes bacterianas pode ser descartado (Stackebrandt & Goebel, 1994). Se o termo espécie é usado, então, para expressar os membros de um determinado organismo em uma ordem taxonômica, os microbiologistas devem seguir algumas linhas mestras, de modo a obter estabilidade, reprodutibilidade e coerência em seus dados taxonômicos. Neste caso, a espécie passa a ser circunscrita a um grupo taxonômico definido em termos das características de seus membros constituintes (Stackebrandt & Goebel, 1994). Vem daí a grande utilidade da taxonomia polifásica que, conforme destacado acima, busca este consenso por meio da descrição das características dos membros deste grupo.

A taxonomia do rizóbio sofreu contínuas modificações, como reflexo do avanço desta ciência, passando por revisões periódicas a medida que os estudos ecológicos mostravam a ocorrência significativa de novos grupos de bactérias. A medida que estes estudos taxonômicos se desenvolvem, é importante correlacionar as diferenças taxonômicas com características fenotípicas, sendo esta a visão do subcomitê sobre a taxonomia de *Rhizobium* e *Agrobacterium*. Uma espécie de manual de padrões de procedimento na descrição de novos gêneros e espécies de bactérias formadoras de nódulos em raízes e caule foi proposto por este subcomitê e publicado por Graham et al. (1991).

O subcomitê considera que descrição de um novo gênero ou espécie deve ser baseada em organismos independentemente isolados, de regiões geográficas distintas, com a descrição da espécie publicada no International Journal of Systematic Bacteriology, e que a estirpe padrão seja depositada numa coleção de culturas internacionalmente reconhecida, disponível a outros pesquisadores. Para a estirpe padrão e isolados representativos, as seguintes características devem ser consideradas: desempenho simbiótico baseado em parâmetros selecionados; características morfológicas e culturais; grau de homologia DNA:DNA; hibridização RNAr:DNA e análise do RNAr 16S; RFLP e

MLEE. Estes novos conceitos taxonômicos e filogenéticos aplicados aos estudos de diversidade do rizóbio levaram à substituição do critério de especificidade-hospedeira por outros baseados no conceito de taxonomia polifásica.

A seguir serão descritos os principais métodos fenotípicos e genotípicos utilizados nos estudos de diversidade dos diferentes grupos de rizóbio.

2.3.3. Métodos fenotípicos:

Dentre os métodos fenotípicos Estão incluídos todos aqueles não direcionados às moléculas de DNA ou RNA, onde, conseqüentemente, estão as técnicas quimiotaxonômicas, conforme classificação proposta por Vandamme et al. (1996). Estas técnicas decorrem da aplicação de métodos analíticos na coleta de informações sobre os vários constituintes da célula, visando a classificação bacteriana (Vandamme et al., 1996).

2.3.3.1. Métodos fenotípicos clássicos:

Os métodos fenotípicos clássicos ou tradicionais são usados nos protocolos de identificação da maioria dos laboratórios de microbiologia. Compreendem dados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, os quais, individualmente, são considerados irrelevantes como parâmetros de relacionamento genético, mas, coletivamente, fornecem informações descritivas que permitem a distinção de diferentes taxa. As estirpes de *Rhizobium* diferem, significativamente, no metabolismo de carbono e na utilização de diferentes substratos. A capacidade de utilizar glucose, sacarose, lactose, frutose, arabinose, succinato ou adipato pode servir como um teste diagnóstico na diferenciação das espécies de rizóbio (Graham et al., 1991). O tempo de geração em meio contendo extrato de levedura, manitol e sais minerais (Vincent, 1970), denominado YMA (yeast-manitol-agar) distingue os diferentes gêneros de rizóbio, sendo de 2 a 4 horas para

Rhizobium, 6 a 10 horas para *Bradyrhizobium* e apresentando valores intermediários para *Mesorhizobium*. Como consequência, o tamanho das colônias em meio sólido varia de 2 a 4mm, após 3 a 5 dias de incubação, para *Rhizobium* e *Mesorhizobium* e até 1 mm após 5 a 7 dias, para *Bradyrhizobium*. Outras características importantes a serem observadas como padrões fenotípicos mínimos para a descrição de novas espécies de rizóbio e recomendadas pelo Subcomitê Internacional em Taxonomia de *Rhizobium* e *Agrobacterium* podem ser consultadas em Graham et al. (1991).

É importante ressaltar que há uma grande variabilidade quando se analisa estas características, de modo que a possibilidade de análise do maior número possível de dados culturais, morfológicos e outras propriedades fenotípicas, como: tolerância a antibióticos, serologia, análise de lipopolissacarídeos celulares, padrões proteicos, composição das paredes celulares, etc., deve ser considerada, de acordo com a disponibilidade de cada laboratório (Vandamme et al., 1996). Atualmente, há muitos programas de computador disponíveis para se proceder a análise numérica destes dados, facilitando a sua interpretação.

Inúmeros trabalhos têm sido publicados com base em características fenotípicas visando a caracterização de diferentes populações rizóbio que nodulam as mais diversas hospedeiras (Kuykendall & Elkan, 1976; Fuhrmann, 1990; Shisdhido & Pepper, 1990; Moawad e Bohlool, 1992; Batzli et al., 1992; Leung et al., 1994; van Berkum et al. 1995; Martins et al., 1997; Sweelim et al., 1997; Ramirez et al., 1997a,b; Xavier et al., 1998). Muitas destas características fenotípicas são estudadas com o objetivo, não somente de caracterização mas, de verificar a provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais prevalentes no ecossistema para o qual se procede a seleção do rizóbio-inoculante. Além disso, busca-se correlacionar dados de diversidade metabólica com os de eficiência simbiótica, uma vez que aquela deve refletir a

diversidade dos mecanismos de controle das interações simbióticas entre espécies de rizóbio e as diferentes leguminosas (Kuykendall & Elkan, 1976; Batzli et al., 1992). Tolerância a diversas condições de salinidade (Swellim et al., 1997), pH (Graham et al., 1992; Swellim et al., 1997), temperatura (Mercante, 1993), antibióticos (Xavier et al., 1998), etc, são características analisadas “in vitro”, tentando-se estabelecer correlações com a eficiência simbiótica dos isolados a nível de campo.

Em termos ecológicos, a análise de dados fenotípicos tem aplicabilidade restrita, devido ao grande número de interações, tanto bióticas como abióticas, que ocorrem no sistema solo, especialmente quando se considera os microagregados onde se alojam as populações bacterianas e a influência do ambiente rizosférico. Estas interações explicam a dificuldade de estabelecimento de correlações entre os resultados obtidos em condições de laboratório e de campo. No entanto, em termos taxonômicos, após a introdução dos métodos de taxonomia numérica, os quais permitiram o agrupamento de um grande número de isolados com características fenotípicas semelhantes, a análise destes dados tornou-se imprescindível. Atualmente, apesar da avalanche de dados genotípicos na literatura, a determinação da correlação destes com as características fenotípicas tornou-se uma das condições essenciais para a descrição de novos gêneros e espécies bacterianas. Além disso, estas análises de agrupamento facilitam o estudo comparativo do comportamento dos diferentes grupos, tanto intraespecíficos como interespecíficos, quanto a diferentes características em condições de campo.

2.3.3.2. Análise numérica de dados fenotípicos:

O primeiro grande impulso na sistemática bacteriana foi dado pela introdução e aplicação dos novos conceitos taxonômicos e técnicas, no final dos anos 50 e início dos anos 60. A classificação auxiliada por computadores, ou taxonomia numérica, foi

primeiramente aplicada a microrganismos no final dos anos 50, tendo surgido paralelamente ao desenvolvimento dos computadores. O objetivo inicial era distribuir as estirpes bacterianas em grupos homogêneos ou taxoespécies, usando dados fenéticos e usar os resultados quantitativos, gerados nos diferentes agrupamentos, para implementar protocolos de identificação (Bull et al., 1992). Os dados fenotípicos foram os primeiros a serem analisados por meio de comparações baseadas em análise numérica auxiliada por programas computacionais específicos (Vandamme et al., 1996). Este tipo de análise permitiu a manipulação simultânea de um grande número de dados referentes a um grande número de isolados. Inicialmente são calculadas matrizes mostrando o nível de similaridade entre cada par de isolados e, a seguir, baseados em análise de agrupamento, são construídos dendrogramas os quais indicam o nível de relacionamento entre os diferentes grupos. Esse grande número de dados que decorrem, obviamente, de um grande número de informações genotípicas, tem mostrado, por comparação com outras abordagens taxonômicas, a relevância taxonômica da análise numérica baseada em grande número de informações fenotípicas (Vandamme et al., 1996).

Na classificação bacteriana, estes métodos têm sido extensivamente utilizados em estudos de diversidade de um grande número de espécies em diferentes ambientes (Goodfellow et al., 1992; Lipski et al., 1992; Prieto et al., 1992; Riedel & Britz, 1993; Dykes et al., 1994). Zhang et al. (1991) demonstrou, através de análise fenotípica numérica, que os isolados de rizóbio obtidos de *Acacia senegal* e *Prosopis chilensis*, no Sudão, são bastante diversos e podem ser classificados em pelo menos oito grupos distintos das espécies até então descritas. De Lajudie et al. (1994), num estudo de taxonomia polifásica de 52 isolados de *Acacia* spp e *Sesbania* spp do Senegal, procederam, entre outras análises fenotípicas e genotípicas, à análise numérica baseada na utilização de 147 compostos orgânicos, tendo encontrado concordância entre estes agrupamentos e os

obtidos baseados em características genotípicas. Os estudos de taxonomia numérica de 240 características fenotípicas serviram como base para a proposta do gênero *Sinorhizobium* por Chen et al. (1988). Recentemente para a nova espécie, *Sinorhizobium medicae* (Rome et al., 1996), descrita de acordo com o conceito de taxonomia polifásica, utilizando dados genotípicos diversos e análise numérica baseada em 63 características fenotípicas, foi encontrada boa correlação entre estes dados e os derivados da análise genotípica.

A caracterização de um grande número de isolados através da análise fenotípica numérica é, muitas vezes, utilizada como critério de agrupamento para a seleção inicial de isolados representativos que, posteriormente, serão avaliados quanto as características simbióticas e por métodos genotípicos, mais complexos e dispendiosos. Batzli et al. (1992) analisou inicialmente 182 isolados quanto à utilização de carboidratos, resistência à antibióticos, tolerância à NaCl e resposta à níveis de pH. Os isolados foram agrupados em 37 grupos distintos por taxonomia numérica, sendo que isolados representativos destes agrupamentos foram então selecionados para análise quanto ao padrão de proteínas, tempo de geração e resposta simbiótica.

2.3.3.3. Análise de isoenzimas:

O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma determinada espécie, como resultado da presença de um ou mais genes codificando para cada uma destas formas (Selander et al., 1986). Este método detecta os diferentes alelos de genes diagnósticos analisando a mobilidade eletroforética das enzimas que codificam. O princípio básico da técnica reside no uso de eletroforese em gel de amido e na visualização do produto enzimático por métodos bioquímicos. Os padrões eletromórficos produzidos para um certo número de enzimas

são identificados como fenótipos multilocus ou tipos eletroforéticos (Electrophoretic Types - ET's), os quais refletem o genótipo cromossomal. A difusão do uso desta metodologia deu-se através do desenvolvimento de metodologias eficientes para a visualização do produto enzimático, e da aplicabilidade imediata encontrada em diversas áreas da Biologia (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Os padrões de isoenzimas, obtidos por eletroforese, tem sido amplamente aplicado nos estudos da diversidade genotípica cromossomal e da estrutura genética de populações bacterianas do solo, inclusive dentro do gênero *Rhizobium* (Denny et al., 1988; Piñero et al., 1988; Harrison et al., 1989; Young, 1985; Young & Wexler, 1988; Eardly et al., 1990; Demezas et al., 1991; Souza et al., 1994; Barrera et al., 1997). Embora as técnicas baseadas nas metodologias de amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação da Polimerase em Cadeia) tenham obtido grande popularidade nos últimos anos, a maioria dos dados disponíveis sobre a diversidade e a estrutura genética de populações bacterianas são baseados em isoenzimas.

Em rizóbio, Martínez-Romero & Caballero-Mellado (1996) apresentam um levantamento atualizado e crítico dos estudos realizados, e concluem que, em geral, as estimativas de relacionamento genético entre estirpes bacterianas obtidas por este método apresentam boa correlação com os estudos baseados em hibridização de DNA, embora possam estar subestimadas, quando comparadas com os dados de sequenciamento.

2.3.3.4. Métodos sorológicos:

A sorologia tem sido frequentemente utilizada, há mais de 70 anos, para a caracterização de populações rizobianas no solo (Means et al., 1964; Fuhrmann, 1990; Moawad & Bohlool, 1992; Leung et al., 1994; Ramirez et al., 1997a). Os métodos

sorológicos de caracterização são baseados na presença de variabilidade nos constituintes antigênicos das células bacterianas. Diferentes tipos de reações serológicas podem ser utilizadas, incluindo os testes simples de aglutinação e precipitação ou reações que exigem um ou mais componentes adicionais, como ELISA, por exemplo (Vandamme et al., 1996). Estes métodos são utilizados com diferentes finalidades, tais como: fornecer uma visão superficial da diversidade das populações de rizóbio nativas em ecossistemas específicos; permitir o levantamento da ocorrência e distribuição de bactérias antigenicamente relacionadas entre diferentes estados, países e continentes; e estudar a ecologia destas bactérias no solo. A aplicação taxonômica dos estudos sorológicos é bastante limitada, uma vez que estirpes de rizóbio, mesmo possuindo propriedades antigênicas similares, podem ser bastante diversas com respeito à outras características fenotípicas e genotípicas. Assim, têm sido também analisadas outras propriedades dentro dos diferentes grupos sorológicos dos isolados, tais como: resistência a antibióticos; características morfofisiológicas; indução de clorose foliar (em *Bradyrhizobium*); eficiência na fixação de nitrogênio; evolução de hidrogênio, entre outras (Fuhrmann, 1990; Moawad & Bohlool, 1992; Ramirez et al., 1997a).

Os dados sorológicos, de modo geral, têm sido utilizados como uma ferramenta adicional na caracterização de diferentes populações (Leung et al., 1994; van Berkum et al., 1995; Ramirez et al., 1997b), e correlações entre estes dados e dados genotípicos podem auxiliar no entendimento da sua diversidade e ecologia.

2.3.3.5. Outros métodos quimiotaxonômicos:

A análise de proteínas totais, por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio - poliacrilamida (SDS PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), também tem sido utilizada para a caracterização da diversidade em isolados bacterianos,

sendo considerado um método bastante confiável para comparação de grandes grupos de estirpes muito proximamente relacionadas (Vandamme et al., 1996). Moreira et al. (1993), através desta metodologia, comparou 180 isolados de rizóbio de crescimento rápido e lento, obtidos de nódulos de leguminosas tropicais da região Amazônica e Mata Atlântica, com diferentes espécies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*. Entre os isolados de crescimento rápido, os autores identificaram muitos agrupamentos distintos das espécies até então descritas. Este método foi também utilizado, entre outros, na caracterização de gênero *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988) e na determinação das relações filogenéticas entre *M. tianshanense* e outros rizóbios (Tan et al., 1997), ou mesmo em um estudo de diversidade de rizóbio que nodula *Robinia pseudoacacia* L. (Batzli, et al., 1992).

A espectrometria de massa após a pirólise é um método sofisticado de análise da composição química total das células bacterianas. É uma metodologia sensível às condições de crescimento das culturas, uma vez que faz a análise dos ácidos graxos celulares (Jarvis & Tighe, 1994) mas sob condições padronizadas e constitui-se num método rápido, altamente reproduzível e universal. É adequado para a determinação da integridade taxonômica de grupos bacterianos classificados através de outras metodologias (Barrera et al., 1997). O método foi utilizado para a discriminação entre estirpes de *Bradyrhizobium* e *R. meliloti* (Goodrace et al., 1991; Kay et al., 1994). Numa análise de diversidade de *Bradyrhizobium* utilizando as técnicas de isoenzimas e pirólise, Barrera et al. (1997) encontraram uma excelente concordância entre os dados obtidos com as duas metodologias, sendo que dentre 13 grupos eletroforéticos distintos (ET's), 10 corresponderam aos grupos PyMS (Curie point pyrolysis mass spectrometry).

2.3.4. Métodos genotípicos:

O desenvolvimento das abordagens moleculares conduziu a diferentes tendências dentro da sistemática bacteriana, tais como, por exemplo a elucidação de relações filogenéticas, estudos descritivos combinando informações filogenéticas e fenotípicas e diversos estudos ecológicos com o objetivo de levantar a diversidade de vários grupos de microrganismos no solo (Stackebrandt & Goebel, 1994). Vandamme et al. (1996) apresentam uma revisão das demais técnicas de interesse taxonômico, sendo que Stackebrandt & Goebel (1994) discutem o uso das técnicas de sequenciamento e homologia de DNA na taxonomia bacteriana.

Neste tópico serão abordadas as técnicas mais diretamente relacionadas aos estudos desenvolvidos nesta tese, dentro de um enfoque ecológico, concentrado na análise do DNA ribossomal.

2.3.4.1. Estudos baseados no DNA ribossomal:

Os ribossomos procarióticos são constituídos de cerca de 50 tipos diferentes de proteínas e de três moléculas de RNA com diferentes tamanhos referidas como RNAr 5S, 16S e 23S. A molécula do RNAr 16S contém cerca de 1.540 resíduos de nucleotídeos e forma, juntamente com aproximadamente 20 proteínas, a subunidade menor (SSU), 30S; a molécula do RNAr 23S (2.900 resíduos de nucleotídeos), juntamente com a do RNAr 5S (120 resíduos de nucleotídeos) e aproximadamente 20 proteínas formam a subunidade maior, 50S. Estas duas subunidades juntas formam o ribossomo 70S funcional, que catalisa a síntese proteica. Os genes que codificam (operons) para o RNAr (*rrn*) têm sido extensivamente estudados para muitas espécies bacterianas, sendo que o número de

operons varia de uma (em micoplasmas) a doze cópias (em bacilos) por cromossomo (Rosado et al., 1997). Em rizóbio, tem sido detectadas de uma a três cópias, sendo uma em *B. japonicum* e em *R. tropici* e três em *S. meliloti*, *R. galegae*, *R. leguminosarum* e *R. etli* (Haukka, 1997).

Assim como outros genes que ocorrem em múltiplas cópias no genoma, os genes ribossomais estão sujeitos a um processo de homogeneização, o que significa que todas as cópias tendem a serem similares umas às outras. No entanto, recentes estudos têm detectado pequenas variações entre as cópias destes genes, ou seja, ocorrem variações alélicas, referidas como microheterogeneidade, entre os genes do 16S de várias espécies bacterianas, inclusive rizóbio (Haukka et al., 1996). Neste caso, mais uma vez surge o questionamento quanto ao uso dos dados de sequenciamento do RNAr 16S para a separação de espécies muito proximamente relacionadas. Neste limite, a quantidade de seqüências úteis diminui, e a ocorrência de transferência horizontal e recombinação genética entre estas cópias heterogêneas interrompem o padrão filogenético (Haukka et al., 1996).

Vale a pena ressaltar a sugestão, apresentada por Vandamme & Ludwig (1994, citados por Vandamme et al., 1996), de que para se obter árvores filogenéticas mais confiáveis, deve-se escolher grupos de isolados semelhantes e não apenas a estirpe referência. Os autores destacam que é importante não restringir a análise aos taxons mais proximamente relacionados, mas, incluir grupos de organismos aparentemente não relacionados. Estes procedimentos diminuem o efeito de pequenas diferenças características de estirpe e não da espécie.

As moléculas das diferentes espécies de RNAr são particularmente importantes nos estudos de ecologia microbiana, sendo que são consideradas cronômetros moleculares nos estudos de evolução, pois preenchem todos os requisitos que definem

um marcador filogenético (Rosado et al., 1997): (1) os RNA ribossomais estão presentes e têm a mesma função em todos os microrganismos; (2) eles se originaram de um ancestral comum, portanto são homólogos; (3) suas seqüências de nucleotídeos são altamente conservadas em algumas regiões e possuem regiões variáveis; (4) as moléculas do 16S e 23S RNAr são relativamente grandes e contém suficiente seqüências informativas para permitir comparações estatisticamente significativas; (5) a estrutura primária destas moléculas possui sítios de evolução independente e, conseqüentemente, contém suficiente número de regiões variáveis para permitir a discriminação entre diferentes moléculas; (6) um grande número de seqüências está disponível via base de dados pela internet, permitindo o alinhamento de seqüências e a identificação das regiões distintas. O fato destas moléculas possuírem sítios de rápida e outros de lenta evolução permite que se avalie as relações filogenéticas, tanto entre organismos muito proximamente relacionados, quanto entre os filogeneticamente muito distantes.

A caracterização da seqüência do RNAr 16S tem sido amplamente utilizada em estudos evolucionários, taxonômicos e ecológicos, não apenas para definir taxas mas, também, para detectar quais taxas estão presentes (Fox et al., 1992; Olsen et al., 1994). A amplificação direta, via PCR, do RNAr 16S presentes em amostras de solo tornou possível o estudo da diversidade microbiana sem o cultivo dos microrganismos (Ward et al., 1990). Comparações entre as seqüências de nucleotídeos, completas ou parciais, do RNAr 16S têm sido amplamente utilizadas para avaliar relações filogenéticas entre muitas espécies de *Rhizobium* (Jarvis et al., 1992; Lucas et al., 1995; van Berkum et al., 1996; Barrera et al., 1997).

As moléculas do RNAr 23S são bem maiores do que as do RNAr 16S, contendo mais informação genética o que pode ser muito útil em estudos filogenéticos (Ludwig et al., 1992), embora o banco de dados de 23S seja, ainda, bem mais restrito, dificultando a

comparação de novas seqüências. Tesfaye et al. (1997) amplificaram por PCR uma região hipervariável do DNAr 23S de *Rhizobium* e determinaram as relações filogenéticas entre várias estirpes, através da comparação entre suas seqüências de nucleotídeos. As variações nas seqüências do DNAr 23S estudadas foram consistentes com as relações filogenéticas determinadas pela especificidade na nodulação de diferentes hospedeiras e/ou análise das seqüências do DNAr 16S. Neste estudo, os autores distinguíram entre estirpes de *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Bradyrhizobium*, sendo que os taxons representados por *R. leguminosarum* bv *trifolii*, *R. meliloti* e *R. etli* foram, claramente, mais relacionados uns aos outros do que às estirpes de *B. japonicum*, consistente com a teoria de origem evolucionária distinta ou divergência ancestral destes dois gêneros (Sprent, 1994). Além disso, através da análise da estrutura secundária da molécula do DNAr 23S, os autores detectaram seqüências variáveis nas regiões chamadas de D (hélices 55-59, numeração em *E. coli*) e E (hélice 63), as quais podem servir para diferenciar espécies particulares e/ou estirpes por apresentarem características distintivas. Podem ser construídas sondas específicas para estas regiões e usadas como ferramenta para análise de populações de *Rhizobium* no campo.

A estrutura primária da molécula do RNAr 16S é altamente conservada e as espécies com 70% ou mais de homologia do DNA, usualmente possuem mais de 97% de identidade em suas seqüências. Esta diferença de 3% ou 45 nucleotídeos, não está distribuída ao acaso ao longo da estrutura primária da molécula, mas está concentrada principalmente nas chamadas regiões hipervariáveis (Stackebrandt & Goebel, 1994). Alguns autores defendem, como medida da distância filogenética entre estirpes, o estudo das diferenças em similaridade apenas nestas regiões. No entanto, há vários argumentos contrários a esta escolha, uma vez que é substancial a quantidade de nucleotídeos

diferentes não concentrados nestas regiões (Stackebrandt et al., 1992) e, por omissão, se poderiam ser perdidas informações que, em termos estatísticos, já são bastante escassas. Em segundo lugar, as regiões hipervariáveis são específicas de cada taxon, e precisam ser determinadas, para cada novo organismo, pelo sequenciamento completo da molécula.

A análise de seqüências muito curtas tem uma influência negativa na estabilidade da árvore filogenética, mas se, devido a alguma limitação, o número de nucleotídeos a ser analisado tiver que ser reduzido a algumas centenas, deve-se tomar muito cuidado na escolha da região a ser analisada, de modo a se obter o mesmo grau de similaridade dado pelo completo sequenciamento da molécula. Stackebrandt & Goebel (1994) mostram uma tabela, onde os valores de similaridade obtidos para determinadas seqüências podem apresentar até 10 pontos percentuais de diferença em relação ao grau de similaridade obtido pelo sequenciamento total. No entanto, a seleção prévia criteriosa de seqüências menores adequadas, no entanto, facilita o trabalho de sequenciamento, sendo que, em rizóbio, uma região de 260pb do 16S rDNA, amplificada pelos primers Y1 e Y2 (Young et al., 1991), tem sido bastante útil nos trabalhos de diversidade (Haukka et al., 1996), por conter uma parte relativamente variável da molécula, com alta densidade de informações. O uso desta região amplificada nos trabalhos de sequenciamento permitiu determinar, com um bom nível de precisão, as relações filogenéticas entre as diferentes espécies (Eardly et al., 1992; Jarvis et al., 1992; Lucas et al., 1995). No entanto, em *R. galegae*, foram obtidas diferentes posições filogenéticas com as seqüências parciais ou com a seqüência total do RNAr 16S (Nour et al., 1994; Willems & Collins, 1993). Esta inconsistência pode ser atribuída à natureza altamente conservada das seqüências da subunidade menor aliada a eventos de recombinação entre genes divergentes (Eardly et al., 1996).

Os genes ribossomais de algumas espécies ou estirpes contém os chamados elementos de inserção (IVS – intervening sequence), principalmente nos genes que codificam para o RNAr 23S, sendo a ocorrência destes IVS restritos a determinadas regiões da molécula de DNA (Haukka, 1997). A presença de duas IVS (IVS I e IVS II) foram detectadas em rizóbio, e a possibilidade de utilização destas seqüências em estudos ecológicos, através da construção de primers específicos é bastante promissora (Selenska-Pobell & Evguenieva-Hackenberg, 1995; Selenska-Pobell et al., 1997). Uma seqüência de inserção de 72 nucleotídeos foi encontrada pela primeira vez nos genes do RNAr 16S em *R. tropici* (Willems & Collins, 1993). A diferença no tamanho do gene provocada por esta inserção serve para o reconhecimento de estirpes diferentes, após amplificação por PCR da região que a contém e análise em gel de agarose (Linton et al., 1994).

Young & Haukka (1996) destacam diversas limitações no uso da subunidade menor do RNAr (SSU rRNA) em estudos filogenéticos e taxonômicos. A primeira delas seria a ocorrência de recombinação dos genes ribossomais entre espécies diferentes, o que afeta uma das condições necessárias para o estabelecimento de filogenias, que é a inexistência de transferência genética interespecífica nesta região, assegurando a evolução independente das diferentes linhagens. Outro tipo de recombinação, entre os genes do RNAr 16S e outros genes, foi verificada em *Rhizobium leguminosarum* e *R. etli* por Eardly et al. (1995), onde diferenças significativas no sequenciamento da molécula do 16S rDNA não refletem necessariamente grandes divergências no genoma total, avaliado por MLEE. Como o RNAr 16S é uma molécula altamente conservada, não é útil para discriminar espécies muito proximamente relacionadas, onde pode haver uma identidade de seqüências, especialmente no sequenciamento parcial. Os autores destacam, ainda, o problema da heterogeneidade nas seqüências entre espécies e mesmo dentro de uma

mesma espécie. Isto tem se tornado cada vez mais evidente, a medida que outros isolados, ou mesmo vários isolados de uma mesma espécie, além das estirpes padrão, vão sendo sequenciados. Finalmente, um problema técnico foi verificado no uso desta metodologia, que é a detecção de alguns erros em seqüências presentes na base de dados do EMBL, provocados por uma série de fatores listados por Vandamme et al. (1996).

Apesar de todas estas limitações, o desenvolvimento dos métodos rápidos de PCR e sequenciamento tem consolidado o papel dos genes ribossomais na filogenia bacteriana. Os genes que codificam para o RNAr 16S são os mais populares nestes estudos, devido ao seu tamanho adequado para as análises de sequenciamento e existência de um banco de dados mais completo do que o disponível para a molécula de RNAr 23S. Segundo Young & Haukka (1996), as filogenias baseadas no RNAr 16S são de modo geral corretas, embora não em todos os detalhes. Muitos trabalhos têm mostrado a utilidade das informações provenientes do sequenciamento do RNA além dos estudos filogenéticos (Young et al., 1991; Eardly et al., 1992; Segovia et al., 1993; Willems & Collins, 1993), no desenho de sondas e “primers” que podem ser específicos a nível de gênero, espécie ou mesmo estirpe (Ludwig & Scleifer, 1994; Kirchhof et al., 1996; Tesfaye et al., 1997). De modo geral, mesmo se consideradas as limitações, esta metodologia confirma os resultados obtidos por uma série de outras abordagens, inclusive de taxonomia polifásica com um grande número de estirpes (Vandamme et al., 1996), e seu valor parece inquestionável.

2.3.4.2. A reação de polimerase em cadeia:

Torna-se importante enfatizar a importância da tecnologia da reação da polimerase em cadeia (PCR – Polymerase Chain Reaction) nos diferentes estudos de ecologia e

sistemática bacteriana. Nos últimos anos poucas tecnologias provocaram um impacto tão profundo na biotecnologia, quanto o PCR, inicialmente descrito por Mullis & Faloona (1987). A técnica do PCR baseia-se na repetição cíclica da extensão enzimática de “primers” (iniciadores). Estes “primers”, pequenas seqüências de DNA, hibridizam-se em dois extremos opostos da fita de DNA que serve como molde e a amplificação envolve repetições cíclicas de altas temperaturas, geralmente em torno de 94°C, necessárias para a denaturação do DNA, seguidas de uma temperatura mais baixa, entre 37 e 60°C, para possibilitar a hibridização dos “primers” e uma temperatura intermediária que permita a extensão da cópia complementar da fita de DNA a partir do extremo 3', ponto de hibridização dos “primers”. Esta técnica resulta na amplificação enzimática *in vitro* de uma seqüência alvo de DNA.

A relativa simplicidade da tecnologia mudou radicalmente a forma de se trabalhar com Genética e Biologia Molecular comparada com a utilizada alguns anos atrás. O próprio autor da metodologia, ao descrever o processo de sua invenção, espanta-se de que o método não tenha sido descoberto anteriormente, mesmo cerca de 15 anos depois de estarem disponíveis todos os elementos necessários para sua implementação: Taq polimerase, disponibilidade de dNTP's, etc. (Mullis, 1990).

É fácil de compreender o impacto causado pelo PCR uma vez que a técnica se aplica a um dos problemas fundamentais em biotecnologia que é a busca de seqüências gênicas de interesse. Ao se procurar uma simples seqüência gênica, de, digamos, 1.000 nucleotídeos entre cerca de 100.000 genes, em um genoma de aproximadamente 3 bilhões de nucleotídeos, mesmo uma quantidade em torno de 3 *ug* de DNA poderá conter apenas uma cópia desta seqüência ou gene. Ou seja, ela estará altamente diluída e misturada com um grande número de moléculas com propriedades físico-químicas

semelhantes, o que torna virtualmente impossível a obtenção de grandes quantidades da molécula de interesse, purificada pelos procedimentos padrões de separação.

Antes do advento do PCR, a clonagem molecular era a única alternativa para superar estas dificuldades. Este procedimento requer a construção de vetores e sondas, por uma série de etapas demoradas, incluindo a restrição do DNA, ligação a vetores, transformação bacteriana, cultivo e plaqueamento, seguido de detecção dos clones, usualmente através de sondas, isto sem citar as etapas de subclonagem, etc. Com o PCR, após cerca de 30 ciclos de amplificação e menos de 2 horas, a quantidade de DNA alvo é aumentada milhares de vezes, e, após a separação dos produtos, por eletroforese em gel e coloração adequada, estes podem ser visualizados a olho nu. Pode-se, então, proceder diversos tipos de manipulação deste DNA dependendo do tipo de problema a ser resolvido, tendo sido já ressaltada sua importância nos estudos de sequenciamento, os quais antigamente dependiam destas trabalhosas etapas de clonagem. Felice & Alshinawi (1996) apresentam uma descrição simplificada dos princípios, componentes e aplicações desta tecnologia, sendo que mais detalhes podem ser encontrados em diversos livros como o de Innis et al. (1990).

Em estudos de diversidade de microorganismos, a técnica de PCR é utilizada em várias metodologias, como a análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), o polimorfismo das sequências espaçadoras intergênicas (IGS – intergene sequences) do DNA ribossômico, o DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – Eletroforese em gel de gradiente denaturante), o TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis – Eletroforese em gel de gradiente de temperatura), o PCR-SSCP (Single-Strand-Conformation Polymorphism – Polimorfismo conformacional de DNA de fita simples através de PCR), o PCR de seqüências repetitivas de DNA (rep-PCR usando primers REP, ERIC ou BOX), o PCR

com primers aleatórios (RAPD, AP-PCR) e o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Algumas destas técnicas serão descritas, a seguir, conforme sua importância nos estudos de diversidade de rizóbio.

2.3.4.3. Técnicas de “fingerprinting” do DNA baseadas em PCR:

A mais divulgada delas é a técnica de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), que consiste na amplificação do DNA utilizando “primers” aleatórios, que envolve o uso de um primer geralmente composto de 10 nucleotídeos, a baixa temperatura de hibridização ou, como é mais conhecida atualmente, de anelamento (36°C). Os produtos são diretamente analisados em um gel de agarose colorido com brometo de etídio (Williams et al., 1990). A técnica de AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction), envolve o uso de “primers” mais longos, de 20 a 34 nucleotídeos de comprimento, em reações de anelamento a baixa temperatura, seguidas de reações a altas temperaturas de anelamento (60°C). Os produtos do AP-PCR são marcados com $\infty^{32}\text{P}$, nos últimos ciclos de reação, submetidos a eletroforese e visualizados por autoradiografia (Welsh & McClelland, 1990). Estas técnicas envolvem a amplificação de regiões desconhecidas do DNA genômico com primers arbitrariamente construídos, produzindo padrões complexos de bandas que “identificam” o organismo. Estes estudos não requerem que se conheça previamente as seqüências do organismo a ser estudado.

Em rizóbio estas técnicas foram utilizadas nos estudos de diversidade por Harrison et al. (1992); Kay et al. (1994); Leung et al. (1994); van Rossum et al. (1995); Richardson et al. (1995), Selenska-Pobell et al. (1996); Paffetti et al. (1996); Sá et al. (1997). Harrison et al. (1992) foram os primeiros a utilizar o método de RAPD para caracterizar estirpes de *R. leguminosarum*. Estes autores testaram 21 “primers”, buscando a identificação de isolados de rizóbio, sendo que um deles (SPH1) gerou polimorfismo suficiente para

discriminar 11 entre 12 isolados. Este “primer” foi posteriormente utilizado para caracterização de estirpes de *Bradyrhizobium* (van Rossum et al., 1995). Há uma boa correlação entre os dados de relacionamento genético obtidos entre diferentes estirpes por MLEE e RAPD (Leung et al., 1994).

Nos estudos de diversidade de rizóbio, a análise combinada de seqüências de RNAr amplificadas por PCR e digeridas, a seguir, com enzimas de restrição de corte freqüente (sítios de 4 pb) gerando padrões de RFLPs, tem sido extensivamente utilizada, metodologia que passou a ser denominada ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado). Este tipo de análise foi inicialmente utilizado por Laguerre et al. (1994), sendo que a topologia das árvores filogenéticas, obtidas por mapeamento dos sítios de restrição e por alinhamento de seqüências, apresentam-se muito bem relacionadas, mostrando que o método é uma ferramenta poderosa para a estimativa rápida de relações filogenéticas (Lindström et al., 1998). Esta metodologia foi aprimorada através da construção de uma base de dados de sítios de restrição nos genes que codificam para o DNAr 16S na família *Rhizobiaceae* (Laguerre et al., 1997). A análise dos mapas dos sítios de restrição (MRSP) do RNAr 16S é mais confiável porque elimina o problema da interpretação dos fragmentos de restrição que possuem tamanho similar, mas que correspondem a diferentes sítios de restrição. Vinuesa et al. (1998) utilizou esta metodologia para a caracterização de isolados de *Bradyrhizobium* que nodulam diversas leguminosas arbóreas.

Uma modificação desta técnica consiste na análise de IGS do operon 16S-23S. Esta região foi estudada, em isolados de rizóbio, após amplificação com “primers” específicos, gerando um fragmento de cerca de 1.350 pb digerido, a seguir, com enzimas de restrição (Nour et al., 1994; Paffetti et al., 1996). Os resultados obtidos por Paffetti et al. (1996), em uma população de 96 isolados de *R. meliloti*, revelaram um baixo nível de

polimorfismo com elevado grau de homogeneidade no tamanho das bandas amplificadas, e três padrões distintos de restrição de IGS. Jensen et al. (1993) estudaram, através desta metodologia, cerca de 300 estirpes pertencentes à diferentes gêneros de bactérias, concluindo que o nível de variabilidade obtido na análise de restrição das IGS não é suficiente para discriminação intraespecífica. Já Vinuesa et al. (1998), num estudo envolvendo 9 isolados de leguminosas arbóreas e diversas estirpes de referência, observaram que a análise de agrupamento dos RFLPs, obtidos de IGS após a digestão com três enzimas de restrição, revelaram 6 agrupamentos distintos, enquanto que por ARDRA, com 4 enzimas, apenas 3 haviam sido detectados. Neste estudo os autores procederam uma análise conjunta dos dados provenientes da análise restrição das IGS e do 16S rDNA, uma vez que estas se constituem em regiões genômicas contíguas. A partir desta análise foi possível obter um agrupamento de consenso, dividindo as estirpes nos mesmos 6 genótipos distintos definidos pela análise de IGS, mas em concordância com os resultados de ARDRA.

Os métodos de REP-PCR (repetitive extragenic palindromic sequences – PCR, sequências palindrômicas extragênicas repetitivas), ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus– PCR, sequências intergênicas de consenso enterobacterianas) e BOX-PCR baseiam-se na amplificação de seqüências repetitivas (rep-elements, elementos repetitivos) no genoma bacteriano (Versalovic et al., 1994). Estas três famílias de seqüências repetitivas têm sido estudadas em maiores detalhes, correspondendo a 35-40 pb na seqüência REP; 124-127 pb para a ERIC e 154 pb no elemento BOX, o qual consiste de três subunidades (boxA, boxB e boxC). Quando um destes elementos repetitivos é detectado dentro de uma distância amplificável, durante a reação de polimerase em cadeia, é gerado um produto de PCR de tamanho característico, de modo que pode-se obter um padrão do tipo impressão digital (fingerprinting) do genoma em um

gel. Maiores detalhes sobre a metodologia e referências originais podem ser encontrados em Versalovic et al. (1994).

O método é uma poderosa ferramenta para estudar a diversidade genética intraespecífica e a nível de estirpe, fornecendo uma análise complementar à caracterização prévia por outras metodologias. A análise da impressão digital, gerada a partir de genomas distintos, tem sido usada para separação de estirpes muito proximamente relacionadas de *B. japonicum* (Judd et al., 1993; Vinuesa et al., 1998), *R. tropici* (van Berkum et al., 1994), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Leung et al., 1994), *R. galegae* (Selenska-Pobell et al., 1995) e *R. meliloti* (de Bruijn, 1992; Rossbach et al., 1995). Estas metodologias foram utilizadas por Laguerre et al. (1997) para detectar um maior nível de polimorfismo entre tipos genômicos separados pela análise de restrição do 16S rDNA. Neste trabalho, 44 isolados de rizóbio de *Astragalus*, *Oxytropis* e *Onobrychis* analisados foram distribuídos em 14 tipos baseados no RNAr 16S e em 34 grupos REP, utilizando primers para REP e ERIC, confirmando sua alta capacidade para detectar heterogeneidade genética. Os padrões específicos obtidos para cada estirpe podem ser armazenados em uma base de dados e analisados, usando programas específicos para comparação, tais como GELCOMPAR (Scheneider & Bruijn, 1996) ou PRO-SCORE (DNA Proscan, Inc., Nashville, Tenn.).

Niemann et al. (1997), num estudo comparativo do poder de resolução dos métodos de RAPD e ERIC, para discriminar isolados de *R. meliloti*, procederam à análise das “impressões digitais” geradas pelas diferentes estirpes, através de um sequenciador automatizado a laser fluorescente (ALF-DNA sequencer). Segundo os autores, não houve influência do uso de primers marcados com fluoresceína nas reações de RAPD ou ERIC, permitindo o arquivo e processamento “on-line” dos padrões de PCR gerados, representando um avanço no uso da técnica. Além disso, a reprodutibilidade dos padrões

obtidos através desta estratégia, que antes era uma limitação da técnica, foi sensivelmente aumentada. Os resultados deste teste comparativo indicaram que, embora ambos métodos sejam adequados para revelar o relacionamento genético entre estirpes proximamente relacionadas, a técnica de RAPD-PCR é levemente mais discriminatória do que a de ERIC-PCR. Isto pode ser explicado pelas menores chances de os primers arbitrários de RAPD ligarem-se a seqüências conservadas (ERIC) das diferentes estirpes. Como desvantagem, o método de RAPD exige o teste com um grande número de primers para gerar o nível de polimorfismo necessário de modo a obter um alto poder discriminatório, ou seja, é mais laborioso que ERIC. No entanto, o maior poder de resolução foi dado pelos padrões de RFLP gerados pela hibridização do DNA com uma sonda contendo uma seqüência de inserção (IS), o qual foi utilizado como um método de referência para fins comparativos, apesar pouco adequado à análise de grande número de isolados.

Outras técnicas têm sido publicadas, utilizando a técnica de PCR na detecção e identificação de estirpes de rizóbio. Hartmann et al. (1996) descreve uma metodologia baseada na amplificação específica da seqüência RS α , estruturalmente semelhantes à seqüências de inserção (IS). Esta seqüência, que ocorre em múltiplas cópias no genoma, consiste de um fragmento de DNA de 1.195 pb, originalmente isolada de *B. japonicum* (Hahn & Henecke, 1987). O número de cópias em alguns isolados de *B. japonicum* pode ser extremamente elevado, variando de 86 a 175, sendo que estes isolados não apresentam diferenças em suas propriedades simbióticas, embora tenham crescimento mais lento (Minasawa et al., 1998). A amplificação desta seqüência foi utilizada para a identificação de estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* (Hartmann et al, 1992; Hartmann et al., 1996), mostrando alta especificidade para estas espécies, quando testada contra treze espécies de rizóbio e duas de *Agrobacterium* (Hartmann et al., 1996). Foram

construídos “primers” específicos para esta seqüência, podendo a análise de diversidade ser efetuada através da amplificação direta por PCR ou por hibridização de colônias com sondas de RS α (Hartmann et al., 1996). Ambos métodos se mostraram eficientes e podem ser utilizados, por exemplo, no controle de qualidade de inoculantes ou em estudos ecológicos, substituindo os métodos serológicos (Hartmann et al., 1996).

Laguerre et al. (1996) comparou o poder de resolução e limitações de algumas técnicas de “fingerprinting” do DNA baseadas em PCR, para caracterizar e classificar estirpes de diferentes biovars de *R. leguminosarum*. As técnicas utilizadas foram: RFLP de IGS ribossomal amplificada por PCR, análise por PCR das seqüências repetitivas (rep-PCR) e RAPD. Estas foram comparadas com as técnicas convencionais de análise de RFLP de DNAs hibridizados com sondas para regiões cromossômicas e de genes ligados à características simbióticas (*nod* e *nif*). Os métodos mais rápidos e com maior poder discriminatório foram os baseados em “fingerprinting” do DNA baseado em PCR. Estes refletiram a variabilidade a nível de cromossomo, mas não a variabilidade das regiões simbióticas nas espécies e biovars de *R. leguminosarum*. Os padrões gerados pelos primers REP e RAPD, conforme já discutido, geram padrões complexos de bandas de intensidade variável, que dificultam a estimativa quantitativa do relacionamento genético entre as diferentes estirpes. Além disso, são métodos que, ainda, apresentam baixa reprodutibilidade sob diferentes condições laboratoriais e dificultam a comparação dos dados produzidos por diferentes laboratórios.

Apesar destas limitações, estes métodos simples são um meio eficiente de proceder à caracterização de um grande número de isolados em condições experimentais bem padronizadas. A análise da região de IGS mostrou um poder discriminatório suficiente para agrupar estirpes cromossomicamente relacionadas, com base num padrão simples, reproduzível e facilmente analisável de bandas de restrição. Foram ainda

levantadas pelos autores outras limitações como: variabilidade no tamanho desta seqüência, tanto entre espécies como entre genótipos distintos e a presença de inserções de vários genes de RNAt nestas regiões.

Quando se considera outros gêneros de rizóbio, o poder de discriminação intraespecífica, baseado em RFLP de seqüências IGS, pode ser extremamente baixo (Jensen et al., 1993; Paffetti et al., 1996). Como conclusão, pelo menos para *R. leguminosarum* e seus biovars, os autores consideram que os métodos avaliados mostraram um bom nível de concordância com os métodos de classificação genotípica convencionais, baseados na análise de restrição do DNA, sendo uma alternativa conveniente a estes métodos, com a mesma faixa de resolução e a mesma possibilidade de caracterizar o genoma total ou regiões específicas. Como são muito menos demorados, evitando os procedimentos de extração e hibridização do DNA, são mais adequados para a identificação em larga escala de coleções bacterianas e para o estudo de grandes populações a nível intraespecífico.

Na falta de métodos para rapidamente determinar o relacionamento genético entre um grande número de estirpes, as espécies de *Rhizobium* e de outras bactérias do solo associadas à plantas (p. ex. *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*) têm sido tradicionalmente definidas com base em características fenotípicas, tais como: círculo de hospedeiras, morfologia de colônias, crescimento em meios seletivos e várias propriedades metabólicas (Jordan, 1984; Schaad, 1980). Embora há muito se saiba que características fenotípicas, particularmente as de círculo de hospedeiras não se constituem em uma base confiável para o estabelecimento de filogenias (Wilson, 1944), seu contínuo uso em sistemática se justifica com base na sua conveniência e significância agrônômica. Com o desenvolvimento de métodos moleculares para a determinação de genótipos cromossômicos em bactérias,

tornou-se possível estimar o relacionamento filogenético entre estirpes. Métodos tão diversos quanto o sequenciamento de nucleotídeos dos genes ribossomais (Woese, 1987) ou a detecção eletroforética do polimorfismo de isoenzimas (MLEE) dentro de populações locais (Selander et al., 1986), indicam que as filogenias baseadas em características fenotípicas, às vezes, apresentam concordância com as filogenias baseadas em dados genotípicos, mas, frequentemente, podem mostrar profundas inconsistências (Fox et al., 1992). Atualmente tornou-se indispensável a associação destas duas abordagens nos diferentes estudos de diversidade de microrganismos.

3. CAPÍTULO I:

DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIO QUE NODULAM O FEIJOEIRO RECUPERADOS DE SOLOS TROPICAIS BRASILEIROS.

3.1. INTRODUÇÃO:

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma importante leguminosa dentro do sistema agrícola brasileiro de subsistência capaz de se beneficiar da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, as quais serão neste texto referidas coletivamente como rizóbio. Estas bactérias induzem a formação de um tecido especializado nas raízes da planta, o nódulo, onde ocorre a fixação biológica de nitrogênio, capaz de permitir a substituição total ou parcial da adubação nitrogenada em diferentes culturas de leguminosas. A simbiose feijoeiro-rizóbio apresenta uma grande variabilidade na sua capacidade fixadora de nitrogênio em condições de campo (Hardarson, 1993) devido a diversos fatores bióticos e abióticos que influenciam o desempenho desta simbiose (Graham, 1981). Uma das limitações é a baixa especificidade desta planta, que nodula com uma grande diversidade de espécies de rizóbio; a sua susceptibilidade a diversas pragas e doenças, e a sensibilidade da simbiose a altas temperaturas e acidez do solo (Graham, 1981).

Dentro do sistema agrícola de subsistência predominante na América Latina e África, o feijoeiro é geralmente cultivado em solos marginais onde outros elementos minerais além

do nitrogênio são limitantes à cultura, frequentemente prevalecem condições de umidade insuficiente e de altas temperaturas, e os tratos culturais são insuficientes (Bliss, 1993). O autor sugeriu linhas de pesquisa visando obter o que chamou de um “pacote de produção” para o cultivo do feijoeiro adequado ao pequeno produtor. Neste pacote seriam levadas em consideração as limitações à fixação de nitrogênio determinadas pela hospedeira, que deveriam ser superadas através do melhoramento e seleção de cultivares mais eficientes em simbiose; a produção de um inoculante efetivo e eficiente; o fornecimento de sementes de melhor qualidade e livre de patógenos e práticas de manejo adaptadas às condições agroecológicas do agricultor. O trabalho de levantamento da diversidade das populações de rizóbio que predominam nos diferentes ecossistemas é o primeiro passo para selecionar estirpes mais adaptadas que garantam o sucesso da prática de inoculação.

O rizóbio que infecta o feijoeiro, a ervilha (*Pisum sativum*) e os trevos (*Trifolium* spp) foram classificados em uma única espécie, *R. leguminosarum* (Jordan, 1984), dividida em três biovars, baseado essencialmente na sua capacidade de nodular as diferentes hospedeiras: *R. leguminosarum* bv. phaseoli (*Phaseolus vulgaris*), *R. leguminosarum* bv. viceae (*Pisum sativum*, *Vicia sativa* e *V. faba*) e *R. leguminosarum* bv. trifolii (*Trifolium* spp.). É reconhecida há bastante tempo a grande diversidade genética dos simbioses de *P. vulgaris*, a qual é bem maior do que nos demais biovars (Graham & Parker, 1964; Jarvis et al., 1980; Jordan, 1984). Os primeiros trabalhos de caracterização do gênero *Rhizobium* foram baseados em isolados de rizóbio que nodulam o feijoeiro que tem ocorrência natural em solos de países de clima temperado, resultando de comparações com o rizóbio isolado de plantas originárias destas regiões, como ervilha e trevo. Sabe-se, porém, que o feijoeiro é originário das Américas e portanto os isolados objeto destes estudos iniciais foram provavelmente introduzido nestes países juntamente com as sementes levadas após o período de colonização.

A partir de 1985, foi publicada uma série de estudos sobre os simbioses de feijoeiro isolados nas Américas, incluindo os provenientes das regiões de Cerrado brasileiras, liderados pelo grupo de pesquisa da Universidade Autônoma do México (UNAM), em colaboração com a Embrapa Agrobiologia. Estes estudos levaram em consideração diversas características fisiológicas e genéticas correlacionadas com a especificidade hospedeira e resultaram na definição de novas espécies, além de um melhor entendimento de sua filogenia e distribuição geográfica.

Os estudos baseados no rizóbio indígena das regiões americanas mostraram uma grande diversidade entre os simbioses do feijoeiro (Piñero et al., 1988) e levaram à sua divisão em dois grupos principais chamados de rizóbio do tipo I e do tipo II. Estes agrupamentos foram definidos de acordo com diferenças nos plasmídeos simbóticos (pSym), onde estão localizadas a maioria dos determinante genéticos relacionados ao estabelecimento da simbiose no gênero *Rhizobium* (Martínez et al., 1985; Flores et al., 1987). As estirpes do tipo II foram posteriormente reclassificadas como *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991) e as estirpes do tipo I como *R. etli* (Segovia et al., 1993). Desde a descrição destas espécies, apenas as estirpes proximamente relacionadas em seus genes cromossômicos com os outros biovars de *R. leguminosarum* (viceae e trifolii) são classificadas com *R. leguminosarum* bv. phaseoli.

Duas novas espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro denominadas *R. gallicum* e *R. giardinii*, foram descritas recentemente e ocorrem em solos da França (Amarger et al., 1997). Sua ocorrência em solos tropicais ainda não foi reportada, e o único isolado americano (FL27) classificado como *R. gallicum* foi obtido no México, porém é ineficiente em feijoeiro (Sessitsch et al., 1997).

Em resumo, três espécies distintas de rizóbio são reconhecidas como de importância ecológica como simbioses do feijoeiro em solos tropicais: *R. leguminosarum* bv. phaseoli, *R.*

etli e *R. tropici*. Além deste gênero, um número bastante representativo de isolados incluídos dentro do gênero *Sinorhizobium*, através de análise genética de restrição do DNAr 16S, foram isoladas de nódulos de feijoeiro cultivado em solos tropicais do Brasil e África (Straliotto et al., 1997 e esta tese; Murphy et al., 1997). Diversas espécies de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* assim como estirpes isoladas de leguminosas florestais foram relatadas como capazes de nodular esta planta (Wilson, 1944; Eardly et al., 1985; Bromfield & Barran, 1990; Sadowsky et al., 1988; Lange, 1961, Bal et al., 1982; Herrera et al., 1985; Martínez-Romero et al., 1991; Hungria et al., 1993; Thomas et al., 1994; Hernandez-Lucas et al., 1995).

A taxonomia numérica é uma importante ferramenta nos estudos de levantamento da diversidade de microrganismos, uma vez que permite a combinação dos dados clássicos de fisiologia, serologia, etc, de uma forma menos subjetiva e mais rigorosa, fornecendo medidas quantitativas de similaridade entre os organismos. Há uma grande aplicabilidade destes estudos na avaliação da diversidade de diferentes grupos de microrganismos (Goodfellow et al., 1992; Lipski et al., 1992; Prieto et al., 1992; Riedel & Britz, 1993; Dykes et al., 1994). Além de permitirem um levantamento preliminar da diversidade presente no ambiente em estudo, fornecem dados sobre a expressão de características fisiológicas que podem ser correlacionados com determinadas características ambientais.

O feijoeiro é considerado uma planta sensível a temperaturas elevadas em simbiose, sendo este um dos fatores responsáveis pela sua baixa eficiência na fixação biológica de nitrogênio em condições tropicais (Piha & Munns, 1987b; Straliotto et al., 1992; Mercante, 1993; Hungria & Franco, 1993). Estirpes tolerantes a este estresse tem sido selecionadas visando a produção de um inoculante mais eficiente e adaptado às condições tropicais (Mercante, 1993). Leguminosas como a leucena (*Leucaena leucocephala*) são tolerantes a temperaturas elevadas em simbiose (Cunha & Franco, 1988). Esta planta nodula com muitas espécies de rizóbio, incluindo simbioses do feijoeiro (Hernandez-Lucas et al., 1995). A

leucena foi utilizada como planta-isca para recuperação estirpes de *R. tropici* do solo (Mercante et al., 1998), espécie considerada tolerante a temperatura alta em simbiose com o feijoeiro (Straliotto, 1992; Mercante, 1993).

O objetivo deste trabalho foi estudar a biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro presente nos solos tropicais frequentemente submetidos a temperaturas altas. O efeito da temperatura elevada na infectividade da população presente nestes solos foi avaliado comparando-se as populações de rizóbio recuperadas usando o feijoeiro e a leucena (*Leucaena leucocephala*) como plantas-isca, sob duas temperaturas de crescimento das plantas. A diversidade morfofisiológica dos isolados recuperados do solo foi analisada com o auxílio de análise de agrupamento por taxonomia numérica.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS:

3.2.1. Amostragem do solo: Vinte e duas amostras de solo foram coletadas de áreas de cultivo de feijoeiro da Bahia e Espírito Santo. Estas áreas são submetidas a períodos longos de estresse térmico. Treze amostras foram coletadas na região semi-árida do Estado da Bahia, onde as altas temperaturas estão frequentemente associadas ao estresse hídrico. Cada amostra representativa consistiu de 10 subamostras coletadas em áreas de plantio tradicional de feijoeiro, mas sem histórico de inoculação com rizóbio. O solo foi amostrado a 10 cm de profundidade, após a remoção dos resíduos orgânicos da superfície do solo. Os equipamentos utilizados para a coleta de solo foram esterilizados com álcool antes de cada amostragem. As amostras foram armazenadas em sacos de polietileno, levadas ao laboratório e armazenadas a 5°C até seu uso como inóculo. Uma subamostra de solo foi retirada para análise textural e química. As análises química de fertilidade das amostras de solo encontram-se na Tabela 1. Nas áreas onde a lavoura ainda estava no campo, além da amostra de solo, foi coletado o solo da rizosfera das plantas de feijoeiro.

Tabela 1: Análise química da fertilidade dos solos das diferentes áreas de coleta.

Identificação da amostra	pH em água	Al	Ca + Mg	Ca	Mg	P	K
		Cmol.dm ³				mg/Kg	
1-EPABA, área 1, Irecê, BA, r ^a	7,8	0,0	38	35,0	3,0	30,6	102
2-EPABA, área 1, Irecê, BA, s ^b	8,0	0,0	38	33,7	4,3	5,1	92
4 ^c -EPABA, área 2, Irecê, BA, s	7,8	0,0	28	22,8	5,2	26,3	150
5-Faz.Fortaleza, Lapão, BA, r	7,9	0,0	30	26,2	3,8	24,0	180
6-Faz. Fortaleza, Lapão, BA, s	7,6	0,0	26	21,8	4,2	35,8	288
7- Roça Rod. Irecê-Lapão, BA, s	8,1	0,0	29,4	25,6	3,4	6,3	97
9 ^c -Jussara, BA, s	7,4	0,0	11,2	7,5	3,7	4,4	186
10-C. Agrícola, Irecê, BA, r	7,1	0,0	22,5	18	4,5	146,0	204
11-C. Agrícola, Irecê, BA, s	7,1	0,0	29,5	26	3,5	303,0	228
12-Roça em Canarana, BA, r	7,7	0,0	26,8	23,8	3,0	13,3	186
13-Roça em Canarana, BA, s	7,8	0,0	29,1	25	4,1	7,9	216
14-Roça em Nova Soure, BA, área 1, s	6,3	0,0	6,8	4,5	2,3	25,0	330
15-Roça em Nova Soure, BA, área 2, s	6,4	0,0	5,8	3,7	2,1	14,9	348
16-Cipó, área 1, BA, s	6,6	0,0	24	15,6	8,4	121,0	636
17-Cipó, área 2, BA, s	6,8	0,0	18,9	12,0	6,9	81,5	539
18-Fazenda Odair D'Lorto, Linhares, ES, s	5,4	0,2	3,0	1,8	1,2	13,3	44
19-E. E. Soretano, área 1, Linhares, ES, s	6,1	0,0	5,4	4,0	1,4	29,1	114
20 ^c -E. E. Soretano, área 2, Linhares, ES, s	4,8	0,3	2,6	1,7	0,9	31,6	57
22-E.E. Soretano, área 2, Linhares, ES, r	5,1	0,3	1,8	1,0	0,8	11,9	61

^a amostra de solo da rizosfera de plantas de feijoeiro.

^b amostra de solo.

^c devido a pouca quantidade de solo rizosférico, não foi feita a análise química das amostras 3, 8 e 21, sendo que foram coletadas nas áreas correspondentes às amostras de solo 4, 9 e 21.

3.2.2. Cultivo das plantas: A leucena (*Leucaena leucocephala* var K72) ou feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* cv. Carioca) foram usadas como plantas-isca para o isolamento do rizóbio. Vasos de Leonard (Vincent, 1970) foram inoculados 10g de solo e submetidos, imediatamente após o plantio, a dois regimes térmicos, visando comparar a diversidade dos isolados obtidos a temperatura ambiente ou a temperaturas mais elevadas do solo, conforme descrito abaixo. Foram usadas 3 repetições.

As sementes de leucena e feijão foram esterilizadas superficialmente antes do plantio, por imersão durante 3 min. em HgCl_2 0,2%, seguida de 10 lavagens sucessivas e abundantes em água destilada estéril. As sementes de leucena foram previamente escarificadas por 10 min. em H_2SO_4 concentrado. Quatro sementes foram plantadas em cada pote exatamente sobre o local onde o solo foi inoculado. Logo após o plantio, toda a superfície dos vasos foi recoberta com uma fina camada de areia lavada esterilizada e seca para evitar a contaminação. Após a germinação procedeu-se o desbaste, deixando-se 2 plantas por vaso, e novamente recobriu-se os vasos com uma camada de 2 a 3 cm de areia lavada esterilizada. Os vasos foram envoltos em sacos plásticos e transferidos para tanques com água sob constante agitação cuja temperatura mantida a $38^\circ\text{C}/5\text{h.dia}$ em um dos tratamentos, ou mantida a temperatura ambiente no tratamento controle. A temperatura dos vasos de ambos tratamentos foi monitorada por sensores de temperatura do tipo termopar ligados a um registrador automático, sendo que nos vasos mantidos a temperatura ambiente, a temperatura máxima diurna foi de 28°C e a mínima noturna de 22°C .

3.2.2. Isolamento do rizóbio: Dez nódulos de cada vaso foram coletados e avaliados quanto à capacidade de fixação biológica de nitrogênio, medida pelo método de redução de acetileno (Boddey et al., 1987). Procedeu-se a coleta dos nódulos de feijoeiro e leucena aos 30 e 60 dias após o plantio, respectivamente. Os nódulos foram incubados individualmente em seringas de 1 ml, ou em frascos de 10ml de volume, conforme o tamanho do nódulo.

Cinco nódulos de cada vaso foram selecionados para posterior isolamento, sendo três com maior nível de atividade e dois com baixa atividade da nitrogenase, de modo a obter uma melhor representatividade da diversidade do rizóbio presente nos diferentes solos. Algumas plantas de leucena e, menos frequentemente, de feijoeiro apresentaram número de nódulos menor que cinco, e nestes casos todos os nódulos foram coletados para o isolamento do rizóbio. A bactéria foi isolada dos nódulos e crescida em meio YMA (yeast manitol agar) conforme protocolo padrão (Vincent, 1970). A seguir os isolados foram caracterizados em meio YMA, de acordo com os parâmetros recomendados para caracterização de rizóbio nas normas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. No total foram obtidos e caracterizados 688 isolados, sendo 326 de leucena e 362 de feijoeiro. As culturas de trabalho foram mantidas sob óleo mineral em meio YMA e posteriormente liofilizadas para períodos maiores de estocagem.

3.2.4. Parâmetros morfofisiológicos analisados: Inicialmente foi avaliada a tolerância a altas temperaturas “in vitro” através do crescimento em placas contendo meio YMA incubadas a 30°C e 39°C. O crescimento em meio Luria Broth (LB) (Sambrock et al., 1989) também foi incluído uma vez que a combinação dos resultados do crescimento nestes meios e condições de temperatura é indicativa da diversidade do rizóbio presente nestas populações (Marínez-Romero et al., 1991; Mercante et al., 1998). Para testar as diferentes fontes de carbono foi utilizado o meio basal YMA contendo azul de bromotimol como indicador, substituindo-se o manitol pelos diferentes carboidratos. A fonte de nitrogênio utilizada foi NH_4NO_3 ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$) e vitaminas foram adicionadas ao meio de acordo com Döbereiner et al. (1995). As seguintes fontes de carbono foram usadas: xilose, sacarose, celobiose, frutose, lactato de sódio, succinato, glicerol e lactose, escolhidas entre as descritas por Graham et al. (1991) para auxiliar a distinção entre as diferentes espécies de rizóbio. Todos os carboidratos, numa concentração de 0,5% (p/v) foram esterilizados por

filtração antes de serem adicionados ao meio dissolvido e mantido a temperatura aproximada de 40°C. Oito isolados diferentes foram avaliados em cada placa. A inoculação das placas foi efetuada a partir de cultivo recente em meio YMA.

As características morfofisiológicas de cada isolado foram avaliadas aos 3, 4, 5 e 6 dias de incubação a 30°C. Os parâmetros avaliados foram: variação no pH do meio de cultura, taxa de crescimento, cor da colônia, absorção do corante, quantidade e tipo de muco, gerando um total de 48 parâmetros fenotípicos para cada isolado (6 características X 8 fontes de carbono). Dezesete estirpes de referência obtidas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia foram incluídas para comparação: *R. leguminosarum* bv. phaseoli estirpes BR376 e BR10052; *R. leguminosarum* bv. viceae estirpe BR620; *R. tropici* estirpe BR10039 do tipo IIA e BR322 do tipo IIB; *R. etli* estirpe BR10026; *Azorhizobium caulinodans* estirpes BR5409 e BR5410; *Mesorhizobium loti* estirpe BR10057; *S. meliloti* estirpes BR10058 e BR112; *B. japonicum* estirpe BR110; *B. elkanii* estirpe BR111; e *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GMI9023.

3.2.5. Análise numérica dos dados fenotípicos: As quarenta e oito características fenotípicas avaliadas no teste de utilização de carboidratos foram tabeladas e analisadas por taxonomia numérica, utilizando o coeficiente “simple matching” (S_{SM}) (Sokal & Michener, 1958) sendo que o agrupamento foi obtido utilizando as médias aritméticas pelo método UPGMA (unweighted pair group method) (Sneath & Sokal, 1973). O programa utilizado foi o NTSYS (numerical taxonomy system using multivariate statistical programs) (Rohlf et al., 1992).

3.2.6. Teste de infectividade: Apenas isolados representativos de cada agrupamento morfofisiológico, obtido após a análise de agrupamento foram avaliados para infectividade em feijoeiro. Foram testados 150 isolados obtidos de leucena e 178 de feijoeiro. As sementes de feijoeiro foram esterilizadas superficialmente conforme descrito acima e

quatro sementes foram plantadas em cada vaso de Leonard, com duas repetições por tratamento. Após a germinação foi feito o desbaste para duas plantas por vaso, num total de quatro plantas inoculadas para cada isolado. A cultura de rizóbio foi crescida durante dois dias em meio YMA líquido, e as sementes foram inoculadas no momento do plantio com 2 mL de cultura por vaso. A estirpe F98.5 (*R. tropici* IIB) foi usada como controle positivo em feijoeiro (Mercante, 1993), já que em vários experimentos a mesma foi superior à estirpe CIAT899. Plantas não inoculadas foram usadas como controle. As plantas foram avaliadas 30 dias após o plantio para nodulação, atividade da nitrogenase pelo método de redução de acetileno (Mague & Burris, 1972), e peso da parte aérea seca.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Neste capítulo, as espécies de *R. leguminosarum* bv. phaseoli e *R. etli* serão referidas como um grupo único com a notação *R. leguminosarum* bv. phaseoli/*R. etli*, devido a impossibilidade de distingui-las através das características fenotípicas analisadas. Estas espécies somente podem ser distintas mediante a análise de características cromossomais (Hungria et al., 1997), o que não faz parte dos objetivos desta etapa do trabalho. O termo *Rhizobium* sp (*Phaseolus*) sugerido pelo “Subcommittee on the Taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*” referindo-se a agrupamentos não analisados geneticamente e que fenotipicamente não se enquadrem na definição de *R. tropici*, poderia ser usado para este grupo de isolados. No entanto, neste estudo, vários agrupamentos não foram similares a nenhuma das espécies de rizóbio conhecidas, e isto poderia gerar confusão na interpretação dos resultados, pois todos estes se enquadrariam na definição de *Rhizobium* sp (*Phaseolus*).

A caracterização morfofisiológica dos isolados em meio YMA, de acordo com as normas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia, mostrou que a maioria dos isolados de leucena e feijoeiro obtidos a temperatura ambiente apresentaram crescimento rápido e reação ácida em meio YMA. No entanto, os isolados obtidos de feijoeiro apresentaram outras características tais como produção de goma, forma e cor da colônia mais heterogêneas do que os de leucena. A mesma observação foi feita por Mercante et al.

(1998), comparando isolados de feijoeiro e leucena obtidos a partir de solos de Cerrados. Os isolados de leucena e feijoeiro obtidos a altas temperaturas também apresentaram maior heterogeneidade nestas características comparados com os obtidos a temperatura ambiente (28°C).

O crescimento dos isolados a 39°C mostrou diferenças marcantes entre as populações de rizóbio de acordo com a planta-isca utilizada (Figura 1), uma vez que 58% dos isolados de leucena foram capazes de crescer nesta temperatura em contraste com apenas 27% dos isolados de feijoeiro. Estes resultados indicam que a utilização de leucena, uma planta tolerante a temperaturas altas em simbiose, resultou na recuperação de uma população de rizóbio com maior proporção de isolados também tolerantes ao crescimento *in vitro* nestas condições.

A capacidade de crescer em meio LB correlacionou-se positivamente com o crescimento *in vitro* a temperaturas altas (Figuras 2 e 3). No caso da população recuperada de leucena, a porcentagem de isolados que apresenta crescimento positivo em meio LB foi de 13%, destes 67% toleram crescimento a temperaturas altas em meio de cultivo (Figura 2). Para a população recuperada de feijoeiro, 9% dos isolados são capazes de crescer em meio LB, dos quais também cerca de 67% tolera temperaturas altas de incubação (Figura 3). Estes valores estão bem próximos dos obtidos por Mercante et al. (1998) sendo que esta correlação também foi observada num estudo de isolados recuperados de solos de Cerrado conduzido por Vargas et al. (1997 citados por Hungria et al., 1997).

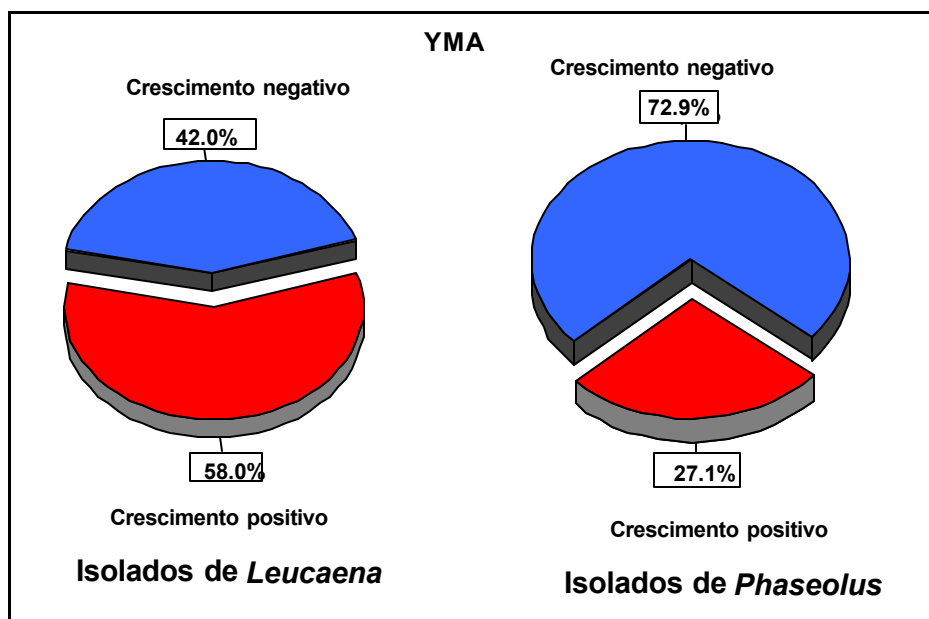


Figura 1: Porcentagem de isolados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) ou leucena (*Leucaena leucocephala*) que apresentaram crescimento positivo ou negativo em meio YMA (Vincent, 1970) a 39°C.

Entre a população isolada de leucena, 52% dos isolados pertencentes ao grupo que não cresce em meio LB é capaz de crescer a 39°C (Figura 2), o que reforça a maior tolerância *in vitro* a temperaturas elevadas dos isolados obtidos desta hospedeira. Isto não ocorre entre os isolados de feijoeiro (Figura 3), onde apenas 22% dos isolados com crescimento negativo em meio LB tolera o crescimento “*in vitro*” a esta temperatura.

Esta análise preliminar da diversidade indicou a predominância de *R. tropici* IIA entre os isolados de leucena, pois a maioria tolera o crescimento a temperaturas altas *in vitro* e não é capaz de crescer em meio LB. Entre os isolados de feijoeiro, os resultados indicaram uma predominância de estirpes do grupo *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*/*R. etli*, incapazes de crescer nas condições testadas. Uma minoria destes isolados apresentou capacidade de crescer em meio LB e tolerância a altas temperaturas *in vitro*, características que indicam a presença de *R. tropici* IIB. Estas características foram usadas apenas como

indicativos da diversidade presente nas populações em estudo, uma vez que nem sempre estão correlacionadas com a ocorrência real das diferentes espécies (Van Berkum et al., 1994; Hungria & Vargas, 1997 em Hungria et al., 1997).

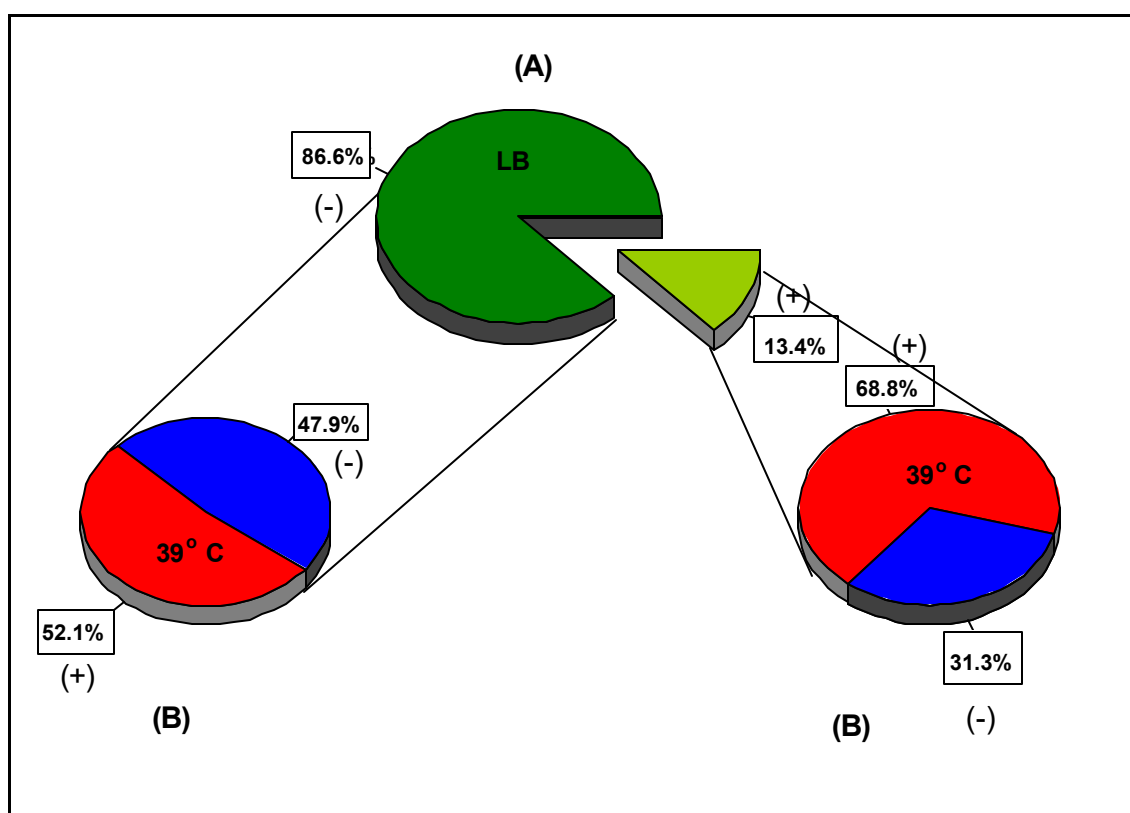


Figura 2: Porcentagem de isolados de *Leucaena leucocephala* apresentando crescimento positivo (+) ou negativo (-) em meio LB **(A)** e tolerância *in vitro* temperaturas elevadas avaliada pela capacidade de crescer (+) ou não (-) em meio YMA a 39°C **(B)**.

Em outro levantamento da diversidade de rizóbio que nodula o feijoeiro em regiões de Cerrado, usando-se estirpes isoladas de nódulos de feijoeiro, 70% dos isolados foram classificados como *R. tropici* IIA, 19% como *R. tropici* IIB e 11% como *R. leguminosarum* bv. phaseoli/*R. etli* (Vargas et al., 1997 em Hungria et al., 1997). Estes autores usaram estas características de crescimento em meio LB e a temperaturas altas “in vitro”, como parâmetros de distinção entre as diferentes espécies. Estes parâmetros apresentam grande

variabilidade, mas outros aspectos podem estar interferindo como histórico de cultivo e inoculação das diferentes áreas, conforme discutido pelos autores, o que pode explicar a discrepância dos resultados entre os dois levantamentos.

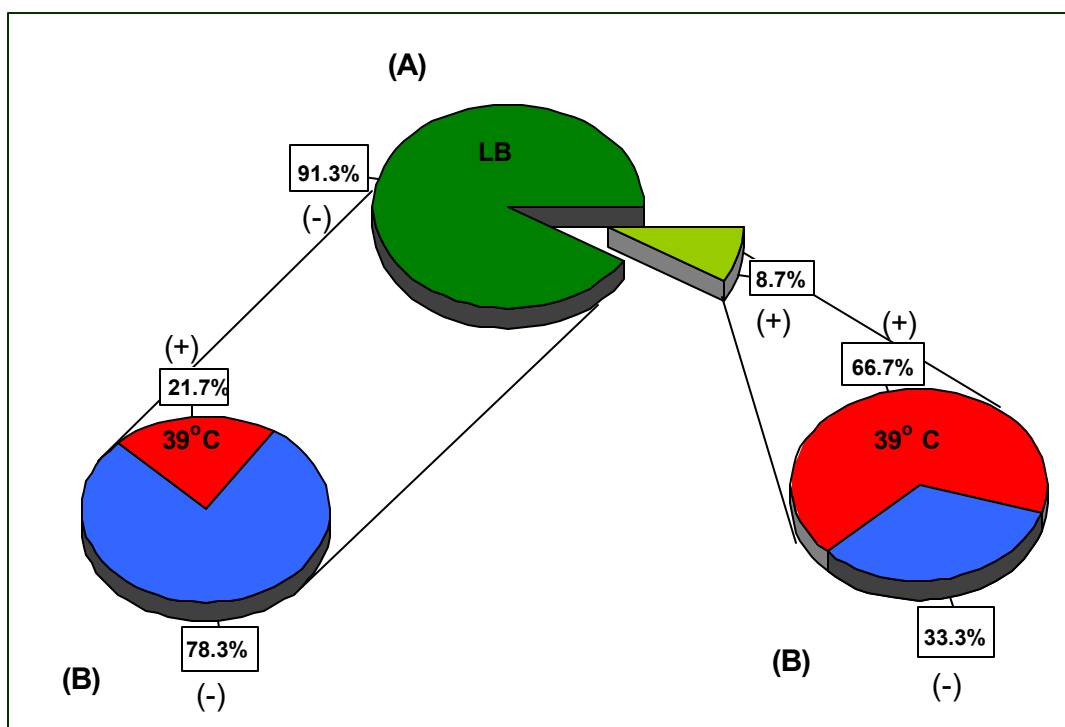


Figura 3: Porcentagem de isolados de *Phaseolus vulgaris* apresentando crescimento positivo(+) ou negativo (-) em meio LB **(A)** e tolerância *in vitro* temperaturas elevadas avaliada pela capacidade de crescer (+) ou não (-) em meio YMA a 39°C **(B)**.

A análise de agrupamento dos isolados baseada nas características morfofisiológicas escolhidas permitiu a distinção entre as principais espécies de rizóbio, exceto para as estirpes do tipo I, que inclui as espécies de *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* as quais sempre formaram um agrupamento único (Figuras 4 e 5). Os números entre parêntesis nos dendrogramas indicam o número de isolados pertencentes a cada agrupamento distinto. Os limites de distinção entre estas duas espécies são muito tênues (Amarger et al., 1997) sendo que na realidade apenas podem ser distintas através de análise de características

cromossomais (Hungria et al., 1997). Esta similaridade pode ser explicada pela teoria de que *R. leguminosarum* bv. phaseoli teria surgido pela transferência horizontal do plasmídeo simbiótico de *R. etli* para *R. leguminosarum* (Segovia et al., 1993). Seja qual for sua origem, estas duas espécies são mais proximamente relacionadas do que os dois subgrupos de *R. tropici*, o que foi também verificado nos dendrogramas obtidos através da análise fenotípica (Figuras 4 e 5). A formação de um único agrupamento incluindo *R. tropici* IIB e *A. tumefaciens* (Figuras 4 e 5) também está de acordo com os dados de literatura, uma vez que estas espécies são consideradas geneticamente muito próximas (Willems & Collins, 1993).

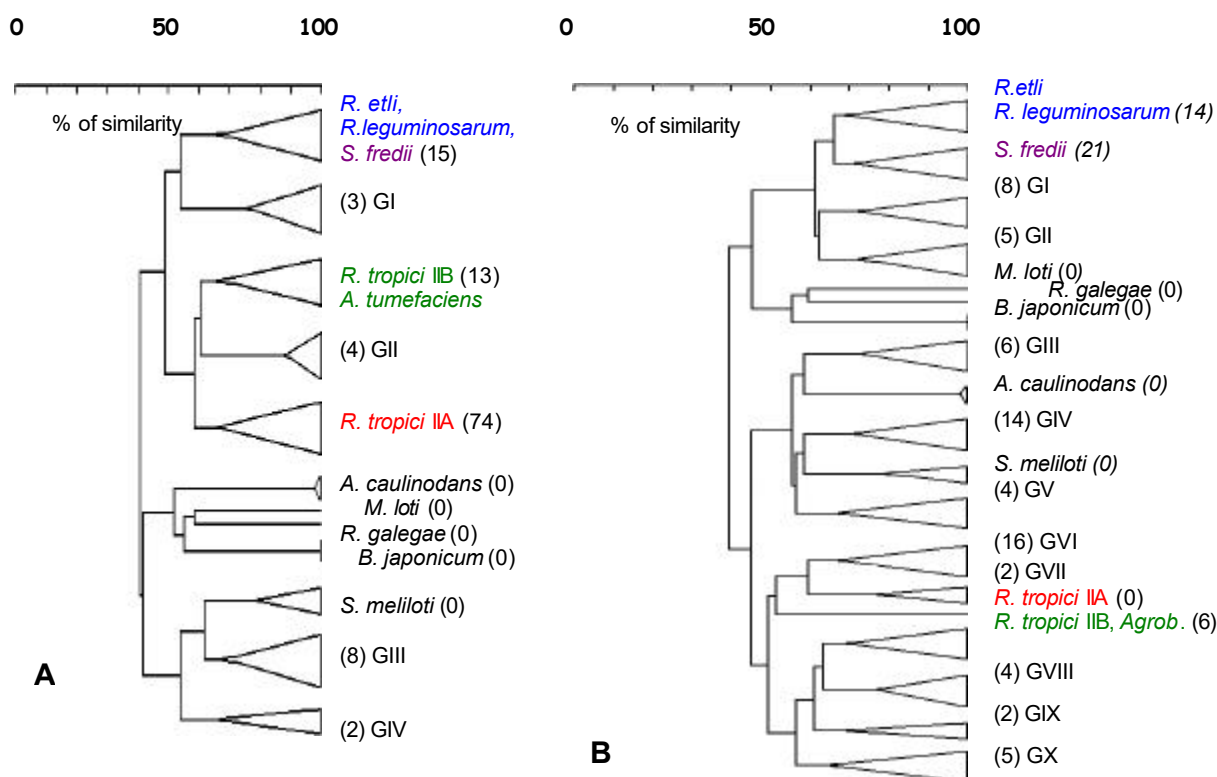


Figura 4: Análise de agrupamento mostrando a distribuição de 137 isolados recuperados de leucena (*Leucena leucocephala*) crescida a temperatura ambiente **(A)** e de 125 isolados recuperados a temperaturas elevadas **(B)**. Análise de agrupamento pelo método UPGMA e o coeficiente de similaridade S_{SM} (simple matching). Entre parêntesis está indicado o número de isolados pertencentes a cada agrupamento.

As populações rizobianas recuperadas das diferentes plantas-isca e sob os dois tratamentos de temperatura apresentaram padrões distintos de distribuição (Figuras 4 e 5). Uma visão geral da distribuição dos isolados nos diferentes grupos ao nível de 65% de similaridade, mostra que para ambas hospedeiras a temperatura de crescimento das plantas influenciou o número de agrupamentos obtidos. Doze grupos foram distintos usando-se o feijoeiro como planta-isca quando crescido a 28°C, mas quando a planta foi crescida a 38°C os isolados foram distribuídos em 24 grupos, sendo que cada agrupamento destes possui um mínimo de 2 isolados. Este efeito no padrão de distribuição dos isolados foi também observado para os obtidos de leucena: sete grupos foram formados para os isolados recuperados a 28°C enquanto que quando a planta foi crescida a 38°C novamente os isolados mostraram uma maior diversidade, formando 13 grupos (Figura 4).

A efetividade simbiótica de isolados representativos de cada agrupamento obtido foi testada em feijoeiro. Foram testados 31% dos isolados obtidos das plantas-isca crescidas a 28°C e no mínimo 60% dos isolados obtidos das plantas crescidas a 38°C. Esta diferença deve-se a maior diversidade fenotípica observada entre os isolados obtidos a temperaturas elevadas, formando um maior número de agrupamentos. Observa-se na Tabela 1 que uma grande porcentagem de isolados de feijoeiro perderam a capacidade de nodular esta planta, após a estocagem do material em meio de cultivo por um período de aproximadamente dois anos. Esta porcentagem foi maior, 34%, entre os isolados de feijoeiro recuperados a 38°C, onde também, pela análise de agrupamento foi maior a porcentagem de isolados classificados como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*/*R. etli*. Por outro lado, observa-se que dentre os isolados de feijoeiro recuperados a temperatura ambiente, onde a porcentagem de isolados pertencentes a este grupo é menor, a perda de infectividade atinge 21% dos isolados.

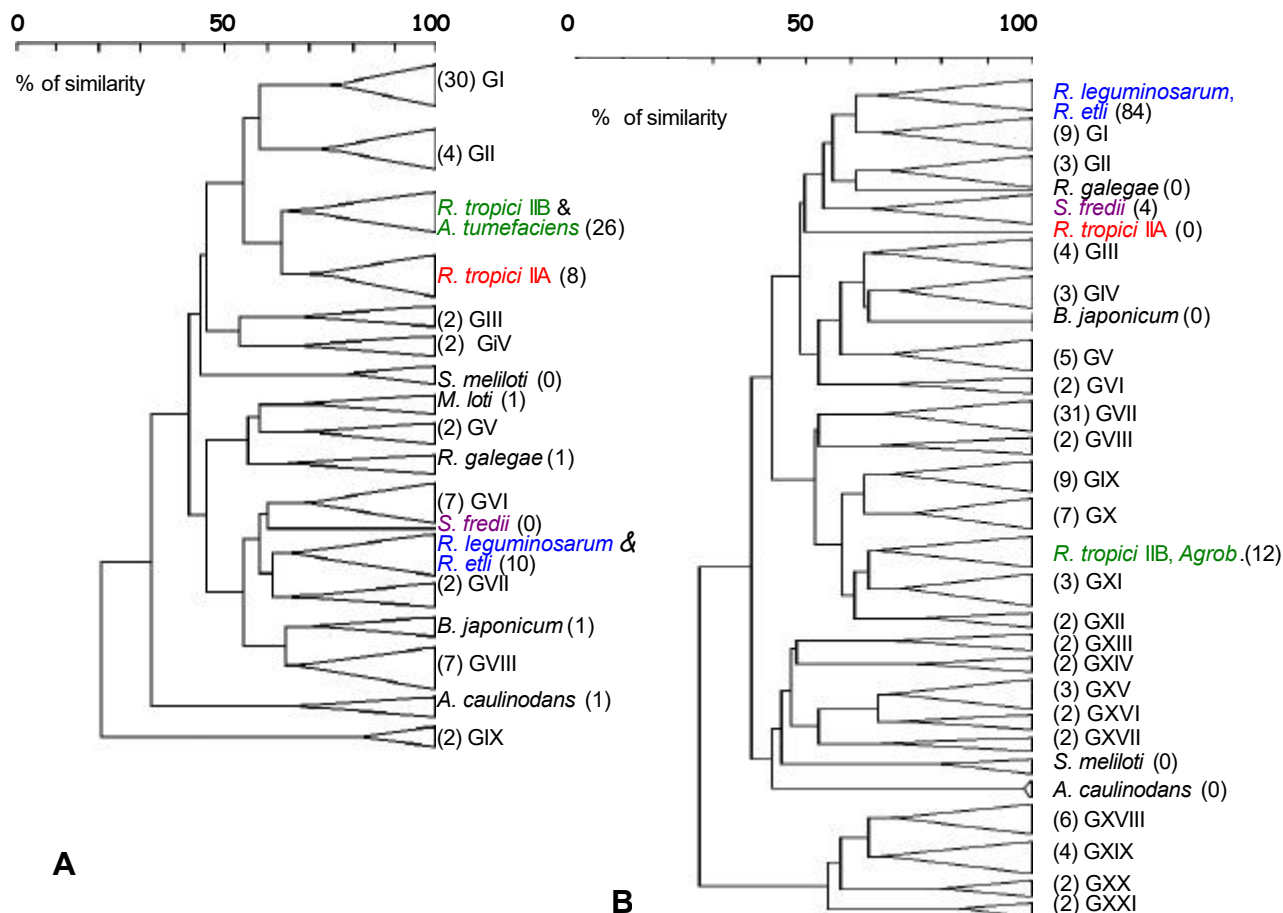


Figura 5: Análise de agrupamento mostrando a distribuição de 124 isolados recuperados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) crescido a temperatura ambiente **(A)** e de 219 isolados recuperados a temperaturas elevadas **(B)**. Análise de agrupamento pelo método UPGMA e o coeficiente de similaridade S_{SM} (simple matching). Entre parêntesis está indicado o número de isolados pertencentes a cada agrupamento.

A perda da capacidade infectiva, comum nesta espécie, tem sido correlacionada a ocorrência de rearranjos genômicos mais frequentes, levando a perda de características fenotípicas importantes tais como a capacidade de nodulação e eficiência simbiótica (Soberón-Chaves et al., 1986; Flores et al., 1988; Martínez et al., 1988, 1990; Piñero et al., 1988; Girard et al., 1991). Em condições de laboratório foi demonstrado que, após um ano de manipulação em laboratório, 35% das células de uma estirpe pertencente a este grupo mostravam diferenças em relação às originais (Flores et al., 1988). No Brasil foi

constatada a perda da eficiência na fixação biológica de nitrogênio em três estirpes utilizadas em inoculantes, a C-05-0 (CENA, Piracicaba), a V-23 (Embrapa Cerrados) e a SEMIA 4064 (=UMR 1135 ou =UFRGS 196, Universidade de Minnesota, EUA), classificadas como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Hungria et al., 1997).

Tabela 2: Teste de infectividade em feijoeiro dos isolados obtidos das plantas-isca (feijoeiro e leucena) sob duas temperaturas de crescimento, após dois anos de estocagem em meio de cultura YMA com carbonato cálcio (Vincent, 1970).

Planta-isca e temperatura de crescimento	Número de isolados testados	Isolados inefetivos		Isolados efetivos	
		Número	(%)	Número	(%)
Feijão 28°C	43	9	(21)	34	(79)
Feijão 38°C	135	46	(34)	89	(66)
Total	178	55	(31)	124	(69)
Leucena 28°C	63	0	-	63	(100)
Leucena 38°C	87	8	(9)	79	(91)
Total	150	8	(5)	144	(95)

Não ocorrem isolados inefetivos dentro da população recuperada de leucena crescida a temperatura ambiente, onde mais de 70% dos isolados agruparam-se com a espécie *R. tropici* subgrupos IIA e IIB (Figura 4) e cerca de 17% com estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*/*R. etli*. Entre os isolados recuperados desta hospedeira em temperaturas altas de incubação, a porcentagem de isolados inefetivos é de 10%, sendo que 33% dos isolados desta população foram agrupados como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*/*R. etli*. Como nesta população apenas 6% foram similares a *R. tropici*, os demais agrupamentos obtidos de leucena nesta temperatura provavelmente são também pertencentes a espécies com maior estabilidade genotípica, merecendo maiores estudos visando a sua caracterização.

Segundo relata Hungria et al. (1997), uma comunicação pessoal de Esperança Martínez, pertencente ao grupo da Universidade Autónoma do México, grupo que lidera os trabalhos de genética de estirpes que nodulam o feijoeiro, *R. tropici* parece ser cem vezes mais estável do que *R. etli*, pelas estimativas de rearranjos genômicos. Em termos de perdas de plasmídeos, a estabilidade da espécie parece ser pelo menos mil vezes superior à de *R. etli*. Quanto à estabilidade dos plasmídeos nestas duas espécies há controvérsias, uma vez que Amaral & Baldani (1999) observaram grande estabilidade nos plasmídeos de uma estirpe de *R. etli* e instabilidade em outra de *R. tropici*. No entanto, outros estudos, envolvendo um maior número de isolados que sejam representativos das populações presentes no solo, são necessários para se estabelecer um padrão de comportamento das diferentes espécies.

A grande maioria dos isolados de leucena (95%) foram capazes de nodular o feijoeiro, sendo que em média 30% dos isolados desta população foram mais eficientes na capacidade de fixar nitrogênio que a estirpe BR855 (Tabela 2). Esta estirpe, pertencente à espécie *R. tropici* subgrupo IIB, isolada dos Cerrados brasileiros por F.M. Mercante (Mercante, 1997), tem eficiência similar, e em alguns experimentos, superior à estirpe CIAT899 e além disso, apresenta melhor tolerância a temperaturas altas em simbiose (Mercante, 1993). Mercante et al. (1998) encontraram que os isolados de leucena obtidos nos Cerrados também apresentaram bom nível de eficiência, com grande porcentagem de isolados superiores à estirpe padrão de comparação utilizada, no caso a CIAT899.

A porcentagem de isolados considerados muito eficientes (relação de 1,2 a 2,0 entre o peso da parte aérea seca da planta inoculada com o isolado/peso da parte aérea seca da planta inoculada com a estirpe BR855) entre a população recuperada de leucena crescida a 28°C chegou a 40%, comparada com 18% dentro da população recuperada de leucena a temperatura elevada. Dentro da população recuperada de feijoeiro, em média 17% dos

isolados pertencem a esta classe, sendo 23% relativos à população recuperada a temperatura ambiente e 14% dos isolados recuperados de feijoeiro a temperaturas altas. Observa-se que as temperaturas elevadas de incubação das plantas-isca, levaram a um decréscimo na eficiência dos isolados recuperados.

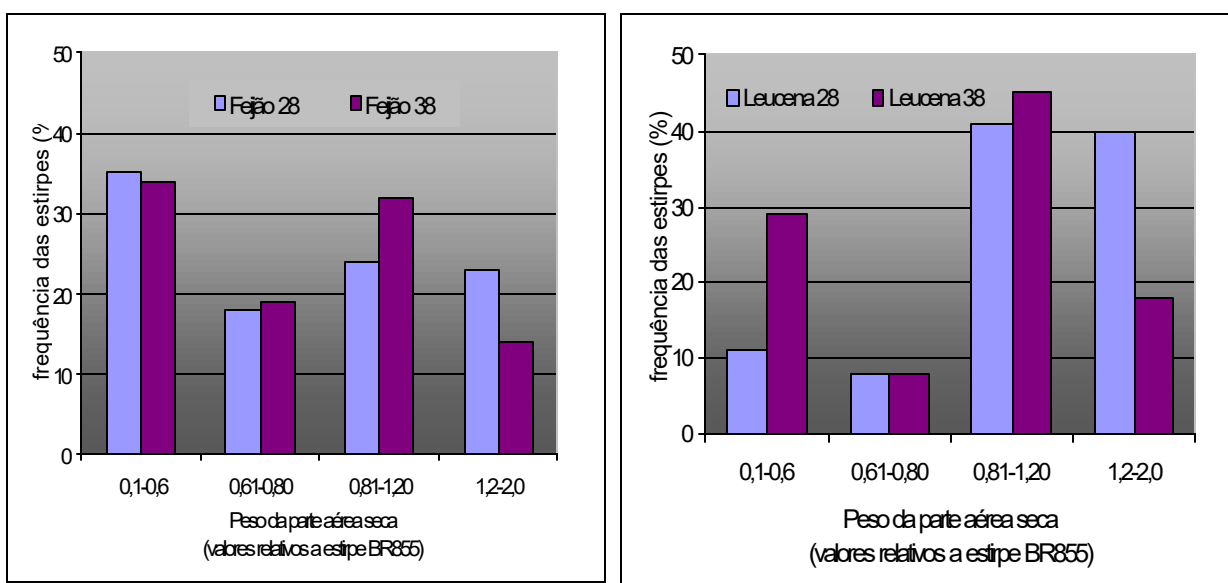


Figura 6: Eficiência na fixação de nitrogênio em simbiose com o feijoeiro dos isolados obtidos a partir de feijoeiro e leucena, em duas temperaturas de incubação das plantas, medida em valores relativos a estirpe BR855.

Dentro da população recuperada de feijoeiro, 35% foram classificados como isolados ineficientes, ou seja, que nodulam mas que não fixam ou que fixam muito pouco nitrogênio, resultando em baixo acúmulo de matéria seca na parte aérea das plantas. Os dados de redução de acetileno confirmam a baixa atividade da nitrogenase dos isolados deste agrupamento, descartando a hipótese de problemas na translocação do nitrogênio fixado para a parte aérea. Os dados de atividade da nitrogenase, medida pela taxa de redução de acetileno não estão mostrados devido a sua alta variabilidade intrínseca, o que dificulta a sua

interpretação, sendo que atualmente não são mais recomendados como única medida de eficiência das estirpes em rizóbio. A porcentagem de isolados ineficientes dentro da população recuperada de leucena foi de 23% em média, sendo de apenas 11% nesta população quando a leucena é crescida a temperatura ambiente.

A distribuição dos isolados entre os diferentes grupos, avaliada pelas características fenotípicas, mostrou que a incubação das plantas a temperaturas mais elevadas provocou um deslocamento da população que nodula a planta sob condições de temperatura ambiente, permitindo a ocupação nodular por outros grupos de rizóbio presentes no solo. Diversos efeitos das temperaturas elevadas na sobrevivência de estirpes de rizóbio são relatados na literatura (Graham, 1992). A temperatura também afeta os passos iniciais da infecção da hospedeira, especialmente a troca de sinais moleculares entre os parceiros, tanto a nível do rizóbio como da planta (McKay & Djordjevic, 1993; Hungria, 1995; Raghuwanshi et al., 1994). A diversidade de isolados recuperados pela duas plantas-isca foi maior sob condições de estresse, resultados também encontrados por Anyango et al. (1995), estudando o efeito da acidez do solo sobre a recuperação de populações de rizóbio que nodulam o feijoeiro.

Os dendrogramas também mostram a maior diversidade fenotípica apresentada pela população recuperada de feijoeiro, comparado com as populações obtidas de leucena. A grande diversidade dos isolados de feijoeiro tem sido extensivamente relatada na literatura (Piñero et al., 1988; Anyango et al., 1995; Mercante et al., 1998).

Através da análise de agrupamento, foi possível agrupar com as estirpes de referência 90% dos isolados de leucena recuperados a temperatura ambiente (Figura 4). A maioria destes isolados, 62%, agruparam-se a espécie *R. tropici* IIA. Cerca de 13% agruparam-se com estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*/*R. etli*, as quais nesta análise não puderam ser distintas de *S. fredii*, e 11% com *R. tropici* IIB. Estes resultados confirmam

a avaliação prévia da diversidade destas populações, baseada nas características de crescimento em meio LB e em YMA a temperaturas altas, que indicou o agrupamento da maioria dos isolados de leucena dentro da espécie *R. tropici* IIA, capaz de crescer a 39°C em meio de cultivo mas incapaz de crescer em meio LB. Mais de 70% dos isolados de leucena obtidos a 28°C agruparam-se com a espécie *R. tropici*, dados que concordam com os obtidos por Mercante et al. (1998) num estudo de diversidade de rizóbio que nodula o feijoeiro usando leucena como planta-isca. Neste estudo, pela técnica de hibridização do DNA de colônias com sondas específicas para as diferentes espécies que nodulam o feijoeiro, 90% dos isolados obtidos, foram classificados como pertencentes à espécie *R. tropici*, e maioria deles (79%) pertenciam ao subgrupo IIA.

A maioria dos isolados recuperados de leucena crescida a temperatura elevada (62%) formou diversos agrupamentos, geralmente com pequeno número de isolados em cada um. Apenas 38% destes isolados agruparam-se com as estirpes de referência sendo que 13% consistiram de isolados semelhantes às estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*/*R. etli*, consideradas sensíveis a temperaturas elevadas em simbiose. No entanto, nenhum isolado pertencente a esta população agrupou-se com *R. tropici* IIA e apenas cerca de 6% destes isolados foram semelhantes à *R. tropici* IIB, resultado inesperado devido às características de tolerância a altas temperaturas relatadas para esta espécie. Temos ainda cerca de 20% dos isolados desta população agrupados dentre de *S. fredii*. Este grupo de isolados apresentou boa eficiência quando inoculado na cultivar de feijoeiro Carioca 80, o que contrasta com os resultados de Sadowsky et al. (1988) onde estirpes de *R. (Sinorhizobium) fredii* apresentaram baixa eficiência quando inoculadas em cultivares comerciais. Esta significativa proporção de isolados pertencentes a este gênero pode significar adaptação da espécie para nodulação em condições de estresse.

Para as populações obtidas de feijoeiro, assim como para as obtidas de leucena, conforme já destacado, foi observada uma maior diversidade a temperaturas elevadas (Figura 5). No entanto, os dendrogramas mostram a grande diversidade da população recuperada de feijoeiro nas duas condições de temperatura, sendo que apenas 42% dos isolados agruparam-se com as estirpes de referência a temperatura ambiente e 47% a 38°C. Numa análise de diversidade de rizóbio baseada em parâmetros genotípicos, Mercante et al. (1998) obtiveram valores semelhantes onde apenas 51% dos isolados de feijoeiro recuperados de solos de Cerrados puderam ser agrupados com as estirpes de referência.

Embora tenha sido baixa a porcentagem de isolados de feijoeiro similares às estirpes de referência dentro da população recuperada a 28°C, o maior agrupamento obtido, com 25% dos isolados, foi similar a *R. tropici* IIB e ainda 8% dos isolados agrupou-se com *R. tropici* IIA (Figura 5a), num total de 33% de isolados pertencentes à esta espécie. Puderam ser agrupados como isolados semelhantes às espécies *R. leguminosarum* bv. phaseoli/*R. etli* cerca de 9% dos isolados. O restante da população não pode ser caracterizada entre as espécies conhecidas, o que indica um alto índice de diversidade nesta população.

Há coerência com os dados de Mercante et al. (1998), onde 36% dos isolados de feijoeiro dos Cerrados foram assinalados como *R. tropici*, embora estes autores tenham observado uma porcentagem maior de isolados, 15%, agrupados como *R. leguminosarum* bv. phaseoli/*R. etli*, valor um pouco mais elevado do que o obtido no presente estudo. A grande diversidade fenotípica e variabilidade nas características fenotípicas e genotípicas, relatada acima para os isolados pertencentes à estas espécies, pode ser responsável por esta discrepância, sendo que somente através de uma análise genotípica será possível discutir a predominância de um ou outro grupo nas diferentes populações recuperadas de feijoeiro no nosso estudo.

Para a população de feijoeiro recuperada a 38°C, 47% dos isolados puderam ser agrupados com as estirpes de referência, sendo que 41% dos isolados foram similares às estirpes de *R. leguminosarum* bv. phaseoli/*R. etli*, e apenas 6% foram similares à *R. tropici* IIB (Figura 5B). Nenhum isolado desta população agrupou-se com a estirpe de referência de *R. tropici* IIA, no entanto novamente aparece, em condições de temperaturas elevadas, 4 isolados agrupados como *Sinorhizobium*.

Comparando-se o agrupamento das populações recuperadas destas hospedeiras nas duas temperaturas de crescimento das plantas, podemos verificar que a capacidade de ocupação nodular por isolados de *R. tropici* foi afetada pelo crescimento das plantas a temperatura elevada. A porcentagem de recuperação de isolados pertencentes a esta espécie caiu de 73% para 6%, para os isolados de leucena crescida a 28 e a 38°C, respectivamente. O mesmo ocorre com a população desta espécie recuperada de feijoeiro, onde a porcentagem de ocupação nodular cai de 33% para 6%, nas mesmas condições. Anyango et al. (1995) também observaram diferenças nos tipos predominantes de rizóbio recuperados de feijoeiro crescido em solos em condições de estresse. Neste estudo houve predomínio de *R. tropici* em solos mais ácidos, confirmando a maior adaptação desta espécie a esta condição (Graham et al., 1994).

A espécie *R. tropici* é considerada tolerante a temperaturas altas “in vitro” (Hungria et al., 1997), uma vez que cresce em temperaturas acima de 37°C, enquanto que *R. leguminosarum* bv. phaseoli e *R. etli* toleram até 35°C. Vários isolados de *R. tropici* tem mostrado maior tolerância a temperaturas altas em simbiose com o feijoeiro quando comparados aos isolados de *R. leguminosarum* bv. phaseoli (Mercante, 1993). Os nódulos formados por estirpes de *R. tropici*, após um período de 2 a 3 dias de choque térmico, não mostraram a senescência nodular típica dos nódulos formados por estirpes de *R. leguminosarum* bv. phaseoli (Straliotto et al., 1992).

Nossos resultados, entretanto, indicam que a temperatura elevada afetou a recuperação de isolados de *R. tropici* tanto a partir de uma hospedeira sensível como de uma tolerante a este estresse, apesar da bactéria estar presente no solo. *R. tropici* mostrou uma baixa sobrevivência no solo após sucessivos cultivos (Vlassak et al., 1996), embora isolados pertencentes a esta espécie tenham demonstrado ser altamente competitivos (Straliotto et al., 1991; Straliotto & Franco, 1993; Vlassak et al., 1996). Somente após a reinoculação os isolados de *R. tropici* voltam a predominar em solos com uma população estabelecida de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*/*R. etli*. Portanto, esta espécie, apesar da sua tolerância a temperatura alta uma vez estabelecida a simbiose, apresenta problemas de sobrevivência saprofítica no solo, ou na comunicação molecular entre a bactéria e as raízes de suas hospedeiras, a qual pode estar sendo afetada sob temperatura elevada. Os experimentos de persistência no solo (Vlassak et al., 1996), foram conduzidos em um solo arenoso, ou seja, de condutividade térmica alta, no Estado do Rio de Janeiro, onde é frequente a ocorrência de temperaturas altas, muitas vezes associadas a um déficit hídrico, o que pode ter afetado diretamente a sobrevivência da população de rizóbio, ou sua interação com a hospedeira.

O progressivo desaparecimento de *R. tropici* em solos sob cultivo de feijoeiro poderia ainda ser explicado pela hipótese do feijoeiro não ser o hospedeiro de origem desta espécie, uma vez que tem sido relatada a sua ocorrência em solos africanos sem nenhum histórico prévio de inoculação desta planta (Anyango et al., 1995), embora a hipótese de introdução através das sementes não possa ser descartada. Um outro indício que reforça esta hipótese, é o relato, por estes mesmos autores, da recuperação de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro em solos africanos provenientes de regiões montanhosas, em altitudes bem acima das permitidas para a prática agrícola. Além disso, esta espécie tem sido recuperada de nódulos de diversas outras leguminosas tropicais tais como *Bolusanthus* e *Spartium* na África

(Dagut & Stein, 1995). Sua ocorrência significativa em regiões bem distantes do centro de diversificação do feijoeiro, tais como na região tropical da América do Sul especialmente nos Cerrados brasileiros (Mercante et al., 1998) e, de acordo com este trabalho, nas regiões semi-áridas do Estado da Bahia, mas com maior afinidade pela rizosfera de leucena, são observações que levantam dúvidas sobre a coevolução destas espécies. Deste modo, *R. tropici* seria um simbiote menos adaptado à rizosfera do feijoeiro, o que explicaria sua pouca persistência em solos sob cultivos sucessivos desta leguminosa

Considerando-se que a espécie *R. etli* originou-se nas regiões Mesoamericanas (Segovia et al., 1993), um dos centros de origem das espécies de *Phaseolus* (Singh et al., 1991a), a longa coexistência da bactéria com a sua hospedeira durante o período evolucionário, pode ser responsável por sua grande diversidade genotípica (Young, 1985; Piñero et al., 1988). Esta diversidade é provavelmente uma fonte de genes que favorecem sua nodulação sob uma ampla gama de condições ambientais, refletindo a diversidade adaptativa da cultura (Singh et al., 1991b).

Hungria et al. (1991a) relatam que há uma grande variedade de cores de sementes de feijão, resultante da combinação de diversos flavonóis e antocianinas, substâncias indutoras dos genes de nodulação em rizóbio. O feijoeiro exsuda uma gama maior de compostos indutores da nodulação do que outras espécies de leguminosas (Hungria et al., 1997). Por outro lado, foi observado que todos estes compostos induzem a transcrição dos genes de nodulação em *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Hungria et al., 1991, 1992). A estirpe de *R. tropici* CIAT899 (BR322), embora apresente reiteraões nos genes de nodulação (*nodD*) foi induzida por apenas um composto da raiz, a naringenina, enquanto que *R. etli* apresentou indução por todos (van Rhijn et al., 1994). Isto reflete a maior capacidade adaptativa destas espécies à rizosfera do feijoeiro, a qual seria responsável pelo aumento na porcentagem de ocupação nodular por isolados deste grupo nas raízes do feijoeiro, mesmo

em condições de estresse. Ou seja, mesmo que ocorra variação nos compostos exsudados pela planta hospedeira, provocadas por condições de estresse, por exemplo, estirpes pertencentes a este grupo conseguem reconhecer estes diferentes compostos e seus genes de nodulação são ativados. O mesmo não ocorre com as estirpes competidoras, no caso de *R. tropici*, que, apesar de sua ampla ocorrência e adaptação às condições dos solos tropicais, não respondem a esta gama de compostos exsudados pelo feijoeiro e são então superadas pelas estirpes do tipo I na competição pela nodulação desta hospedeira.

As demais características relatadas em literatura indicam uma boa adaptação da espécie *R. tropici* às condições de estresse dos solos tropicais, pois tolera condições ácidas (Oliveira & Graham, 1990) e é altamente eficiente em simbiose com o feijoeiro tanto em condições de temperatura ideal para a simbiose, como sob estresse térmico aplicado após o período de infecção das raízes (Mercante, 1993). Esta espécie é também mais competitiva para ocupação nodular em feijoeiro do que *R. leguminosarum* bv. phaseoli e *R. etli*, em experimentos de coinoculação conduzidos sob condições controladas (Straliotto et al., 1991; Straliotto & Franco, 1993) e no primeiro ano de cultivo sob condições de campo (Vlassak et al., 1997). A menor ocupação nodular pela espécie *R. tropici* após cultivos sucessivos de feijoeiro não pode ser considerada uma desvantagem para o seu uso como inoculante, pois permite a sua substituição no solo a medida que os estudos de diversidade avancem e estirpes mais eficientes e adequadas sejam identificadas e recomendadas para a cultura.

Um aspecto importante que não pode ser discutido em maior detalhe, devido às limitações dos métodos de caracterização utilizados no presente estudo, é a presença significativa de estirpes de *Sinorhizobium* dentre os isolados de leucena quando a planta foi incubada a temperaturas elevadas (Figura 4). Há indicativos de que este gênero seja adaptado para nodulação em condições de estresse térmico, pois foi detectada sua presença, embora pouco significativa, também em feijoeiro quando incubado a 38°C (Figura

5). Considerando-se que a similaridade entre estes grupos foi muito grande pelo método de análise utilizado, estudos de caracterização a nível genotípico são necessários para estabelecer a real proporção de isolados pertencentes a este gênero, uma vez que em muitas das análises estes dois gêneros não se distinguiram nos dendrogramas ou ficaram muito próximos.

A maior eficiência de *R. tropici* em simbiose com o feijoeiro (Mercante et al., 1998 e esta tese) pode ser um indicativo de um processo de seleção sob condições de deficiência de nitrogênio, típica da maioria dos solos tropicais. O estudo dos fatores que interferem na sobrevivência saprofítica ou na comunicação molecular desta espécie com o feijoeiro pode auxiliar o entendimento da nodulação preferencial desta planta pelas estirpes de *R. leguminosarum*/*R. etli* no solo após sucessivos cultivos (Vlassak et al., 1996), apesar da maior eficiência e competitividade inicial de *R. tropici*. Os mecanismos envolvidos na resposta a estresses, como por exemplo, a síntese de proteínas induzidas pela exposição a temperaturas elevadas, são os mesmos mecanismos desencadeados sob outras condições de estresse fisiológicos ou ambientais (Yura et al., 1993). No solo, a bactéria está submetida a uma série de condições de estresse, que podem não ser necessariamente de temperatura, tais como deficiência hídrica ou estresses de natureza química e bioquímica. Deste modo, a elucidação dos mecanismos desencadeados sob temperaturas altas, que neste estudo resultaram na inibição da nodulação de uma espécie e favorecimento de outra, pode auxiliar o entendimento do comportamento desta espécie em condições de campo.

Como se percebe, vários aspectos necessitam ser melhor elucidados nesta interação, dentre eles estão a ecologia e dinâmica das populações pertencentes às diferentes espécies que nodulam o feijoeiro, uma planta extremamente promíscua, visando uma recomendação mais segura da prática da inoculação. A caracterização da ocorrência das diferentes populações a nível de campo, sob diferentes condições agroecológicas vai permitir o

estabelecimento das condições mais favoráveis para a sobrevivência e competitividade das espécies mais eficientes. A ocorrência frequente de isolados de rizóbio com maior eficiência na fixação de nitrogênio do que a estirpe CIAT 899 (Anyango et al., 1995; Mercante et al., 1998) ou do que uma estirpe similar em eficiência, a BR 855 (esta tese) é um indicativo dos benefícios que podem ser atingidos pelo levantamento rigoroso de grande número de isolados a partir das populações presentes nos diferentes solos. Estirpes de rizóbio mais compatíveis com a hospedeira e mais eficientes sob as diferentes condições de estresse enfrentadas nas várias condições de cultivo brasileiras podem ser obtidas através destes estudos.

3.4. CONCLUSÕES:

1. O crescimento nos meios LB e YMA a 39°C mostraram-se eficientes como indicativos da diversidade das espécies de rizóbio presente nas populações estudadas.
2. A maioria dos isolados recuperados do solo usando leucena como planta-isca crescida a temperatura ambiente foi agrupada dentro da espécie *R. tropici* (73% dos isolados).
3. A leucena crescida a 28°C recupera do solo germoplasma de rizóbio mais eficiente na fixação biológica de nitrogênio em simbiose com o feijoeiro, uma vez que mais de 80% da população recuperada nestas condições foi eficiente ou muito eficiente nesta planta, ao contrário da própria hospedeira que recupera apenas menos de 50% de isolados com estas características.
4. Houve uma menor efetividade e eficiência em feijoeiro, maior variabilidade nas características culturais avaliadas em meio de cultivo e perda de viabilidade de isolados, dentro da população de rizóbio recuperada usando o feijoeiro como planta-isca em comparação à população recuperada de leucena. Estas características foram associadas ao predomínio de isolados pertencentes ao grupo de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*/*R. etli* especialmente dentro da população recuperada de feijoeiro a temperatura elevada.
5. As populações recuperadas do solo utilizando o feijoeiro como planta-isca, tanto crescido a temperatura ambiente como a 38°C, apresentaram uma grande diversidade morfofisiológica, sendo que aproximadamente metade dos isolados não puderam ser classificados dentro das espécies conhecidas de rizóbio que nodulam esta planta.

6. A temperatura de crescimento das plantas afetou as populações de rizóbio efetivas tanto em leucena, planta tolerante a temperatura elevada, como em feijoeiro, hospedeira sensível a este estresse, resultando numa maior diversidade dos isolados recuperados dos nódulos.
7. A porcentagem de isolados que se agruparam como *R. tropici* recuperados tanto de feijoeiro como de leucena crescidos a temperatura elevada apresentou um significativo decréscimo em relação à população recuperada a temperatura ambiente.
8. Houve um aumento na porcentagem de isolados que se agruparam com *R. leguminosarum* bv. phaseoli/*R. etli*, quando as hospedeiras foram crescidas a temperatura elevada, o que pode ser explicado em função de sua maior diversidade genotípica e consequente maior adaptação para nodulação sob diferentes condições agroecológicas.

4. CAPÍTULO II:

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE RIZÓBIO QUE NODULA O FEIJOEIRO ATRAVÉS DA ANÁLISE DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DA DNAr 16S AMPLIFICADO POR PCR (ARDRA).

4.1. INTRODUÇÃO:

O rizóbio que nodula o feijoeiro pertence a um grupo de bactérias bastante diverso (Crow et al., 1981; Piñero et al., 1988; Martínez-Romero et al., 1991; Eardly et al., 1992; Laguerre et al., 1993b; Eardly et al., 1995; van Berkum et al., 1996). Atualmente são descritas 5 espécies nodulando este hospedeiro em condições de campo: *R. leguminosarum* biovar phaseoli (Jordan, 1984); *R. etli* (Segovia et al., 1993); *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991) e as espécies recém descritas *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger et al., 1997). Não há ainda relatos de ocorrência desta últimas em condições tropicais, sendo as espécies de *R. etli* e *R. tropici* consideradas as de maior importância ecológica nestes solos.

Em experimentos de inoculação artificial em laboratório, diversas espécies de rizóbio assim como *Sinorhizobium* e estirpes isoladas de leguminosas florestais foram relatadas como capazes de nodular o feijoeiro (Wilson et al., 1944; Lange, 1961; Bromfield & Barran, 1990; Bal et al., 1982; Herrera et al., 1985; Eardly et al., 1985;

Sadowstky et al., 1988; Martínez-Romero et al., 1991; Hungria et al., 1993; Thomas et al., 1994; Hernandez-Lucas et al., 1995.).

R. leguminosarum bv. phaseoli e *R. etli*, anteriormente descrito como *R. leguminosarum* bv. phaseoli do tipo I (Martínez et al., 1988), possuem muitas cópias dos genes *nifH* (Quinto et al., 1982; Martínez et al., 1985) e inicialmente foram descritas como possuidoras de um círculo restrito de hospedeiras. O seu DNA hibridiza com o gene *psi* (“polysaccharide inhibition”) (Borthakur et al., 1985) e os seus genes *nodABC* não se encontram organizados em um único operon (Davies & Johnston, 1990; Vázquez et al., 1991). Os isolados americanos com estas características foram classificados como *R. etli* ficando a definição de *R. leguminosarum* bv. phaseoli para os isolados não americanos, os quais originaram-se pela transferência do plasmídeo simbiótico de *R. etli* para o genoma de *R. leguminosarum* (Segovia et al., 1993).

R. tropici (Martínez-Romero et al., 1991), foi previamente classificada como *R. leguminosarum* bv. phaseoli do tipo II. Estirpes pertencentes a esta espécie tem uma única cópia dos genes *nifH*, um amplo ciclo de hospedeiras, que inclui a *Leucaena leucocephala* e não hibridizam com o gene *psi* (Martínez et al., 1985; Martínez et al., 1988). São estirpes consideradas geneticamente estáveis, mantendo seu plasmídeo simbiótico após prolongada incubação a 37°C, embora esta estabilidade dos plasmídeos da espécie esteja atualmente sendo questionada pela variabilidade observada nesta característica entre isolados distintos (Amaral & Baldani, 1999). Algumas estirpes são consideradas tolerantes ao calor (Karanja & Wood, 1988b) ou a acidez e alumínio (Graham et al., 1982; Cunningham & Munns, 1984; Vargas & Graham, 1988). A espécie foi subdividida em dois subgrupos (Martínez-Romero et al., 1991) chamados de IIA e IIB. O subgrupo IIB cresce em meio LB, é resistente a diversos antibióticos e a metais pesados (Martínez-Romero et al., 1991), em contraste com o subgrupo IIA e a *R. etli* que não apresentam estas características. Estas características tem sido consideradas como

vantajosas para a sobrevivência saprofítica e competição em condições de campo. Além disso, estirpes pertencentes a este subgrupo apresentam uma recuperação mais rápida da atividade da nitrogenase do que estirpes de *R. etli* após exposição a um choque térmico de temperaturas elevadas aplicado durante 3 dias nas raízes noduladas de feijoeiro.

A caracterização da ocorrência destas diferentes espécies em condições de campo é muito importante para que se possa estabelecer a dinâmica destas diferentes populações. A distinção de *R. tropici* das demais espécies baseada na sua capacidade de nodular outras hospedeiras além do feijoeiro, como a leucena (*L. leucocephala*), mostrou-se inadequada (Hernandez-Lucas et al., 1995), e os demais métodos de caracterização fenotípica estão sujeitos a grande variabilidade, tais como o crescimento a altas temperaturas em meio LB (Van Berkum et al., 1994; Hungria e Vargas, 1997 em Hungria et al., 1997).

Num extensivo levantamento do rizóbio que nodula o feijoeiro em solos da Bahia e Espírito Santo, foi detectado um significativo número de isolados pertencentes ao gênero *Sinorhizobium*. No entanto, apesar de o método utilizado para caracterização considerar o crescimento em diferentes fontes de carbono, devido ao grande número de isolados manipulados não foi possível estabelecer com segurança a real proporção de ocorrência deste gênero (Straliotto et al., 1999). Além disso, neste estudo e em outro extensivo levantamento da ocorrência de rizóbio que nodula o feijoeiro em solos de Cerrado (Mercante et al., 1998) foi observado um grande número de isolados que não puderam ser incluídos em nenhuma das espécies conhecidas de rizóbio. Estes estudos demonstram a necessidade de proceder uma caracterização mais detalhada do material genético como primeiro passo a exploração de suas características adaptativas aos solos tropicais.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Estirpes bacterianas utilizadas e condições de crescimento: As estirpes de referência utilizadas neste estudo foram: *Azorhizobium caulinodans* BR5410; *R. tropici* IIA BR10016; *R. tropici* IIB BR322; *Agrobacterium tumefaciens* GMI9023; *R. etli* BR10026; *R. leguminosarum* bv. phaseoli BR10052; *R. leguminosarum* bv. viciae BR620; *R. galegae* BR10055; *S. fredii* BR112; *S. meliloti* BR7410; *Mesorhizobium loti* BR7801; *Bradyrhizobium japonicum* BR 111; *B. elkani* BR29.

Os isolados utilizados nesta etapa do trabalho foram selecionados a partir dos dendrogramas de similaridade obtidos pela análise fenotípica descrita no Capítulo I. Para esta análise foram escolhidos no mínimo 10% dos isolados dentro de cada agrupamento distinto para comparação com as diferentes espécies de rizóbio selecionadas como referência. No total foram analisados 81 isolados.

Os isolados e as estirpes de referência foram recuperados de ampolas contendo células liofilizadas e crescidos em meio YMA para verificação da pureza e características de crescimento típicas das diferentes espécies e isolados. As culturas foram crescidas em meio TY sólido inclinado por no máximo 1 (bactérias de crescimento rápido) a 2 (bactérias de crescimento lento) dias e imediatamente submetidas à extração do DNA.

4.2.2. Extração do DNA bacteriano: Dois métodos foram testados para extração do DNA para posterior amplificação do DNAr 16S: o método de fervura e o da lise

alcalina. O método de fervura consistiu em suspender a cultura em 0,5 mL de água destilada estéril e proceder a fervura por 10 min em tubos eppendorf em banho-maria. Foram retirados 25 uL para a reação de amplificação. O método da lise alcalina utilizou NaOH para extração do DNA nuclear, o qual ao mesmo tempo inativa as nucleases durante a extração, aumentando a eficiência da reação de PCR (Wang et al., 1993). Após crescimento em meio TY sólido inclinado, as células bacterianas foram suspensas suavemente em água destilada estéril com auxílio de uma alça de platina. A suspensão celular foi então submetida a duas lavagens sucessivas em água destilada estéril. Após a última centrifugação, as células foram suspensas em 500uL de NaOH (0,5N) sob leve agitação. Desta suspensão, 5uL são rapidamente transferidos para 495uL de uma solução TrisHCl (20mM; pH 8,0). A amostra foi preservada em freezer a -20°C para as reações de amplificação posteriores.

4.2.3. Reação de Amplificação do DNAr 16S: As sequências dos primers utilizados são: Y1: 5'-TGG CTC AGA ACG AAC GCT GGC GGC-3' (Young et al., 1991) e Y3: 5' TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC CAG TC-3' (desenvolvido por J.P.W. Young, citado em Haukka, 1997). A mistura de reação foi preparada com 2mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de cada dNTP; 0,05% de Tween 20; 5pmol/ul de cada primer e 1U de Taq polimerase sendo que a mistura de reação foi diluída com água destilada estéril para PCR (Milli-Q) em tampão apropriado para a enzima conforme concentração sugerida pelo fabricante. Para cada reação de amplificação foram utilizados 25 ul da mistura de reação e 25 ul do DNA extraído. As reações foram preparadas em gelo, seladas com óleo mineral e submetidas aos ciclos de temperatura (uma desnaturação inicial a 93°C , 2min.; a seguir 34 ciclos de desnaturação a 93°C , 45s; anelamento a 62°C , 45s; e extensão 72°C , 2min.; e um ciclo de extensão final a 72°C , 5min.) em um termociclador Perkin-Elmer Cetus Corp. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose (1%) em tampão

TBE (0,5), a 5V/cm. O marcador de peso molecular utilizado foi 1Kb DNA Ladder (Gibco BRL).

4.2.4. Digestão do DNA: Os produtos de amplificação foram digeridos com as seguintes endonucleases: *Alu* I; *Rsa* I; *Taq* I; *Sau3a* I; *Hinf* I; *Msp* I; *Dde* I e *Hae* III. Alíquotas de 5 ul do produto de PCR foram digeridas com 2,5U da enzima, diluída em tampão específico, perfazendo um volume de reação de 10 ul. A mistura de reação foi incubada durante a noite a 37°C. Os produtos da digestão foram analisadas em gel de agarose do tipo Metaphor (FMC) a 3,5% a uma voltagem inicial de 80V, até a saída da amostra dos poços, seguida de uma voltagem de até 120V , durante o restante da corrida. Os marcadores de peso molecular utilizados foram øX174 RF DNA *Hae* III Digest (Biolabs, New England) ou 123 bp DNA Ladder (Gibco BRL).

4.2.4. Análise de Agrupamento: Em todas as análises, apenas as bandas que puderam ser claramente distintas das demais, intensas e consistentes em diferentes análises foram consideradas. A matriz de similaridade foi construída baseada na presença ou ausência de bandas, de acordo com o coeficiente de DICE, utilizando o programa NTSYS. Esta matriz foi utilizada para proceder a análise hierárquica de agrupamento baseada no método UPGMA (Unweighted Pair Group Analysis) (Sokal & Michener, 1958).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que as reações de PCR requerem apenas quantidades mínimas de DNA para uma boa amplificação e possuem boa tolerância em relação a preparações cruas de DNA, é possível extrair DNA suficiente para as amplificações através de protocolos simples. Devido ao grande número de isolados a serem manipulados nesta etapa (83 isolados), inicialmente foram testados dois métodos de amplificação para obtenção de extrato bruto DNA para as reações de amplificação do DNAr 16S, a extração alcalina e o método da fervura. Conforme pode ser visto nas Figura 1, as amplificações obtidas do DNA após fervura das células apresentam grande número de falhas, ou seja, amostras que não amplificam, outras que produzem quantidade pequena de produto amplificação e a presença de produtos inespecíficos (vide setas brancas na Figura 2). O método de extração de DNA através da lise alcalina mostrou-se muito eficiente, permitindo um melhor rendimento das amplificações subsequentes do DNAr 16S. Praticamente não se detectou falha nas amplificações e uma quantidade bem menor de reações inespecíficas, em comparação com as amostras de DNA obtidas pelo método da fervura. A Figura 2 mostra num mesmo gel amostras com bom nível de amplificação, nas quais se pode comparar os dois métodos de extração em relação ao aparecimento de bandas correspondentes a reações inespecíficas.

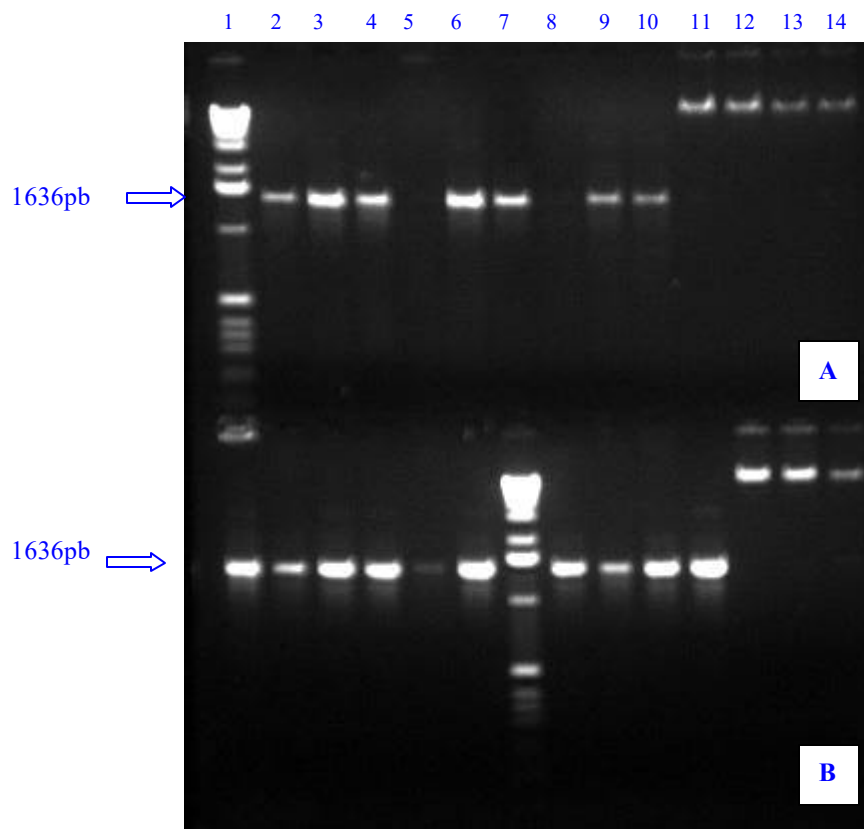


Figura1: Reação de amplificação do DNA obtido pelo método da fervura. **(A)** 1– marcador de peso molecular 1Kb; 2 a 10: estirpes de referência; 2- BR112; 3- BR10055; 4- BR10052; 5- BR10026; 6- *A. rhizogenes*; 7- GMI9023; 8- BR322 Mex (isolado resistente a rifampicina); 9- BR322; 10- BR5410; 11 a 14: concentrações decrescentes de DNA 40, 20, 10 e 5 ng.µL⁻¹ **(B)** 1-BR322 (extrato bruto guardado a -20° C antes da amplificação); 2- BR112; 3- BR1055; 4- BR10052; 5-BR10026; 6-*A. rhizogenes*; 7- marcador de peso molecular (1Kb); 8- GMI9023; 9- BR322 Mex; 10- BR322; 11- BR5410; 12 a 14: concentrações decrescentes de DNA: 40, 20 e 10 ng.µL⁻¹.

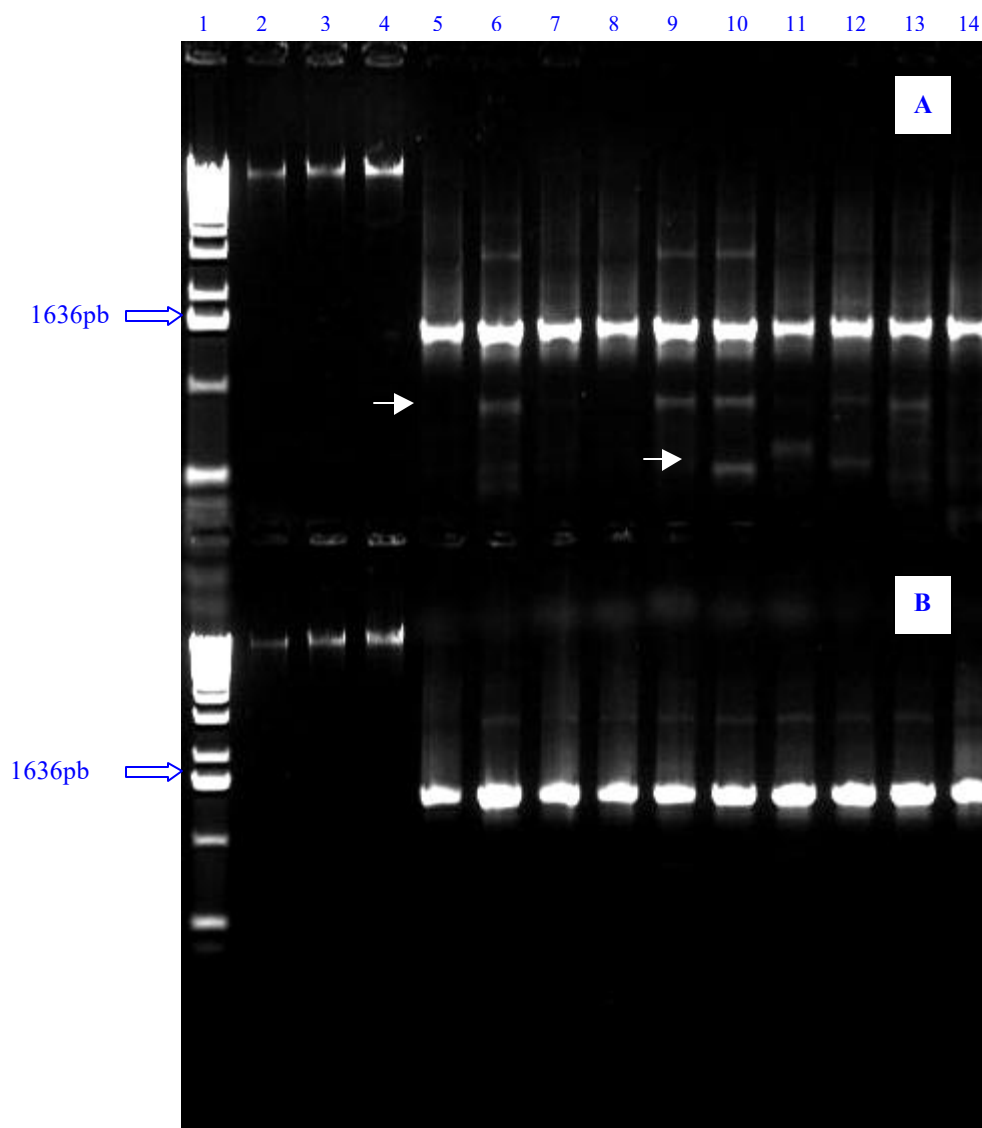


Figura 2: Reação de amplificação do DNA obtido através do método da fervura (**A**) e da lise alcalina (**B**) mostrando a ocorrência de reações inespecíficas em (A) para amostras com padrão semelhante de concentração do produto da amplificação. 1: marcador de peso molecular (1Kb); 2 a 4: concentrações crescentes de DNA :10, 20 e 40 ug.ul⁻¹; 5: BR5410; 6 – BR322; 7 – GMI9023; 8 – *A. rhizogenes*; 9 – BR10026; 10 – BR10055; 11 – BR112; 12 – BR7411; 13 – BR78901; 14 – BR111.

Para todas as estirpes padrão e para os isolados utilizados, as reações de amplificação com os primers Y1 e B3 resultaram em um produto amplificado de aproximadamente 1500pb (Figuras 2 e 3). As quantidades de DNA obtidas apresentaram uma alta eficiência de amplificação e pureza dos produtos.

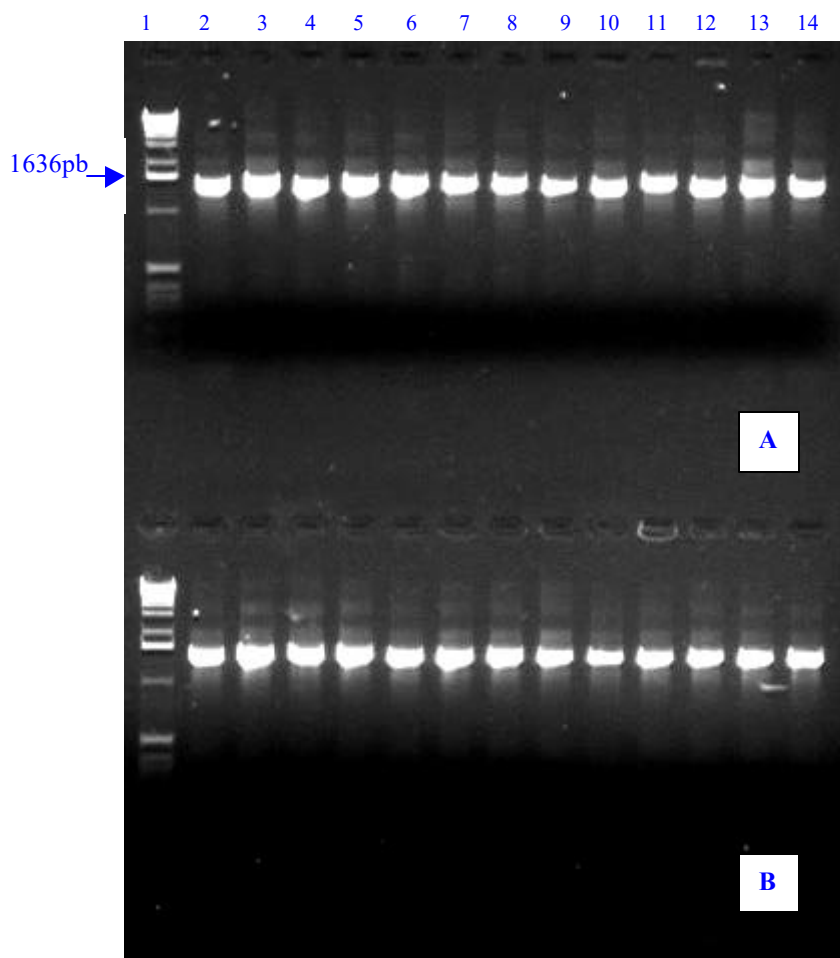


Figura 3: Amplificação do DNA dos isolados de leucena e feijoeiro extraído pelo método de lise alcalina. **(A)** Amostras 2 a 9: isolados de leucena segundo numeração sequencial de L26 a L34; amostras 10 a 14: isolados de feijoeiro F35 a F39. **(B)** Amostras 2 a 14: isolados de feijoeiro: F39 a F51. O padrão de peso molecular utilizado (1) foi o 1Kb DNA ladder (GIBCO BRL).

Os padrões de restrição foram analisados através várias fotos de um mesmo gel, obtidas durante a corrida de eletroforese, uma vez que os fragmentos menores podem ser melhor analisados no início da corrida, desaparecendo ou ficando de difícil distinção no final. As figuras 4 e 5 mostram padrões sequenciais de restrição como exemplo.

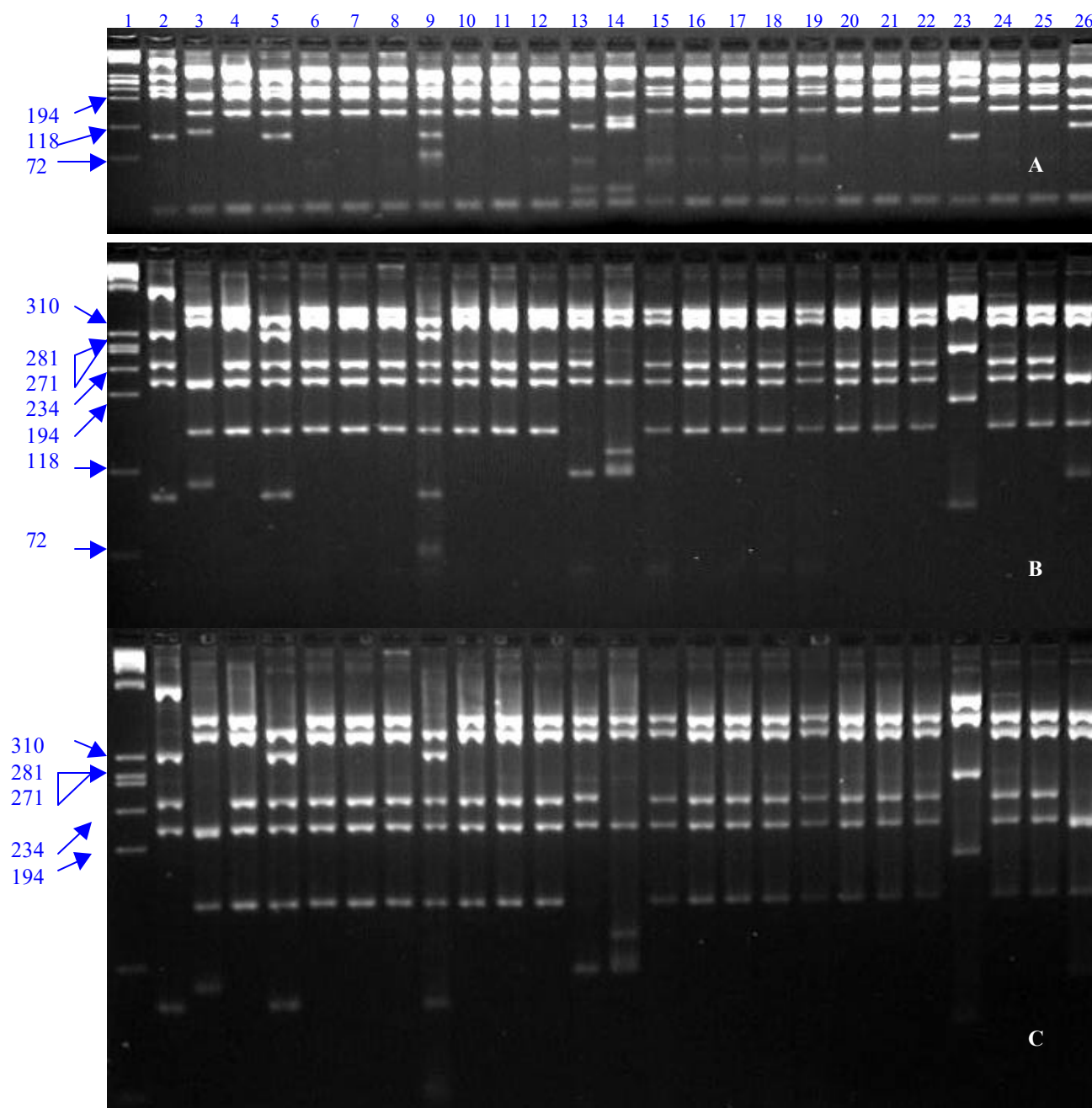


Figura 4: Padrões de restrição do DNAr 16S, obtidos pela incubação com a enzima *Dde* I. Fotos dos géis (Metaphor-FMC a 3,5%, 120V) após 2 (A), 4 (B) e 6 (C) horas de corrida. Observar o desaparecimento das bandas comparando com o padrão de peso molecular (PhiX174 RF DNA *Hae* III Digest, BioLabs) corredor (1). (2): *A. caulinodans*-BR5410; (3): *R. tropici* IIA-BR10016; (3): *R. tropici* IIB-BR322; (4) *A. tumefaciens*-GMI9023; (5) *R. etli*-BR10026; (6) *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*-BR10052; (7) *R. leguminosarum* bv. *viciae*-BR620; (8) *R. galegae*-BR10055; (9) *S. fredii*-BR112; (10) *S. meliloti*-BR7410; (11) *M. loti*-BR7801; (12) *B. japonicum*-BR111; (13) *B. elkanii*-BR29; (14 a 26) isolados de *Leucaena* L1 a L13.

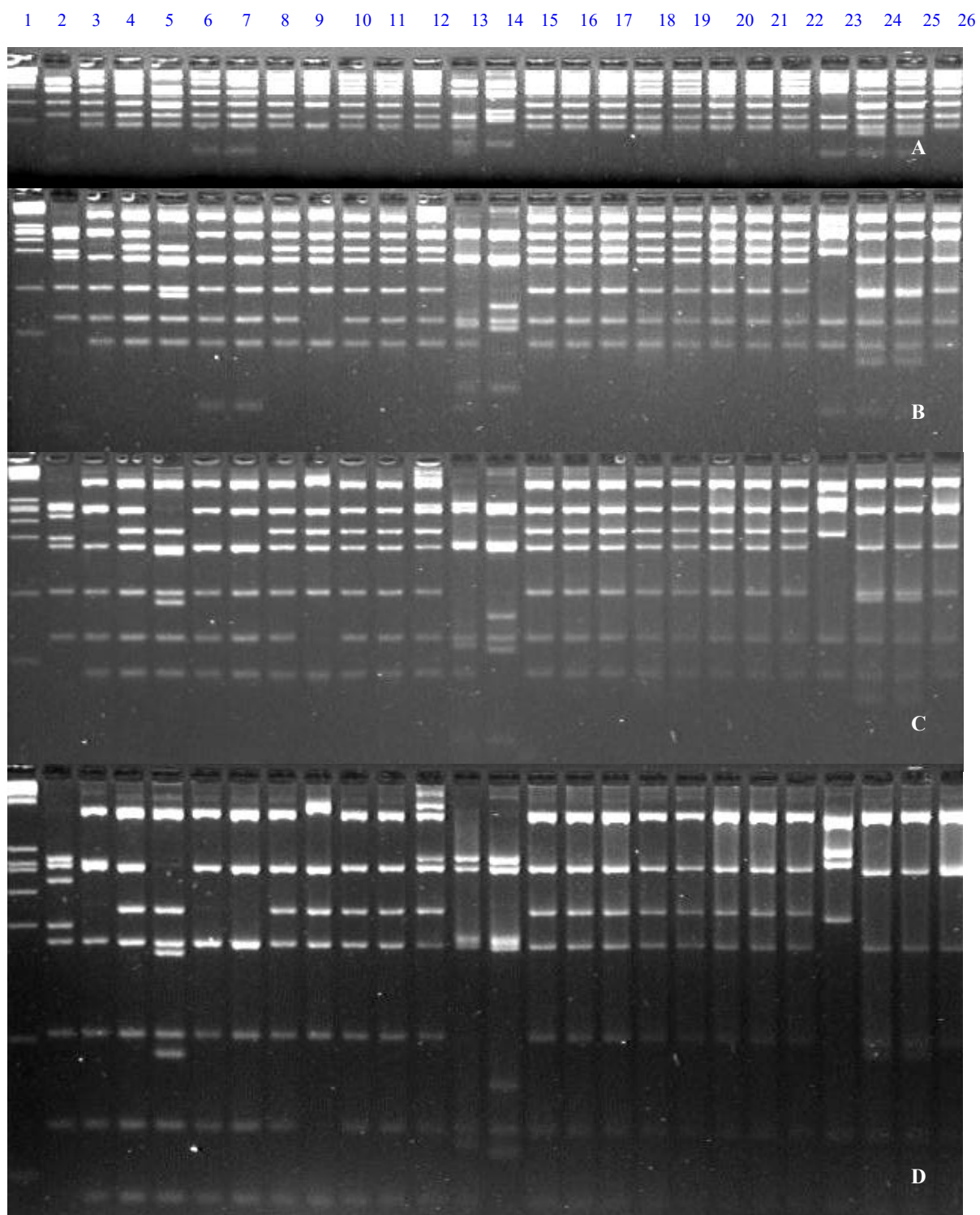


Figura 5: Padrões de restrição do DNAr 16S, obtidos pela incubação com a enzima *Hae* III. Sequência de fotos dos géis (Metaphor-FMC a 3,5%, 120V) de restrição após 1 (A), 2 (B) e 4 (C) e 6 (D) horas de corrida. Amostras conforme Figura 4. Padrão de peso molecular PhiX174 RF DNA *Hae* III Digest, BioLabs.

O avaliação do perfil de bandas de RFLP, assim como em outros métodos de análise do tipo “fingerprinting”, é baseado na ausência ou presença de bandas. Deste modo ausência ou presença de um sítio de restrição (o qual é de fato um caráter divergente) não é escoreado como um único caráter divergente mas como três. Por exemplo, quando um segmento do genoma, na população A tem um sítio de restrição e um fragmento homólogo na população B não possui: o perfil de A mostrará 2 bandas, enquanto que o perfil de B mostrará apenas uma banda de peso molecular maior. Consequentemente, neste exemplo, um caráter divergente, a presença/ausência de um sítio de restrição, será escoreado como três. Um modo de evitar este problema é construir um mapa de restrição, em vez de proceder a comparação direta. O mapeamento é feito através do padrão de restrição dos fragmentos para deduzir um mapa de sítios enzimáticos, os quais então se tornam a unidade de análise. Entretanto, na prática, o mapeamento não é sempre possível devido a complexidade dos padrões, e devido à mutações no comprimento dos fragmentos (inserções e deleções) (Leal, 1996). Devido ao grande número de isolados analisados resultando num padrão de bandas bastante complexo para cada uma das oito enzimas de restrição utilizadas, neste trabalho foi utilizado apenas o escoreamento das bandas segundo a presença/ausência para a análise de similaridade entre os isolados.

O dendrograma de similaridade resultante (Figura 5) mostra que a maioria do isolados distribui-se dentro de agrupamentos semelhantes às espécies *R. tropici* IIA, *R. leguminosarum*/*R. etli* (estirpes do tipo I) e *Sinorhizobium* sp. Os isolados de leucena agruparam-se principalmente junto com as espécies de *R. tropici* e *Sinorhizobium*, sendo que nenhum dos isolados desta população foi similar às estirpes do tipo I. É interessante observar que dentre os isolados de feijoeiro houve uma distinção quanto às populações recuperadas sob diferentes temperaturas de crescimento da planta-isca, sendo que a

população recuperada a altas temperaturas apresentou isolados representativos em cada um dos grupos principais (*R. tropici*, estirpes do tipo I e *Sinorhizobium*),

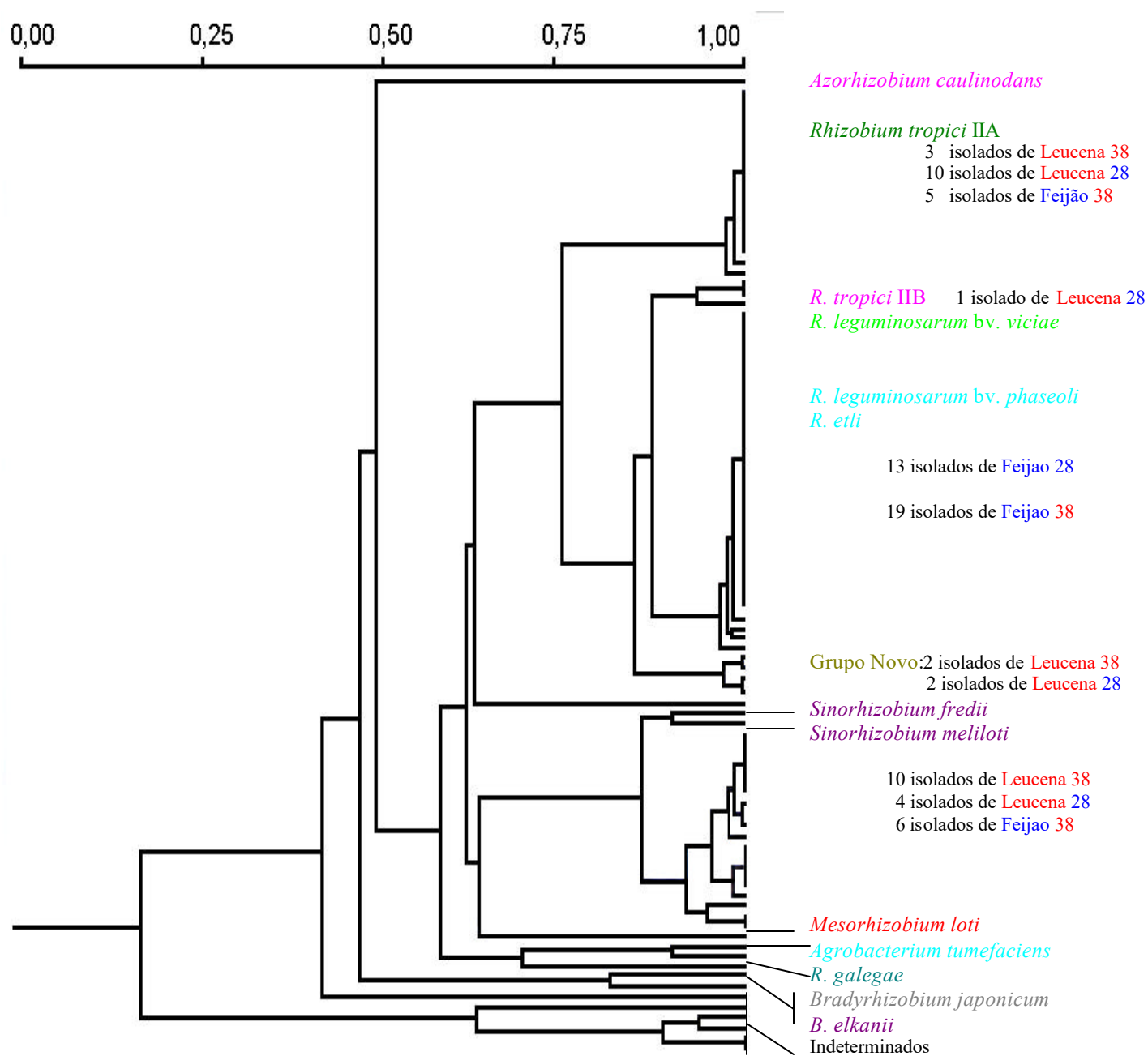


Figura 6: Dendrograma de agrupamento dos 83 isolados representativos dos grupos fenotípicos obtidos no Capítulo I. As distâncias foram derivadas da fração de fragmentos de digestão do DNAr 16S compartilhados (DICE) conforme descrito em Material e Métodos.

Para a população recuperada de feijoeiro a temperatura ambiente, a totalidade dos isolados que puderam ser genotipicamente classificados agrupou-se com as estirpes do tipo I, ou seja, foram semelhantes ao grupo que compreende as espécies *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*/*R. etli*. Vale ressaltar que os isolados apresentados neste dendrograma são representativos dos grupos fenotípicos obtidos no Capítulo I, e a correspondência entre estes dois tipos de análises encontra-se na Tabela 1. O nível de concordância entre as análises ficou entre 50 e 60%, uma vez que para os isolados genotipicamente determinados como pertencentes ao grupo de *R. tropici* IIA, 59% haviam sido fenotipicamente classificados dentro deste grupo. Para os isolados de *Sinorhizobium*, a caracterização fenotípica teve uma porcentagem de acerto de 52%. Para os isolados do tipo I, 50% haviam sido fenotipicamente classificados como pertencentes a este grupo.

Entretanto, apesar destes baixos valores de concordância entre a caracterização fenotípica e genotípica, a análise global dos resultados levou a conclusões bastante semelhantes sobre a diversidade encontrada nestas populações. Nas duas análises houve predomínio das estirpes de *R. tropici* IIA entre os isolados de leucena crescida a temperatura ambiente (Figura 7, Figuras 4 do Capítulo I), sendo o segundo grupo mais abundante pertencente aos isolados de *Sinorhizobium*. Estes haviam sido fenotipicamente classificados num grupo único juntamente com as estirpes do tipo I (Figura 4, Capítulo I). Poucos isolados foram classificados como *R. tropici* IIB, sendo que o grupo fenotipicamente determinado como pertencente a este grupo, compreendendo os isolados representativos L23 e L24, num grupo que compreendia 13 isolados, foram classificados por ARDRA como do tipo IIA, e o grupo GII, com 4 isolados, bastante próximo a este, foi genotipicamente enquadrado como IIB. A existência de isolados de *R. tropici* com características fenotípicas intermediárias entre os dois grupos IIA e IIB é um dos fatores que tem impedido a distinção destes grupos em duas espécies diferentes (Esperança Martínez, comunicação pessoal).

Tabela 1: Caracterização por ARDRA dos isolados representativos dos diferentes grupos fenotípicos obtidos pela análise de similaridade no Capítulo I. São mostrados na tabela ao agrupamento fenotípico inicial dos isolados representativos analisados por ARDRA⁽¹⁾ e o número de isolados pertencente ao seu grupo fenotípico⁽²⁾. Os isolados representativos estão apresentados de acordo com a planta-isca e a temperatura de crescimento (28 e 38°C) utilizada na sua recuperação do solo.

Grupos de espécies definidas por ARDRA	Isolados representativos de grupo fenotípico	Grupo fenotípico ⁽¹⁾	Número de isolados pertencente ao grupo fenotípico ⁽²⁾
<i>R. tropici</i> IIA	L38: L12, L13, L14.	Grupo VI (leucena 38)	16
	L28: L19, L22,	Tipo I	3
	L28: L23, L24,	<i>R. tropici</i> IIB	13
	L28: L26, L27, L28, L29, L30, L31.	<i>R. tropici</i> IIA	75
	F38: F55, F56	Grupo IX (feijão 38)	9
	F38: F57, F58	Grupo X (feijão 38)	7
	F38: F61.	<i>R. tropici</i> IIB	4
Tipo I	F28: F69; F70; F71; F72	<i>R. tropici</i> IIB	26
	F28: F73, F74	<i>R. tropici</i> IIA	8
	F28: F76, F77	Tipo I	10
	F28: F75, F82, F79, F78, F81, F82	Miscelânea de grupos fenotípicos	17
	F38: F35, F36, F37, F38, F39, F40, F41, F42, F43, F44	Tipo I	84
	F38: F54	Grupo VII (feijão 38)	14
	F38: F59, F60	<i>R. tropici</i> IIB	8
	F38: F48, F51, F62, F63, F64, F65	Miscelânea de grupos fenotípicos	20
<i>Sinorhizobium</i> sp	L28: L18, L20, L21, L32	Tipo I/ <i>Sinorhizobium</i>	19
	L38: L1, L2	Tipo I	14
	L38: L3, L4, L5, L16, L17	<i>Sinorhizobium</i>	25
	L38: L6, L7	Grupo I (leucena 38)	8
	L38: L8	Grupo II (leucena 38)	5
	F38: F49, F50	<i>Sinorhizobium</i>	4
	F38: F45, F46	Grupo I (feijão 38)	9
	F38: F47, F52	Grupos II e V (leucena 38)	8
<i>R. tropici</i> IIB	L28: L25	Grupo II (leucena 28)	4
Grupo novo	L28: L33, L34	Grupo III (leucena 28)	8
	L38: L10, L11	Grupo IV (leucena 38)	14
Indeterminados ⁽³⁾	F28: F66, F67, F68	Grupo I (feijão 28)	30
	F28: F80	Isolado não agrupado	1
	F38: F53	Grupo VII (feijão 38)	17
	L38: L9	Grupo III (leucena 38)	6

No grupo dos indeterminados ⁽³⁾ encontram-se 4 isolados representativos agrupados no final da árvore de ARDRA, provavelmente não pertencentes a grupo dos rizóbios.

Para os isolados de leucena recuperados a altas temperatura, o maior agrupamento dos isolados que mostraram-se fenotipicamente semelhantes às estirpes de referência, pertencia ao gênero *Sinorhizobium*, com 20% de isolados, seguido pelas estirpes do tipo I com 13%, num total de 33% de isolados pertencentes a estes dois grupos. Por ARDRA determinou-se que *Sinorhizobium* é a espécie mais abundante nesta população (Figura 7), sendo que os isolados que haviam sido fenotipicamente caracterizados como do tipo I, pertencem ao gênero *Sinorhizobium* por ARDRA. Deste modo a leucena não recuperou isolados pertencentes às espécies *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* / *R. etli*.

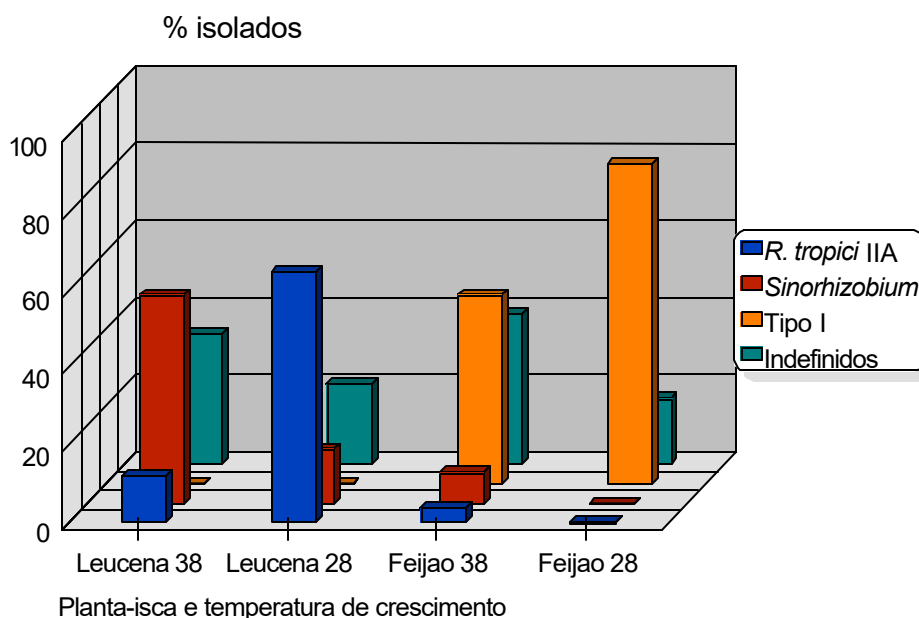


Figura 7: Distribuição dos isolados dentro das espécies definidas por ARDRA, de acordo com a planta-isca e temperatura de crescimento utilizada para recuperação do rizóbio do solo.

Dentre os isolados obtidos do feijoeiro, houve predomínio pela análise por ARDRA de estirpes do tipo I tanto a temperatura ambiente quanto a temperaturas elevadas. Neste caso vale ressaltar que nenhum dos isolados representativos de feijoeiro crescido a 38°C foi classificado como *R. tropici*. Os isolados que haviam sido fenotipicamente considerados

semelhantes a esta espécie, mostraram-se semelhantes às estirpes do tipo I por ARDRA. Vale ressaltar que os dados de literatura demonstram a grande diversidade fenotípica entre os isolados de feijoeiro e que dados de diversos autores comprovam a diversidade fenotípica e genotípica das estirpes do tipo I (Piñero et al., 1988; Souza et al., 1994). Estas observações foram feitas no Capítulo I, de modo que as conclusões sobre a diversidade das populações recuperadas de feijoeiro baseadas apenas em características fenotípicas ficaram comprometidas pela necessidade de uma análise genotípica mais detalhada. No entanto, o predomínio dos isolados do tipo I na população recuperada de feijoeiro a temperaturas elevadas foi confirmada pela análise genotípica. A ocorrência de isolados de *Sinorhizobium* dentro da população isolada de feijoeiro só foi observada, tanto na análise fenotípica quanto na genotípica, dentro da população recuperada a temperaturas mais elevadas.

A característica de nodulação da leucena, anteriormente um dos parâmetros para identificação de isolados de feijoeiro como pertencentes à espécie *R. tropici*, já tem sido questionada em literatura (Hernandez-Lucas et al., 1995) uma vez que a leucena é uma planta de nodulação promíscua (Swellim et al., 1997). Os isolados, predominantes em solos ácidos, caracterizados por Anyango et al. (1995) como pertencentes à espécie *R. tropici* baseado na nodulação de leucena, pertenciam a três padrões genômicos de restrição distintos, o que pode significar a ocorrência de outras espécies ou mesmo gêneros dentro desta população. O gênero *Sinorhizobium*, capaz de nodular esta planta tem sido relatado em solos africanos usando o feijoeiro como planta-isca (Murphy et al., 1997; Mhamdi et al., 1999). Este trabalho é o primeiro relato da ocorrência deste gênero como simbionte do feijoeiro em nossos solos, embora sua ocorrência tenha sido associada a condições de estresse térmico. Os levantamentos anteriores da diversidade do rizóbio em solos tropicais brasileiros talvez não tenham sido capazes de detectar a ocorrência do gênero por problemas metodológicos (Mercante et al., 1988).

A predominância de estirpes do tipo I (*R. leguminosarum*) entre isolados de feijoeiro em solos brasileiros também é relatada por Pereira et al. (1999) em solos da Amazônia. No entanto, em solos ácidos brasileiros a distribuição das espécies baseada na análise de restrição da região intergênica do RNAr 16S-23S e do RNAr 16S, indicou que a predominância de *R. tropici* do tipo IIB, cerca de 50% dos isolados, enquanto que as espécies do tipo I (*R. leguminosarum*) representaram 33% da população (Andrade et al., 1999). Como se percebe, estudos de levantamento da predominância destas populações em solos brasileiros são indispensáveis visando caracterizar a diversidade presente e orientar as recomendações de inoculação de estirpes mais adaptadas aos diversos sistemas agroecológicos.

A tabela de eficiência dos isolados apresentada no Capítulo I foi refeita, através do agrupamento dos isolados genotipicamente caracterizados como pertencentes às diferentes espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro (Tabela 2). Observa-se, confirmando a análise anterior, uma maior porcentagem de isolados eficientes dentro da população de *R. tropici* IIA e *Sinorhizobium*. É bastante significativa a proporção de isolados pertencentes a estes dois grupos com eficiência superior quando inoculados em feijoeiro, 75% dos isolados de *Sinorhizobium* encontram-se dentro destes grupos mais eficientes e cerca de 90% dos isolados de *R. tropici* IIA. Os isolados do tipo I distribuem-se dentro dos diferentes grupos de eficiência, apresentando maior variabilidade para esta característica, entretanto, apresentam uma maior porcentagem de perda de infectividade, conforme já observado. Cerca de 40% dos isolados pertencentes às espécies *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*/*R. etli* enquadram-se dentro dos grupos mais eficientes.

A eficiência de isolados de *Sinorhizobium* em feijoeiro foi analisada por Sadowski et al. (1988), os quais apresentaram grande variação na capacidade de nodular e na eficiência simbiótica quando inoculados em uma cultivar comercial e em genótipos introduzidos de diferentes procedências geográficas. Embora os genótipos tenham apresentado nodulação

abundante com uma estirpe de *R. leguminosarum*, sua eficiência simbiótica foi menor do que a da cultivar comercial. Por outro lado esta cultivar apresentou uma nodulação insignificante quando inoculada com isolados de *R. (Sinorhizobium) fredii* (máximo de 5 nódulos). O mesmo resultado foi observado com maioria dos genótipos, exceto para um genótipo coletado na Costa Rica, que apresentou maior nodulação e acúmulo de nitrogênio do que os demais quando inoculado com *Sinorhizobium*.

Tabela 2: Eficiência dos isolados recuperados de leucena e feijoeiro nas duas temperaturas de crescimento das plantas, agrupados segundo a análise genotípica por ARDRA. A eficiência foi avaliada como a relação entre o peso da parte aérea seca das plantas de feijoeiro inoculadas com cada isolado em relação ao peso das plantas inoculadas com a estirpe BR 855 (PPAI/PPABR855). Plantas crescidas conforme descrito na seção Material e Métodos do Capítulo I.

Principais Grupos	Inefetivos ⁽¹⁾	Ineficientes ⁽²⁾	Eficiência Moderada ⁽³⁾	Eficientes ⁽⁴⁾	Muito eficientes ⁽⁵⁾
<i>R. tropici</i> IIA					
L38	0	2	2	7	0
L28	0	0	2	19	20
F38	0	0	0	5	1
Total	0	2 (4%)	4 (7%)	31 (53%)	21 (36%)
<i>Sinorhizobium</i>					
L38	3	8	1	23	13
L28	0	1	0	3	5
F38	1	1	2	4	3
Total	4 (6%)	10 (15%)	3 (4%)	30 (44%)	21 (31%)
Tipo I					
F38	14	18	10	18	7
F28	5	11	5	6	9
Total	19 (18%)	29 (28%)	15 (15%)	24 (23%)	16 (15%)

⁽¹⁾ isolados que não nodularam após período de dois anos de estocagem; relações PPAI/PPABR855: até 0,60 ⁽²⁾; 0,61 a 0,80 ⁽³⁾; 0,81 a 1,20 ⁽⁴⁾; maior que 1,20 ⁽⁵⁾.

A característica de certa seletividade apresentada por este gênero, sua ocorrência significativa em nossos solos e a eficiência simbiótica quando inoculado na cultivar Carioca 80, conforme relatado neste trabalho, abrem perspectivas para estudos de especificidade hospedeira com evidentes implicações práticas para o uso da tecnologia de inoculação do feijoeiro em condições de campo.

A conclusão mais importante destas análises é que a leucena apresenta-se como excelente planta-isca para recuperar isolados de *R. tropici* e *Sinorhizobium*, e que estes gêneros apresentam maior porcentagem de isolados eficientes quando inoculados em feijoeiro. No entanto a diversidade dos isolados recuperados de feijoeiro é completamente distinta daquela presente nos isolados recuperados de leucena. A maior porcentagem de isolados ineficientes, mas predominantes na população que nodula o feijoeiro explica a dificuldade de se obter bons rendimentos nesta cultura sob condições simbióticas a nível de campo. Estes estudos de diversidade mostram também, que apesar de menos frequente, é possível obter-se isolados bastante eficientes dentro da população do tipo I, no entanto suas características de instabilidade genética, demonstrada pela perda de infectividade mais frequente neste grupo não incentivam o retorno ao uso destas espécies para inoculação. As perspectivas mais atraentes continuam sendo a busca de isolados mais competitivos dentro da população de *R. tropici* IIA e talvez a tentativa de encontrar especificidade dentro do grupo de *Sinorhizobium*.

4.4. CONCLUSÕES:

1. A temperatura afetou a diversidade genotípica dos isolados de rizóbio recuperados dos solos usando tanto o feijoeiro como a leucena como plantas-isca.
2. A análise da diversidade da população de rizóbio recuperada do solo usando a leucena como planta-isca mostrou um predomínio das espécies *R. tropici* IIA e *Sinorhizobium* sp. *R. tropici* IIA foi mais abundante sob condições de temperaturas ambiente e *Sinorhizobium* sp. predominou quando a planta foi crescida a temperatura elevada.
3. Houve predomínio das espécies do tipo I entre os isolados de rizóbio recuperados do solo usando o feijoeiro como planta-isca, no entanto em condições de temperaturas mais elevadas outros grupos genotípicos foram detectados como estirpes semelhantes ao gênero *Sinorhizobium* sp. e *R. tropici* IIA.
4. A ocorrência das espécies de *R. tropici* IIA e *Sinorhizobium* sp. em condições de estresse térmico indicam a maior tolerância destes gêneros a esta condição no solo, favorecendo sua adaptação à sobrevivência em solos tropicais.
5. O predomínio das espécies do tipo I entre os isolados de feijoeiro recuperados a temperatura ambiente confirmam a análise fenotípica anterior, indicando uma maior adaptação desta espécie à rizosfera do feijoeiro.
6. Houve maior porcentagem de estirpes eficientes na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro e maior estabilidade genética (dada pela menor perda de infectividade) entre os isolados semelhantes aos gêneros *R. tropici* e *Sinorhizobium* sp. indicando que estas espécies são boa fonte de material genético para inoculação do feijoeiro.

5. CAPÍTULO III:

EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE A SIMBIOSE DO FEIJOEIRO NODULADO COM DIFERENTES ESPÉCIES DE RIZÓBIO PRESENTES EM SOLOS TROPICAIS.

5.1. INTRODUÇÃO:

Um dos fatores limitantes a simbiose rizóbio-leguminosas em condições tropicais é a frequente ocorrência de temperaturas altas no solo. As leguminosas sob condições simbióticas são normalmente mais sensíveis a temperaturas elevadas do que quando crescidas na presença de adubo nitrogenado (Lie, 1981). As temperaturas altas afetam a sobrevivência do rizóbio no solo, o processo de infecção, a formação dos nódulos, a atividade de fixação biológica do nitrogênio, além de provocar a senescência precoce dos nódulos. Da mesma forma, quando se considera o rizóbio presente no inoculante, afeta a sua sobrevivência no veículo tanto durante o transporte quanto no armazenamento.

Há uma grande variabilidade genética quanto a tolerância a temperaturas elevadas entre as diferentes espécies de leguminosas (Piha & Munns, 1987b) e entre as estirpes de rizóbio (Graham, 1981). O feijoeiro é considerado uma leguminosa bastante sensível, havendo diferenças quanto a tolerância a temperaturas elevadas entre as diferentes espécies de *Phaseolus* (Piha & Munns, 1987b). Araújo (1997) observou diferença na síntese de proteínas de choque térmico em diferentes cultivares de feijoeiro quando

submetidas a temperaturas elevadas. A atividade dos nódulos desta planta encontra seu ótimo entre 25 e 30°C, sendo limitada por temperaturas acima destes limites (Hernandez-Armenta et al., 1989; Pankhurst & Sprent, 1976; Piha & Munns, 1987b; Hungria et al., 1985).

Para a maioria das espécies de rizóbio a temperatura ótima de crescimento está entre 28 e 31°C (Graham, 1992). Dentre as espécies que nodulam o feijoeiro, muitas estirpes são capazes de crescer a temperaturas mais elevadas do que a hospedeira (Graham, 1979; Josephson & Pepper, 1984; Piha & Munns, 1987b; Karanja & Wood, 1988b; Gitonga et al., 1989; Hungria et al., 1993). O crescimento *in vitro* em temperaturas altas é um dos parâmetros que diferenciam as espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro (Hungria et al., 1997). Considera-se que as estirpes do tipo I (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli*) são menos tolerantes a temperaturas altas em meio de cultivo, tolerando uma temperatura máxima de 35°C. As espécies de *R. tropici* são consideradas mais tolerantes, sendo que as do tipo IIA suportam até 37°C e as do tipo IIB, até 40°C.

Muitos trabalhos indicam que a capacidade de crescimento *in vitro* a temperaturas altas pode estar relacionada a tolerância da simbiose a este estresse (Munnévar & Wollum II, 1981; Kishinevsky et al., 1992). Outros autores, entretanto, não encontraram nenhuma relação entre o crescimento *in vitro*, a infectividade da bactéria e sua capacidade de fixar nitrogênio nestas condições (La Favre & Eaglesham, 1986; Kluson et al., 1986; Karanja & Wood, 1988b).

Mercante (1993) estudando populações de rizóbio que nodulam o feijoeiro isoladas de solos de Cerrado, utilizando a leucena como planta-isca, mostrou que a maioria dos isolados recuperados eram mais tolerantes *in vitro* a temperaturas elevadas. Estes isolados mostraram também tolerância a temperaturas altas em simbiose com o feijoeiro. Além disso, a maioria dos isolados recuperados neste estudo foram classificados como pertencentes à espécie *R. tropici* (Mercante et al., 1998).

A ocorrência de temperaturas altas nos solos tropicais muitas vezes não é um fenômeno prolongado, sendo mais comum a ocorrência de períodos curtos de estresse térmico, muitas vezes associados à deficiência hídrica. Hernandez-Armenta et al. (1989) observaram que a transferência das plantas noduladas de feijoeiro de uma temperatura diurna de 26 para 35°C provocou uma redução drástica na fixação biológica de nitrogênio. Hungria & Franco (1993) observaram o mesmo efeito em feijoeiro inoculado com todas as estirpes testadas, ao transferir as plantas de um ciclo diurno de 28 para 40°C. Por outro lado, Mercante (1993) conseguiu detectar diferenças na tolerância ao estresse térmico entre estirpes pertencentes à espécies distintas, quando as plantas foram transferidas de uma temperatura de 28°C para 38°C durante 5 horas por dia, por um período de 2 a 3 dias consecutivos. Neste trabalho as estirpes pertencentes à espécie *R. tropici* suportaram melhor esta condição de estresse, recuperando a atividade da nitrogenase mais rapidamente do que as demais espécies. Num estudo mais detalhado, onde foi avaliada a porcentagem de nódulos recém formados, em plena atividade (róseos) e em processo de senescência, juntamente com os demais parâmetros de nodulação e a atividade da nitrogenase, verificou-se que a estirpe pertencente à espécie *R. etli* apresentou uma recuperação na atividade da nitrogenase mais lenta, dependente da formação de novos nódulos, uma vez que o choque térmico provocou a senescência dos nódulos já formados (Stralio et al., 1992). O mesmo não ocorreu com os nódulos formados por uma estirpe de *R. tropici*, a qual apresentou uma rápida recuperação na atividade da nitrogenase logo após o final do período de estresse térmico, sem recorrer da estratégia da formação de novos nódulos.

Esta etapa do trabalho avaliará a tolerância ao estresse térmico, em simbiose, de diferentes espécies de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro recuperadas de solos tropicais brasileiros utilizando tanto a leucena quanto o feijoeiro como plantas-isca. Estas espécies foram classificadas através de análises fenotípicas (Capítulo I) e genotípicas

(Capítulo II) através de ARDRA como pertencentes aos gêneros *R. tropici* tipos IIA e IIB, *R. leguminosarum* bv. phaseoli/*R. etli* (estirpes do tipo I) e *Sinorhizobim* sp.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS:

Foram conduzidos dois experimentos em condições de casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, Km 47, Rio de Janeiro, para avaliar a tolerância das plantas de feijoeiro inoculadas com os diferentes isolados submetidas a um choque térmico aplicado no período do florescimento. Os experimentos foram conduzidos no delineamento experimental de blocos ao acaso com parcelas subdivididas. Avaliou-se o efeito da inoculação com as diferentes estirpes nas parcelas e, nas subparcelas, os efeitos do tratamento da temperatura elevada (choque térmico ou não), com 4 repetições.

5.2.1. Estirpes de rizóbio e inoculação das sementes:

As sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Carioca 80 foram previamente desinfestadas superficialmente por imersão em álcool absoluto por 30 segundos, em seguida, esterilizadas superficialmente em H₂O₂ por 3 min., e, por último, foram lavadas dez vezes em água destilada estéril. A seguir, procedeu-se o plantio e inoculação com estirpes de referência da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia (identificadas com código BR) e isolados de rizóbio que nodulam o feijoeiro, tolerantes ou não ao crescimento *in vitro* em temperatura alta (Tabelas 1 e 2). As tabelas mostram as plantas-isca utilizadas e a temperatura em que foram crescidas para recuperação dos isolados selecionados, conforme condições descritas no Capítulo I. As avaliações de tolerância a temperatura elevada e a classificação dos isolados foram descritas nos Capítulos I e II,

As culturas puras de rizóbio foram crescidas em meio YM (Vincent, 1970) a 30°C, por 3 dias, sob agitação. Cada semente foi inoculada no momento do plantio com 500ul de suspensão bacteriana contendo cerca de 10^8 células de rizóbio.mL⁻¹. A estirpe BR 855 de *R. tropici* do tipo IIB, tolerante a condições de estresse térmico em simbiose (Straliotto et al., 1992; Mercante, 1993), foi incluída nos dois experimentos como padrão de comparação.

Tabela 1: Estirpes de rizóbio utilizadas no primeiro experimento e tolerância ao crescimento *in vitro* a 39°C.

Classificação	Planta-isca e temperatura de crescimento	Crescimento <i>in vitro</i> a 39°C
Tipo I		
F47F	Feijão– 38°C	+
F23C	Feijão – 38°C	+
F24K	Feijão – 38°C	-
CNPAF512 (BR376) ¹		-
<i>R. tropici</i> IIA		
L97A	Leucena – 38°C	-
F114.3 (BR829) ¹		-
<i>Sinorhizobium</i> sp.		
L84A	Leucena – 38°C	-
L84B	Leucena – 38°C	+
L119G	Leucena – 38°C	+
L97B	Leucena – 38°C	-
L67A	Leucena – 38°C	+
L67B	Leucena – 38°C	+
L96B	Leucena – 38°C	-
L85D	Leucena – 38°C	-
L74D	Leucena – 38°C	+
L70D	Leucena – 38°C	-
L72A	Leucena – 38°C	+
<i>R. tropici</i> IIB		
F98.5 (BR855) ¹		+
CIAT 899 (BR 322) ¹		+

¹As estirpes F98.5 (BR855), CIAT899 (BR322) e F114.3 (BR829) foram avaliadas para tolerância a temperatura por Mercante (1997) e classificadas por Martínez-Romero et al. (1991). A estirpe CNPAF512 (BR376) foi classificada por Segovia et al. (1993) como *R. leguminosarum* bv. phaseoli.

5.2.2. Condições de crescimento das plantas e parâmetros avaliados:

As plantas foram cultivadas em vasos de “Leonard” (Vincent, 1970) esterilizados, tendo como substrato uma mistura de areia e vermiculita (2:1, v:v) previamente lavada. Foram colocadas 4 sementes de feijão em cada vaso, sendo que aos 7 dias após a emergência (DAE) procedeu-se o desbaste das plantas, deixando-se duas plantas por vaso. Durante todo o período de crescimento, as plantas foram supridas com solução nutritiva sem nitrogênio (Norris & T'Mannetje, 1964, modificada), contendo: KCl (2,0 mM); K_2HPO_4 (0,7 mM); $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (2,0 mM); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2,0 mM); $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,02 mM); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,04 mM); $MnSO_4$ (0,05 mM); $(NH_4)_6MoO_{24} \cdot 4H_2O$ (0,08 uM); H_3BO_3 (0,6 mM); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e ácido cítrico (0,65 mM).

Tabela 2: Estirpes de rizóbio utilizadas no segundo experimento e tolerância ao crescimento *in vitro* a 39°C.

Classificação	Planta-isca e temperatura de crescimento	Crescimento <i>in vitro</i> a 39°C
Tipo I		
F59D	Feijão – 28°C	-
F66A	Feijão – 28°C	-
F48A	Feijão – 38°C	-
F53C	Feijão – 38°C	-
R. tropici IIA		
F65-1	Feijão – 38°C	-
F61	Feijão – 38°C	-
L124D	Leucena – 38°C	-
L125A	Leucena – 38°C	-
L103B	Leucena – 28°C	-
L124B	Leucena – 28°C	+
Sinorhizobium sp.		
L103C	Leucena – 38°C	-
L74D	Leucena – 38°C	+
L97B	Leucena – 28°C	+
L86E	Leucena – 28°C	-
F37D	Feijão – 38°C	+
F34C	Feijão – 38°C	+
R. tropici IIB		
F98.5 (BR855)		+
L115D	Leucena – 28°C	-

Logo após o plantio, os vasos foram envoltos em sacos plásticos e colocados em tanques com água cuja temperatura diurna/noturna oscilou entre 28 e 22 °C. Aos 34 DAE, no primeiro experimento, e aos 36 DAE no segundo experimento, quando as plantas atingiram o florescimento pleno (R6), os vasos foram transferidos, por um período de 3 dias, para tanques para aplicação do tratamento de choque térmico. A temperatura da água foi controlada por termostatos, sob agitação, regulados para um máximo de 38°C por um período de 5 horas diárias. Os termostatos eram automaticamente desligados após o período de choque com o auxílio de um “timer”. Nestes tanques, a temperatura diurna/noturna oscilou entre 38 e 28°C. As plantas foram colhidas, no primeiro experimento, aos 43 DAE, nove dias após o fim do período de choque térmico, e, no segundo experimento, aos 44 DAE, seis dias após o fim do choque térmico.

No momento da coleta, a parte aérea foi cortada na altura do nó cotiledonar, e as raízes noduladas foram utilizadas para avaliação da atividade da nitrogenase pelo método de redução de acetileno (Mague & Burris, 1972). Os nódulos foram destacados das raízes e, juntamente com a parte aérea, foram colocados para secar em estufa a 60-70°C até atingir peso constante para determinação da matéria seca.

Foi determinado o peso da matéria seca da parte aérea em ambos experimentos sendo que, no segundo experimento, foi determinado, também, o nitrogênio total da parte aérea e a matéria seca e nitrogênio total das vagens separadamente.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

As avaliações de tolerância a temperaturas elevadas foram baseadas na aplicação de um choque térmico nas raízes noduladas do feijoeiro no período da floração, época do ciclo em que a planta apresenta maior sensibilidade a estresses bióticos e abióticos, refletindo diretamente na produtividade da cultura. Esta situação simula mais adequadamente as condições prevalentes no campo, uma vez que períodos curtos de altas temperaturas no solo são comuns, geralmente associados à períodos de estresse hídrico, os chamados “veranicos”. Em experimentos anteriores foi possível distinguir o comportamento de estirpes de *R. tropici* e *R. leguminosarum* bv phaseoli em relação a este estresse (Mercante, 1993; Stralotto et al., 1992). Estes autores observaram que, após o período de choque térmico, as estirpes apresentam uma redução drástica na atividade da nitrogenase (Mercante, 1993), a qual é associada à senescência nodular nas estirpes do tipo I, o que não ocorre nas estirpes de *R. tropici* avaliadas (Stralotto et al., 1992).

Os resultados dos dois experimentos conduzidos encontram-se discutidos separadamente a seguir, e as tabelas de análise de variância estão apresentadas em anexo.

Experimento 1:

a) Acúmulo de matéria seca dos nódulos:

As plantas inoculadas com os isolados do tipo I (F47F, F23C e F24K), de *R. tropici* IIA (L97A) e de *Sinorhizobium* sp. (L67A e L70D), no tratamento sem aplicação do choque térmico, apresentaram acúmulo de matéria seca dos nódulos significativamente maior do que a estirpe de referência BR376 (*R. leguminosarum* bv. phaseoli) e não diferiram da estirpe BR322 de *R. tropici*, utilizada no inoculante comercial (Figura 1).

As plantas inoculadas com as diferentes estirpes não diferiram significativamente entre si no acúmulo de matéria seca dos nódulos dentro do tratamento com choque térmico. O tratamento com choque térmico provocou um acúmulo significativamente menor de matéria seca nos nódulos, em relação ao tratamento controle, nas plantas inoculadas com as estirpes F23C (tipo I), L67A e L70D (*Sinorhizobium* sp.).

Vale ressaltar que o choque térmico fez aumentar o coeficiente de variação para os dados de matéria seca dos nódulos, de 27 para 39%, provavelmente como reflexo da senescência nodular provocada pelo estresse.

b) Atividade de redução do acetileno:

No tratamento sem aplicação do choque térmico, as plantas inoculadas com as estirpes de referência, BR322 e BR829, e com os isolados do tipo I, F47F, F23C, F24K, além do isolado L67A de *Sinorhizobium* sp. apresentaram a atividade de redução de acetileno (ARA) superior a estirpe BR 376 (*R. leguminosarum* bv. phaseoli) e semelhante às estirpes BR 322 e BR829 (*R. tropici*) (Figura 2).

O choque térmico provocou uma redução significativa na ARA para as estirpes do F47F (Tipo I) e L97B, L67B e L72A (*Sinorhizobium* sp.). Para a estirpe L74D (*Sinorhizobium* sp.) houve um estímulo na ARA após o período de aplicação do choque térmico.

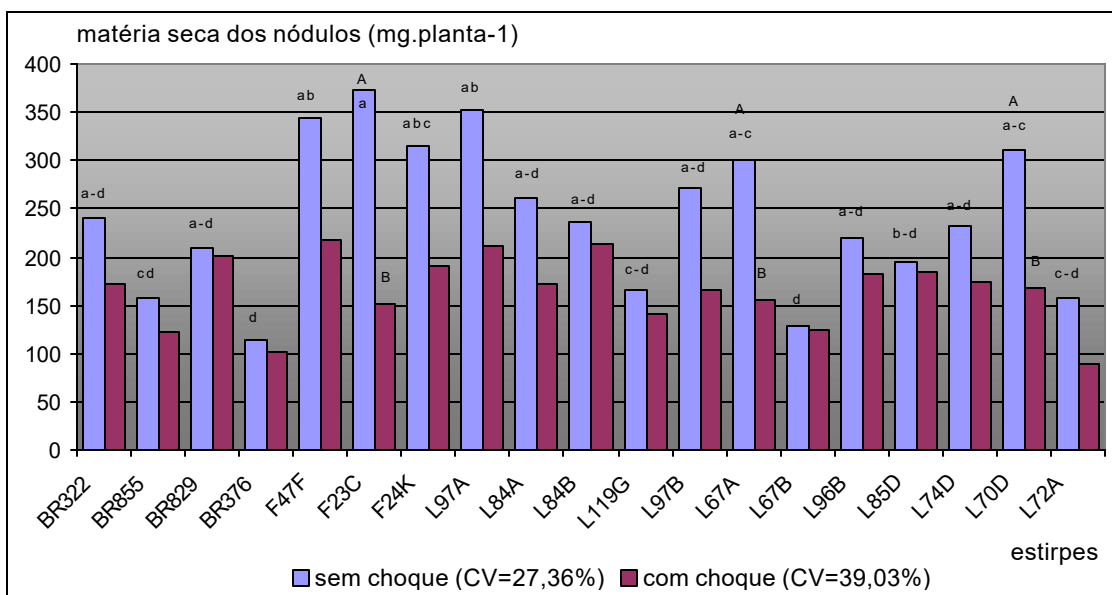


Figura 1: Produção de matéria seca nos nódulos de feijoeiro, cv Carioca 80, inculado com diferentes estirpes de rizóbio. Avaliação aos 43DAE, 9 dias após um período de choque térmico. Valores médios de 4 repetições. Letras diferentes contrastam pelo teste de Tukey ($P=0,05$). Diferenças entre as estirpes estão indicadas pelas letras minúsculas, e o efeito do tratamento para cada estirpe pelas letras maiúsculas.

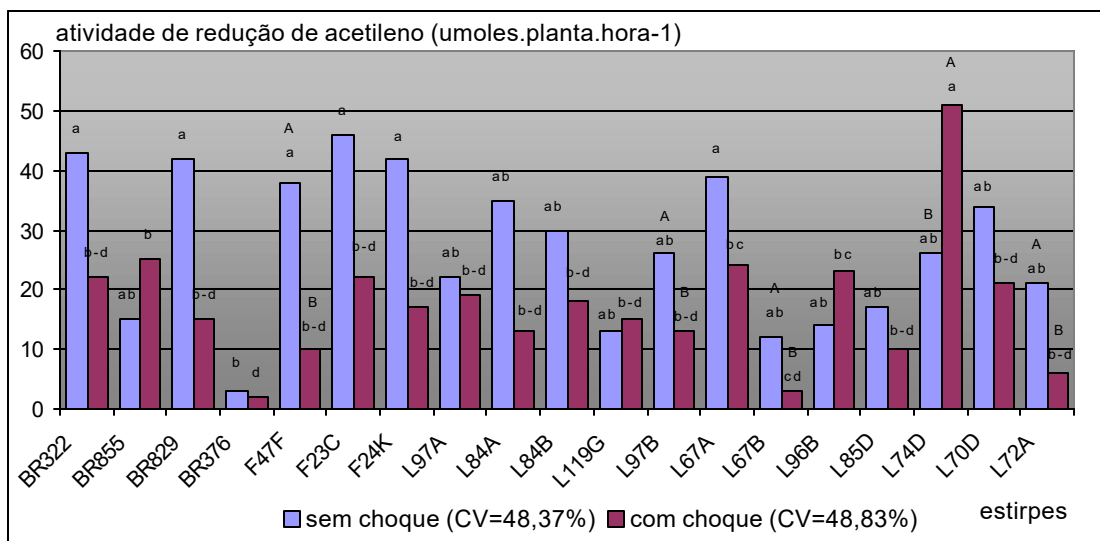


Figura 2: Atividade de redução de acetileno das raízes noduladas de feijoeiro, cv Carioca 80, inculadas com diferentes estirpes de rizóbio. Avaliação aos 43DAE, 9 dias após um período de choque térmico. Valores médios de 4 repetições. Letras diferentes contrastam pelo teste de Tukey ($P=0,05$). Diferenças entre as estirpes estão indicadas pelas letras minúsculas, e o efeito do tratamento para cada estirpe pelas letras maiúsculas.

c) Produção de matéria seca da parte aérea:

A maioria dos isolados analisados apresentou um acúmulo de matéria seca da parte aérea semelhante ao da estirpe BR322, tanto quando se analisa os dados obtidos antes quanto após a aplicação do tratamento de choque térmico (Figura 3).

O pior desempenho em termos de acúmulo de matéria seca da parte aérea é mostrado pela estirpe BR376. Esta estirpe vinha sendo utilizada como referência de *R. leguminosarum* bv. phaseoli em diversos experimentos anteriores (Mercante, 1993) por ser considerada uma estirpe eficiente em feijoeiro. Neste experimento, os baixos valores observados em todos os parâmetros avaliados (nodulação, ARA e produção de matéria seca da parte aérea) indicam que pode ter ocorrido perda de eficiência da estirpe. Este fato foi registrado anteriormente entre isolados pertencentes a esta espécie (Soberón-Chaves et al., 1986; Flores et al., 1988; Martínez et al., 1988; 1990; Piñero et al., 1988; Girard et al., 1991).

Os isolados com tendência a menor acúmulo de matéria seca na parte aérea antes da aplicação do choque térmico foram L67B e L72A (*Sinorhizobium* sp), as quais não diferiram significativamente da estirpe BR 376.

Houve efeito negativo significativo do choque térmico para os isolados F24K (Tipo I) e L97B (*Sinorhizobium* sp), sendo que esta última já havia apresentado este efeito negativo significativo na atividade de redução de acetileno.

Com base nestes dados verifica-se o potencial de muitos isolados, cujo comportamento foi semelhante a estirpe CIAT 899, considerada uma estirpe tolerante ao estresse térmico (Mercante, 1993; Stralio et al., 1992), sendo importante avaliar o isolado L74D, a qual não foi afetada no acúmulo de matéria seca da parte aérea pelo choque térmico e cuja atividade de redução de acetileno foi estimulada pelo tratamento aplicado.

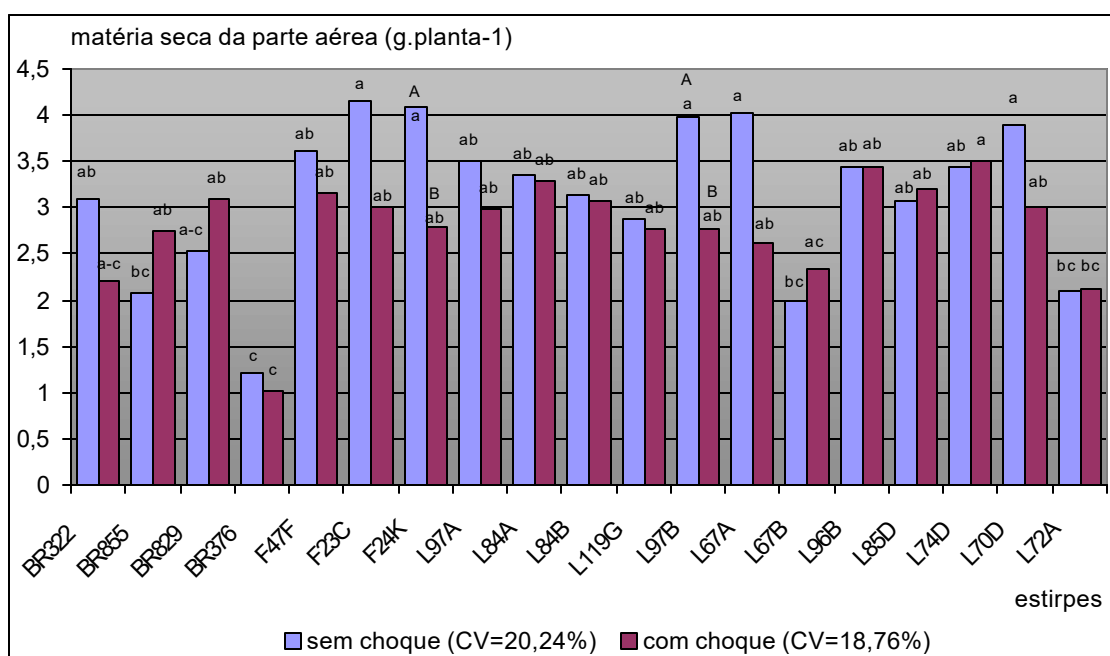


Figura 3: Produção de matéria seca da parte aérea de feijoeiro, cv Carioca 80, inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Avaliação aos 43DAE, 9 dias após um período de choque térmico. Valores médios de 4 repetições. Letras diferentes contrastam pelo teste de Tukey ($P=0,05$). Diferenças entre as estirpes estão indicadas pelas letras minúsculas, e o efeito do tratamento para cada estirpe pelas letras maiúsculas.

Todos os isolados testados neste primeiro experimento foram recuperados de plantas crescidas a temperatura elevada, tanto de feijoeiro quanto de leucena, numa tentativa de verificar a possibilidade de recuperar isolados mais tolerantes a temperaturas elevadas em simbiose. Conforme mencionado anteriormente, foram também testadas, dentro dos grupos de isolados do tipo I e *Sinorhizobium* sp, isolados tolerantes e não tolerantes ao crescimento *in vitro*, em meio de cultura, a 39°C, para fins de comparação.

Não foi observada relação entre a capacidade de crescer em meio de cultivo a temperatura elevada e a maior tolerância ao estresse térmico em simbiose, comparando-se os dados de tolerância das estirpes em meio de cultivo (Tabela 1) e o seu comportamento em simbiose. Esta característica pode, entretanto, ser importante para a sobrevivência da bactéria no solo. Outros autores também não observaram relações entre

estas características (La Favre & Eaglesham, 1986; Karanja & Wood, 1988b), embora Mercante (1993) tenha observado relação entre estes parâmetros para isolados dos Cerrados.

Em relação à classificação genotípica dos isolados, os de tipo I testados mostraram-se tolerantes aos estresse térmico em alguns parâmetros avaliados, como o acúmulo de matéria seca da parte aérea, onde não diferiram, em condições de choque térmico, das estirpes BR 322 e BR855. No entanto, o isolado F24K foi significativamente negativamente afetado pelo choque no acúmulo de matéria seca da parte aérea, e o isolado F23C na nodulação. Seria interessante investigar se os isolados do tipo I capazes de crescer *in vitro* a temperatura elevada, e que neste experimento mostraram boa tolerância ao estresse térmico, apresentam uma maior estabilidade genética, uma vez que a temperatura afeta os eventos de recombinação gênica e deleção, especialmente a nível do plasmídeo simbiótico (Zurkowsky, 1982; Trevors, 1986; Toro e Olivares, 1986).

Dentre os isolados de *Sinorhizobium* sp., a maioria dos isolados teve comportamento semelhante à estirpe BR322, considerada uma estirpe tolerante, embora outros tenham sido também significativamente negativamente afetados tais como os isolados L67A e L70D, no acúmulo de matéria seca dos nódulos; L97B e L67B, na atividade da nitrogenase e L97B no acúmulo de matéria seca da parte aérea. Portanto não houve um comportamento diferenciados dos isolados do tipo I, *R. tropici* ou *Sinorhizobium* sp. em relação ao choque térmico, embora isolados com bom potencial de tolerância tenham sido detectados, destacando-se o isolado L74D de *Sinorhizobium* sp.

Experimento 2:

No segundo experimento agrupou-se os isolados segundo a planta-isca e a temperatura utilizada para recuperação do isolado do solo. Foram testados isolados pertencentes aos principais grupos de rizóbio que nodulam o feijoeiro identificados neste levantamento de diversidade (Capítulos I e II). Deste modo, foram testados 2 isolados

recuperados de feijoeiro crescido a 38°C (grupo identificado com F38, ou seja, isolados de feijoeiro a 28°C); 2 de leucena crescida a 38°C (grupo L38) e 2 de leucena a 28°C (grupo L28). Nenhum isolado de *R. tropici* ou *Sinorhizobium* sp foi recuperado de feijoeiro crescido a 28°C. O mesmo agrupamento foi feito para as estirpes do tipo I: foram testados 4 isolados recuperados de feijoeiro, sendo 2 isolados de plantas de feijoeiro crescidas a 38°C (grupo F38) e dois isolados de plantas de feijoeiro crescidas a 28°C (grupo F28). Apenas um isolado de *R. tropici* IIB foi testado, devido a baixa representatividade deste grupo na população em estudo.

a) Acúmulo de matéria seca dos nódulos:

A grande maioria dos isolados apresentou valores de nodulação semelhantes a estirpe BR 855, único padrão de referência para tolerância a estresse térmico utilizado neste experimento (Figura 4). Os isolados F53C (Tipo I, F38), L115D (*R. tropici* IIB, L28) e F34C (*Sinorhizobium* sp, F38) apresentaram tendência a uma menor nodulação no tratamento sem choque térmico. Após o choque térmico, o isolado L125A de *R. tropici* IIA apresentou maior nodulação do que a estirpe BR 855. Houve estímulo a nodulação para o isolado F59D (F28) do tipo I, após o período do choque térmico, apesar deste isolado ter sido recuperado do solo a temperatura ambiente. Esta característica foi anteriormente verificada somente para estirpes de *R. tropici* (Mercante, 1993; Stralio et al., 1992).

Foram afetados negativamente significativamente na nodulação, pelo choque térmico, os isolados L86E (L28) e F37D (F38) de *Sinorhizobium* sp. Os menores valores de nodulação observados para estes isolados, após o choque térmico, refletem a senescência nodular, a qual afetou indistintamente isolados que foram recuperados do solo a ambiente e a temperatura elevada.

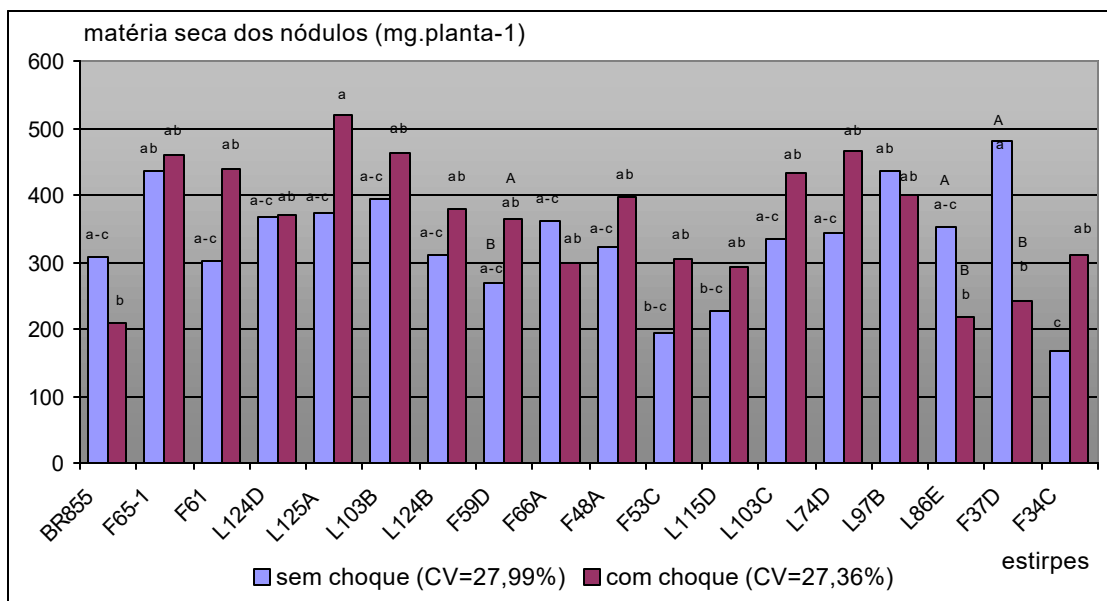


Figura 4: Produção de matéria seca nos nódulos de feijoeiro, cv Carioca 80, inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Avaliação aos 44 DAE, 6 dias após um período de choque térmico. Valores médios de 4 repetições. Letras diferentes contrastam pelo teste de Tukey ($P=0,05$). Diferenças entre as estirpes estão indicadas pelas letras minúsculas, e o efeito do tratamento para cada estirpe pelas letras maiúsculas.

b) Produção de matéria seca e nitrogênio total das vagens:

Os valores de matéria seca e nitrogênio das vagens (Figura 5) apresentaram um coeficiente de variação bastante elevado, devido ao fato de a coleta ter sido realizada no período inicial de formação das vagens. Mesmo assim foram observadas diferenças entre os isolados neste parâmetros, sendo que se destacaram as estirpes F61 (F38), L124D (L38) e L103B (L28) de *R. tropici* IIA, L115D (L28) e BR 855 de *R. tropici* IIB e F34C (F38) de *Sinorhizobium* sp. Novamente, para este parâmetro, não foi observada relação entre a temperatura de recuperação do isolado do solo e sua tolerância ao estresse térmico em simbiose.

Foram estimuladas na produção de vagens, após o choque térmico, as plantas inoculadas com as estirpes F61 (*R. tropici* IIA, F38) L115D (*R. tropici* IIB, L28) e F34C (*Sinorhizobium* sp, F38). Foram negativamente afetadas pelos choque térmico as plantas inoculadas com as estirpes F103C (L38) e L86E (L28). Estes resultados podem também

ser um reflexo da influência da estirpe de rizóbio na translocação do nitrogênio fixado para as vagens. Este efeito pode resultar num variação temporal no período de translocação do nitrogênio, o que prejudica a interpretação dos resultados obtidos, uma vez que a coleta foi realizada num único período.

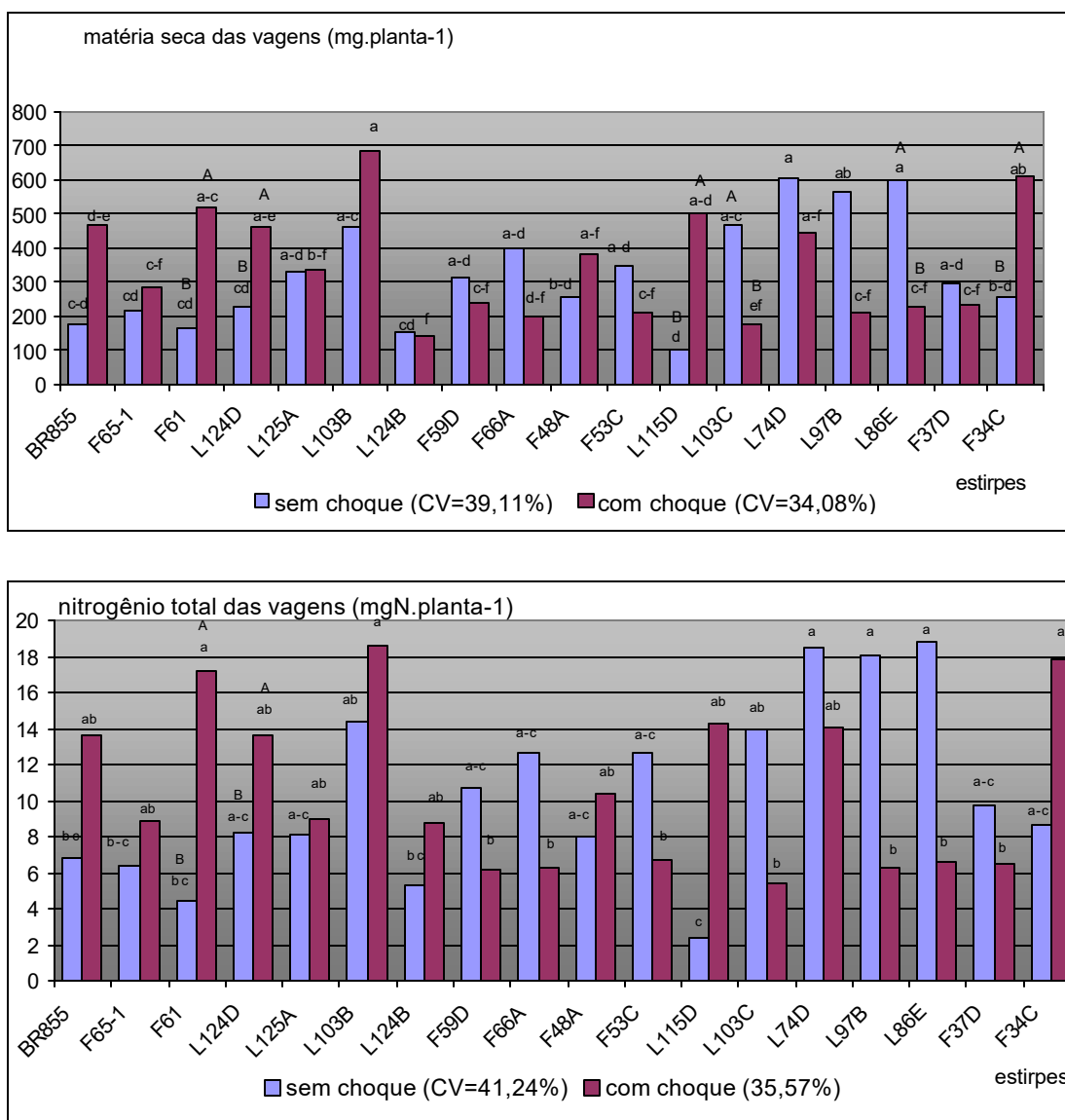


Figura 5: Produção de matéria seca e nitrogênio total das vagens de feijoeiro, cv Carioca 80, inculado com diferentes estirpes de rizóbio. Avaliação aos 44 DAE, 6 dias após um período de choque térmico. Valores médios de 4 repetições. Letras diferentes contrastam pelo teste de Tukey ($P=0,05$). Diferenças entre as estirpes estão indicadas pelas letras minúsculas, e o efeito do tratamento para cada estirpe pelas letras maiúsculas.

c) Produção de matéria seca e nitrogênio total da parte aérea:

Não houve diferença significativa entre os isolados e a estirpe BR 855 no acúmulo de matéria seca da parte aérea sem o tratamento de choque térmico (Figura 6).

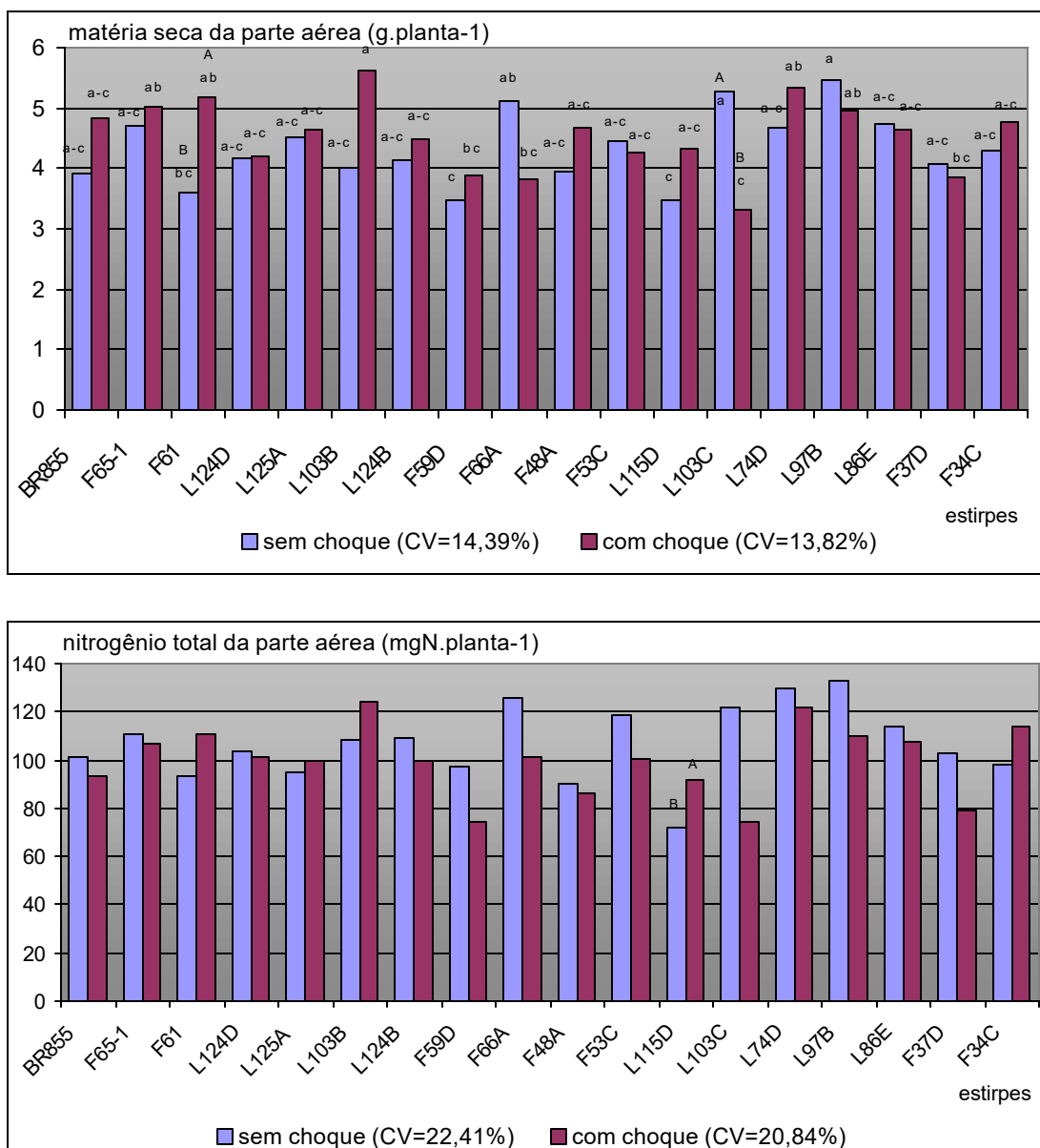


Figura 6: Produção de matéria seca e nitrogênio total da parte aérea de feijoeiro, cv Carioca 80, inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Avaliação aos 44 DAE, 6 dias após um período de choque térmico. Valores médios de 4 repetições. Letras diferentes contrastam pelo teste de Tukey ($P=0,05$). Diferenças entre as estirpes estão indicadas pelas letras minúsculas, e o efeito do tratamento para cada estirpe pelas letras maiúsculas.

Após o choque, a maioria das plantas inoculadas com os diferentes isolados não foi afetada para este parâmetro. Houve estímulo ao crescimento das plantas inoculadas com os isolados F61 (*R. tropici* IIA, F38), que também havia apresentado estímulo após o choque para os dados de matéria seca das vagens. Apenas as plantas inoculadas com o isolado L103C (*Sinorhizobium* sp., L38) foram negativamente afetadas na produção de matéria seca da parte aérea, o que refletiu na produção de vagens discutida anteriormente.

Para os dados de nitrogênio total da parte aérea não houve diferenças estatisticamente significativas entre as estirpes pelo teste de Tukey a 5%. Apenas para o isolado L115D, observou-se estímulo no acúmulo de nitrogênio após o choque térmico.

Numa análise global, comparando-se os tratamentos que incluem os isolados de *R. tropici* IIA com os tratamentos inoculados com os isolados de *Sinorhizobium* sp., percebe-se o bom desempenho de estirpes pertencentes a ambos grupos em simbiose com o feijoeiro nas condições de estresse térmico. O fato de que os isolados de *Sinorhizobium* sp. terem sido recuperadas somente de feijoeiro crescido a temperaturas elevadas pode indicar uma maior tolerância destes isolados no processo de infecção da planta em condições de estresse térmico. Sabe-se que a temperatura afeta o processo de infecção (Karanja & Wood, 1988b) e modifica a exsudação de sinais moleculares pelo feijoeiro (Hungria, 1995). A recuperação destes isolados dos nódulos em condições de altas temperaturas pode significar uma resposta específica aos exsudatos radiculares do feijoeiro produzidos nestas condições. Esta característica pode representar uma vantagem competitiva deste grupo de isolados para nodulação do feijoeiro em condições tropicais.

Este é o primeiro estudo envolvendo isolados de *Sinorhizobium* sp. obtidos de campos de produção de feijoeiro, demonstrando o potencial deste grupo de isolados

como recurso genético para exploração em simbiose com o feijoeiro para as condições tropicais.

É importante ressaltar que estes estudos demonstraram que entre as estirpes do tipo I é possível encontrar isolados com bom potencial de tolerância ao estresse térmico, embora seja necessário considerar, neste caso, as demais características deste grupo, principalmente a da instabilidade genética que pode resultar em perda da infectividade e eficiência simbiótica.

Mais estudos precisam ser conduzidos visando elucidar os demais aspectos relacionados a estes grupos de rizóbio em simbiose com o feijoeiro, tais como competitividade, sobrevivência saprofítica, além da exploração de fatores bióticos e abióticos que possam favorecer o estabelecimento da estirpe selecionada. O conhecimento da diversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro presente em diferentes sistemas agroecológicos é o primeiro passo para elucidar o comportamento destas espécies em condições de campo.

5.4. CONCLUSÕES:

1. Não foi observada relação entre a capacidade de crescimento *in vitro* a temperatura elevada e a tolerância das estirpes a um choque térmico aplicado às raízes noduladas de feijoeiro.
2. Não foi observada relação entre a temperatura de recuperação do isolado do solo e a sua tolerância ao choque térmico. No entanto, as estirpes de *Sinorhizobium* sp. somente foram recuperadas de feijoeiro crescido a temperatura elevada, o que pode ser considerado um indicativo da maior tolerância a temperatura elevada deste grupo nas etapas iniciais da nodulação.
3. Foi possível encontrar estirpes tolerantes ao choque térmico dentre os diferentes grupos de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro (*R. tropici* IIA, *Sinorhizobium* sp. e estirpes do tipo I).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AMARAL, E.S.; BALDANI, J.I. Environmental stresses affecting the survival and stability of plasmids of common bean rhizobia strains in soil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.71, p.545-552, 1999.
- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M.R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.147-156, 1994.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.47, p.996-1006, 1997.
- ANDRADE, D.S.; 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: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 12., 1999, Foz do Iguaçu. **Anais...Foz do Iguaçu: UFPR**, 1999. p.86.
- ANDRIOLO, J.; PEREIRA, P.A.A.; HENSON, R.A. Variabilidade entre linhas de formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* quanto à características relacionadas com a fixação biológica de N₂. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v.29, p.831-837, 1994.
- ANDRIOLO, J. **Potencial de fixação biológica de N₂ entre feijões selvagens e cultivados (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Goiânia: UFG, 1990. 120p. Tese de Mestrado.
- ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.4016-4021, 1995.

- ARAÚJO, J.L.S. **Avaliação da síntese de proteínas de choque térmico (heat shock proteins) no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) submetido a altas temperaturas.** Rio de Janeiro: UFRRJ. 115p. 1997. Tese de Mestrado.
- ATTEWELL, J.; BLISS, F.A. Host plant characteristics of common bean line selected using indirect measures of N₂ fixation. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation research progress.** Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p.3-9.
- BAL, A.K.; SHANTHARAM, S.; WONG, P.P. Nodulation of pole bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Rhizobium* species of two cross-inoculation groups. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.44, p.965-971, 1982.
- BARRERA, L.L.; TRUJILLO, M.E.; GOODFELLOW, M.; GARCÍA, F.J.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; DÁVILA, G.; van BERKUM, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.1086-1091, 1997.
- BATZLI, J. McC.; GRAVES, W.R.; van BERKUM, P. Diversity among rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2137-2143, 1992.
- BLISS, F.A. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.71-79, 1993.
- BLISS, F.A. Breeding for enhanced nitrogen fixation potential of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: LUDDEN, P.W.; HARRIS, J.E., eds. **Nitrogen fixation and CO₂ metabolism.** Elsevier:Amsterdam, 1985. p.303-310.
- BLISS, F.A.; PEREIRA, P.A.A.; ARAÚJO, R.S.; HENSON, R.A.; KINIECK, K.A.; McFERSON, J.R.; TEIXEIRA, M.G.; SILVA, C.C.da. Registration of five high nitrogen fixing common bean germplasm lines. **Crop Science**, Madison, v.29, p.240-241, 1989.
- BODDEY, R.M.; PEREIRA, J.A.R.; HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J.; NEVES, M.C.P. Methods for the study of nitrogen assimilation and transport in grain legumes. **MIRCEN Journal of Applied and Microbiollogy Biotechnology**, Oxford, v.3, p.3-32, 1987.
- BORTHAKUR, D.; DOWNIE, J.A.; JOHNSTON, Q.W.B.; LAMB, J.W. *psi*, a plasmid-linked *Rhizobium phaseoli* gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.200, p.278-282, 1985.

- BROM, S.; MARTÍNEZ, E.; DÁVILA, G.; PALACIOS, R. Narrow- and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1280-1283, 1988.
- BROMFIELD, E.S.; BARRAN, L.R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous *R. meliloti*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.36, p.369-372, 1990.
- BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.46, p.219-252, 1992.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, p.392-397, 1988.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Research constraints provisionally identified by CIAT. In: WORKSHOP ON ADVANCED *Phaseolus* BEAN RESEARCH NETWORK, 1990. 30p.
- COLWELL, R.R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.104, p.410-433, 1970.
- CROW, V.L.; JARVIS, B.D.W.; GREENWOOD, R.M. Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing strains of *Rhizobium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.31, p.152-172, 1981.
- CUNHA, C. de O.; FRANCO, A.A. Efeito de altas temperaturas na nodulação e crescimento de 10 leguminosas arbóreas. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.60, p.380, 1988.
- CUNNINGHAM, S.D.; MUNNS, D.A. The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.48, p.1273-1276, 1984.
- DAGUTAT, H.; STEIN, P.L. Taxonomy and distribution of rhizobia indigenous to South African soils. In: TIKONOVICH, I.A.; PROVOPOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.683.
- DAVIES, E.O.; JOHNSTON, A.W.B. Analysis of three nodD genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli; nodD is preceded by nolE, a gene whose product is

- secreted from the cytoplasm. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.4, p.921-932, 1990.
- DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2180-2187, 1992.
- DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov.. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.715-733, 1994.
- DE OLIVEIRA, L.A.; GRAHAM, P.H. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli using a *nod⁺ fix⁻* natural mutant. **Archives in Microbiology**, London, v.153, p.305-310, 1990.
- DEMEZAS, D.H.; REARDON, T.B.; WATSON, J.M.; GIBSON, A.H. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.3489-3495, 1991.
- DENNY, T.P.; GILMOUR, M.N.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Journal of General Microbiology**, London, v.134, p.1949-1960, 1988.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA– SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

- DREYFUS, B.L.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. s. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, p.89-98, 1988.
- DYKES, G.A.; BRITZ, T.J.; HOLY, A. von. Numerical taxonomy and identification of lactic bacteria from spoiled, vacuum-packaged vienna sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.76, p.246-252, 1994.
- EARDLY, B.D. Restriction fragment length polymorphism in a 16S rRNA gene segment in *Rhizobium* isolated from 38 species of *Trifolium*. In: PALACIOS, R.; MORA, W.E., eds. **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kuwer, 1993. p.610.
- EARDLY, B.D.; HANNAWAY, B.; BOTTOMLEY, P.J. Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules; ability to nodulate bean plants (*Phaseolus vulgaris* (L.) Savi.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, p.1422-1427, 1985.
- EARDLY, B.D.; MATERON, L.A.; SMITH, N.H.; JOHNSON, D.A.; RUMBAUGH, M.D.; SELANDER, R.K. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.187-194, 1990.
- EARDLY, B.D.; WANG, F.-S.; WHITTAM, T.S.; SELANDER, R.K. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.507-512, 1995.
- EARDLY, B.D.; WANG, T.S.; van BERKUM, P. Corresponding 16S rRNA gene segments in *Rhizobiaceae* and *Aeromonas* yield discordant phylogenies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.186, p.69-72, 1996.
- EARDLY, B.D.; YOUNG, J.P.W.; SELANDER, R.K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1809-1815, 1992.
- EVANS, R.J.; BANDEMER, S.L. Nutritive value of legume seed protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.15, p.439-443, 1967.
- FELICE, A.E.; ALSHINAWI, C. Polymerase chain reaction in molecular biotechnology; appropriate technology for developing countries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.12, p.467-471, 1996.

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).
- FISCHER, H.M.; BABST, M.; KASPAR, T.; ACUNA, G.; ARIGONI, F.; HENNECKE, H. One member of a *groESL*-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. **EMBO Journal**, Oxford, v.12, p.2901-2912, 1993.
- FLORES, M.; GONZÁLES, V.; BROM, S.; MARTÍNEZ, E.; PIÑERO, D.; ROMERO, D.; DÁVILA, G.; PALACIOS, R. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.169, p.5782-5788, 1987.
- FLORES, M.; GONZÁLES, V.; PARDO, M.A.; LEIJA, A.; MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PIÑERO, D.; DAVILA, G.; PALACIOS, R. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, p.1191-1196, 1988.
- FOX, G.E.; WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK JR., P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.42, p.166-170, 1992.
- FRANCO, M.C. **Análise da divergência genética em cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): resistência a bacterioses, nodulação e capacidade combinatória**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 91p. Tese de Doutorado.
- FRANCO, M.C. **Capacidade de nodulação de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestres e domesticados**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993. 60p. Tese de Mestrado.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; MCCOY, W. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin Press, 1932. 343p.
- FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.224-229, 1990.
- GENIAUX, E.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ, E. Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *Rhizobium tropici* subtypes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.392-394, 1995.

- GENIAUX, E.; LAGUERRE, G.; AMARGER, N. Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Ecology**, Oxford, v.2, p.295-302, 1993.
- GEORGE, T.; SINGLETON, P.W. Nitrogen assimilation traits and dinitrogen fixation in soybean and common bean. **Agronomy Journal**, Madison, v.84, p.1020-1028, 1992.
- GIL-SERRANO, A.; SÁNCHEZ DEL JUNCO, A.; TEJERO-MATEO, P.; MEGIAS, M.; CAVIEDES, M.A. Structure of the extracellular polysaccharide secreted by *Rhizobium leguminosarum* var. phaseoli CIAT 899. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.204, p.103-107, 1990.
- GIRARD, M.L.; FLORES, M.; BROM.; ROMERO, D.; PALÁCIOS, R.; DÁVILA, G. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p. 2411-2419, 1991.
- GITONGA, N.M.; WIDDOWSON, D.; KEYA, S.O. Interaction of *Phaseolus vulgaris* with termotolerant isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli from Kenyan soils. **MIRCEN Journal**, Oxford, v.5, p.493-504, 1989.
- GOODACRE, R.; HARTMANN, A.; BERINGER, J.E.; BERKELEY, R.C.W. The use of pyrolysis mass espectrometry in the charachterization of *Rhizobium meliloti*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.13, p.157-160, 1991.
- GOODFELLOW, M.; FERGUSON, E.V.; SANGIER, J.-J. Numerical classification and identification of *Streptomyces* species – a review. **Gene**, Amsterdam, v.115, p.225-233, 1992.
- GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic fixation in *Phaseolus vulgaris*.: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.4, p.93-112, 1981.
- GRAHAM, P.H.; PARKER, C.A. Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.20, p.383-396, 1964.
- GRAHAM, P.H. Influence of temperature on growth and nitrogen fixation in cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. **Journal of Agricultural Science**, Edinburgh, v.93, p.365-370, 1979.
- GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L., a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.4, p.93-112, 1981.
- GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.485-492, 1992.

- GRAHAM, P.H. The application of computer techniques to the taxonomy of the root nodule bacteria of legumes. **Journal of General and Microbiology**, London, v.35, p.511-517, 1964.
- GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERREY, M.L.; CONROY, M.J.; HAMMER, B.E.; MARTÍNEZ, E.; AARONS, S.R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.40, p.198-207, 1994.
- GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERRY, M.L. Occurrence and characterization of acid-pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.475-484, 1992.
- GRAHAM, P.H.; PARKER, C.A. Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.20, p.383-396, 1964.
- GRAHAM, P.H.; ROSAS, J.C. Nodule development and nitrogen fixation in cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. as influenced by planting density. **Journal of Agricultural Science**, Edinburgh, v.90, p.19-29, 1978.
- GRAHAM, P.H.; SADOWSKI, M.J.; KEYSER, H.H.; BARNET, Y.M.; BRADLEY, R.S.; COOPER, J.E.; De LEY, D.J.; JARVIS, B.D.W.; ROSLYCKY, E.B.; STRIJDOM, B.W.; YOUNG, J.P.W. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.582-587, 1991.
- GRAHAM, P.H.; VITERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.A.T.; PALACIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.5, p.121-128, 1982.
- HARDARSON, G.; BLISS, F.A.; CIGALES-RIVERO, M.R.; HENSON, R.A.; KIPE-NOLT, J.A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PEÑA-CABIALES, J.J.; PEREIRA, P.A.A.; SANABRIA, C.A.; TSAI, S.M. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.59-70, 1993.
- HARRISON, S.P.; MYTTON, L.R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplifications of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.1009-1015, 1992.
- HARTMANN, A.; CATROUX, G.; AMARGER, N. *Bradyrhizobium japonicum* strain identification by RFLP analysis using repeated sequence RS-alpha. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.15, p.15-19, 1992.

- HARTMANN, A.; GOMEZ, M.; GIRAUD, J.J.; REVELLIN, C. Repeated sequence RS α is diagnostic for *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v.23, p.15-19, 1996.
- HAUKKA, K. **Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from tropical tree legumes**. Helsinki: Department of Applied Chemistry and Microbiology, 1997. 74p.
- HAUKKA, K.; LIDSTRÖM, K. Pulsed-field electrophoresis for genotypic comparison of *Rhizobium* bacteria that nodulate leguminous trees. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.119, p.215-220, 1994.
- HAUKKA, K.; LIDSTRÖM, K.; YOUNG, P.W. Three phylogenetic groups of nodA and nif H genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.419-426, 1998.
- HAUKKA, K.; LINDSTRÖM, K.; YOUNG, J.P.W. Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of african rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.19, p.352-359, 1996.
- HENSON, R.A.; BLISS, F.A. Effects of N fertilizer application timing on common bean production. **Fertilizer Research**, The Netherlands, v.29, p.133-138, 1991.
- HERNANDEZ-ARMENTA, R.; WIEN, H.C.; EAGLESHAM, A.R.J. Maximum temperature for nitrogen fixation in common bean. **Crop Science**, Madison, v.29, p.1260-1265, 1989.
- HERNANDEZ-LUCAS, I.; SEGOVIA, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; PUEPPLE, S.G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.2775-2779, 1995.
- HERRERA, M.A.; BEDMAR, E.J.; OLIVARES, J. Host specificity of *Rhizobium* strains isolated from nitrogen-fixing trees and nitrogenase activities of strain GRH2 in symbiosis with *Prosopis chilensis*. **Plant Science**, Calcutta, v.42, p.177-182, 1985.
- HERRIDGE, D.F.; DANSO, S.K.A. Enhancing crop legume N₂ fixation through selection and breeding. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.51-82, 1995.
- HUNGRIA, M. Efeito das temperaturas elevadas na exsudação de indutores dos genes *nod* em feijoeiro e soja. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S., eds. **Microbiologia do Solo: desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, 1995. p.368-373.

- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; SANTOS, J.C.F. Ecologia microbiana em solos sob cultivo na Região Sul do Brasil. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S., eds. **Microbiologia do Solo**: desafios para o século XXI. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, 1995. p. 234-270.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A. Effects of high temperatures on nodulation and N₂ fixation in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.149, p.95-102, 1993.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A.; SPRENT, J.I. New sources of high temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.149, p.103-109, 1993.
- HUNGRIA, M.; HARDY, R.W.F.; EAGLESHAM, A.R.J. Nitrogen fixation and assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown at high temperature. In: NORTH AMERICAN SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION CONFERENCE, 12., 1989, Ames. **Proceedings...** Ames: Iowa State University, 1989. p.106.
- HUNGRIA, M.; JOHNSTON, A.W.B.; PHILLIPS, D.A. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v.5, p.199-203. 1992.
- HUNGRIA, M.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.751-758, 1991a.
- HUNGRIA, M.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. *Rhizobium nod* gene inducers exsuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.759-764, 1991b.
- HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J.; DÖBEREINER, J. Efeito do sombreamento na fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v.20, p.1143-1156, 1985.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.188-294.
- IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro, v.7, n.5, 1995.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. **PCR protocols** – a guide to methods and applications. San Diego: Academic, 1990. 482p.

- JARVIS, B.D.W. Genetic diversity of *Rhizobium* strains which nodulate *Leucaena leucocephala*. **Current Microbiology**, Bangalore, v.8, p.153-158, 1983.
- JARVIS, B.D.W.; DICK, A.G.; GREENWOOD, R.M. Deoxyribonucleic acid homology among strains of *Rhizobium trifolii* and related species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.30, p.42-52, 1980.
- JARVIS, B.D.W.; DOWNER, J.L.; YOUNG, J.P.W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* & *Bradyrhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.42, p.93-96, 1992.
- JARVIS, B.D.W.; TIGHE, S.W. Rapid identification of *Rhizobium* based on cellular fatty acid analysis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.31-41, 1994.
- JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.945-952, 1993.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae. CONN. 1938. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G., eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p.234-256.
- JOSEPHSON, K.L.; PEPPER, I.L. Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the Sonoran Desert. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.16, p.651-655, 1984.
- JUDD, A.K.; SHNEIDER, M.; SADOWSKY, M.J. & de BRUIJN, F.J. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1702-1708, 1993.
- KARANJA, N.K.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) in Kenya: infectiveness and tolerance to acidity and aluminium. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.112, p.7-13, 1988a.
- KARANJA, N.K.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: tolerance of high soil temperatures and antibiotic resistance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.112, p.15-22, 1988b.
- KAY, H.E.; COUTINHO, H.L.C.; FATTORI, M.; MANFIO, G.P.; GOODACRE, R.; NUTI, M.P.; BASSAGLIA, M.; BERINGER, J.E. The identification of *Bradyrhizobium japonicum* strains isolated from Italian soils. **Microbiology**, New York, v.140, p. 2333-2339, 1994.

- KIPE-NOLT, J.A.; GILLER, K.E. A field evaluation using the ^{15}N isotope dilution method of lines of *Phaseolus vulgaris* L. bred for increased nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.107-114, 1993.
- KIPE-NOLT, J.A.; MONTEALEGRE, C.; TOHME, J. Restriction of nodulation by the broad host range *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 in wild accessions of *Phaseolus vulgaris* L. **New Phytologist**, Oxford, v.120, p.489-494, 1992.
- KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H.; GILLER, K.E. Nitrogen fixation in breeding lines of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.103-106, 1993.
- KIRCHHOF, G.; SCHLOTER, M.; AßMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.853-862, 1996.
- KISHINEVSKY, B.D.; SEM, D.; WEAVER, R.W. Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium*-peanut symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.143, p.275-282, 1992.
- KLUSON, R.A.; KENWORTH, W.J.; WEBER, D.F. Soil temperature effects on competitiveness and growth of *Rhizobium japonicum* and *Rhizobium* induced chlorosis of soybean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.95, p.201-210, 1986.
- KONDOROSI, A.E.; VINCZE, E.; JOHNSTON, A.W.B.; BERINGER, J.E. A comparison of three *Rhizobium* linkage maps. **Molecular and General Genetics**, New York, v.178, p.403-408, 1980.
- KRISHNAN, H.B.; PUEPPKE, S.G. *nodC*, a *Rhizobium fredii* gene involved in cultivar-specific nodulation of soybean, shares homology with a heat shock gene. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.5, p.737-745, 1991.
- KUYKENDALL, L.D.; ELKAN, G.H. *Rhizobium japonicum* derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.32, p.511-519, 1976.
- LA FAVRE, A.K.; EAGLESHAM, A.R.J. The effects of high soil temperatures and starter nitrogen on the growth and nodulation of soybean. **Crop Science**, Madison, v.27, p.742-745, 1987.
- LA FAVRE, A.K.; EAGLESHAM, A.R.J. The effects of high temperatures on soybean nodulation and growth with different strains of bradyrhizobia. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.32, p.22-27, 1986.

- LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of *Rhizobia* by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.56-63, 1994.
- LAGUERRE, G.; BARDIN, M.; AMARGER, N. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hybridization. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, p.1142-1149, 1993a.
- LAGUERRE, G.; FERNANDEZ, M.P.; EDEL, V.; NORMAND, P.; AMARGER, N. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.761-767, 1993b.
- LAGUERRE, G.; GENIAUX, E.; MAZURIER, S.I.; RODRIGUEZ-CASARTELLI, R.; AMARGER, N. Conformity and diversity among field isolates of *R. leguminosarum* bv. viciae, bv. trifolii, and bv. phaseoli revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, p.412-419, 1993c.
- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2029-2036, 1996.
- LAGUERRE, G.; van BERKUM, P.; AMARGER, N.; PRÉVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.4748-4758, 1997.
- LAMB, J.W.; HOMBRECHER, G.; JOHNSTON, A.W.B.; BERINGER, J.E. Plasmid determined nodulation and nitrogen fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. **Molecular and General Genetics**, New York, v.186, p.449-452, 1982.
- LANGE, R.T. Nodule bacteria associated with the indigenous Leguminosae of southwestern Australia. **Journal of General Microbiology**, London, v.26, p.351-359, 1961.

- LEAL, S.C.M. **Detection and characterization of *Metarhizium anisoplae* using molecular markers**. England: University of Nottingham, 1996. Tese de Doutorado.
- LEUNG, K.; BOTTOMLEY, P.J. Growth and nodulation characteristics of subclover (*Trifolium subterraneum* L.) and *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii at different water potentials. **Soil and Biology Biochemistry**, v.26, p.805-812, 1994.
- LEUNG, K.; STRAIN, S.R.; BRUJIN, F.J.; BOTTOMLEY, P.J. Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.416-426, 1994.
- LIE, T.A. Environmental physiology of the legume-Rhizobium symbiosis. In: BROUGHTON, W.J., ed. **Nitrogen Fixation**. Oxford: Clarendon, 1981. V.1. p.104-134.
- LINDSTRÖM, K.; van BERKUM, P.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; NOVIKOVA, N.; JARVIS, B.D.W. Report from the roundtable on *Rhizobium* taxonomy. In: TIKONOVICH, I.A.; PROVOPOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.807-810.
- LINDSTRÖM, K.; LAGUERRE, G.; NORMAND, P.; RASMUSSEN, U.; HEULIN, T.; JARVIS, B.D.W.; P. de LAJUDIE; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CHEN, W.-X. Taxonomy and phylogeny of diazotrophs. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E., eds. **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p.559-570.
- LINTON, D.; DEWHIRST, F.E.; CLEWLEY, J.P.; OWEN, R.J.; BURNENS, A.P.; STANLEY, J. Two types of 16S rRNA gene are found in *Campylobacter helveticus*: analysis, applications and characterization of the intervening sequence found in some strains. **Microbiology**, New York, v.140, p.847-855, 1994.
- LIPSKI, A.; KLATTE, S.; BENDINGER, B.; ALTENDORF, K. Differentiation of gram-negative, nonfermentative bacteria isolated from biofilters on the basis of fatty acid composition, quinone system, and physiological reaction profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2053-2065, 1992.
- LUCAS, I.H.; L. SEGOVIA, L.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PUEPPKE, S.G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.2775-2779, 1995.

- LUDWIG, W.; KIRCHHOF, G.; KLUGBAUER, N.; WEIZENEGGER, M.; BETZEL, D.; EHRMANN, M.; HERTEL, C.; JILG, S.; TATZEL, R.; ZITZELSBERGER, H.; LIEBL, S.; HOCKBERGER, M.; SHAH, J.; LANE, D.; WALLNÖFER, P.R.; SCHEIFER, K.H. Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.15, p.487-501, 1992.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.15, p.155-173, 1994.
- MAGUE, T.H.; BURRIS, R.H. Reduction of acetylene and nitrogen by field grown soybeans. **New Phytologist**, London, v.71, p.275-286, 1972.
- MARIOT, E.J. Ecofisiologia do feijoeiro. In: FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **O feijão no Paraná**. Londrina: IAPAR, 1989. p.25-41. (IAPAR. Circular, 63).
- MARTÍNEZ, E.; FLORES, M.; BROM, S.; ROMERO, D.; DÁVILA, G.; PALACIOS, R. *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p.179-184, 1988.
- MARTÍNEZ, E.; PALACIOS, R.; SÁNCHEZ, F. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens*, harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.169, p.2828-2834, 1987.
- MARTÍNEZ, E.; PARDO, M.A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M.A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General and Microbiology**, London, v.131, p.1779-1786, 1985.
- MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PALACIOS, R. The *Rhizobium* genome. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.9, p.59-93, 1990.
- MARTINEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.11-20, 1994.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.15, p.113-140, 1996.

- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.
- 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**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJNEK, 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, p.1005-1010, 1997.
- McKAY, I.A.; DJORDJEVIC, M.A. Production and excretion of Nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.3385-3392, 1993.
- MEANS, U.M.; JOHNSON, H.W.; DATE, R.A. Quick serological method of classifying strains of *Rhizobium japonicum* in nodules. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.87, p.547-553, 1964.
- MERCANTE, F.M. **Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro**. Itaguaí: UFRRJ, 1993. 149p. Tese de Mestrado.
- MERCANTE, F.M. **Diversidade genética de rizóbio que nodula o feijoeiro e roca de sinais moleculares na simbiose com plantas hospedeiras**. Seropédica: UFRRJ, 1997. 198p. Tese de Doutorado.
- MERCANTE, F.M.; CUNHA, C.O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO-JÚNIOR, W.Q.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the brazilian "Cerrado" region. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.29, p.49-58, 1998.
- MHAMDI, R.; AOUANI, M.E.; JEBARA, M.; BHRIR, R.; MARS, M. Diversity of rhizobia nodulating bean in Tunisia. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 12., 1999, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: UFPR, 1999. p.119.
- MICHIELS, J.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v 60, p.1206-1212, 1994.

- MINASAWA, K.; ISAWA, T.; NAKATSUKA, Y.; ICHIKAWA, N. New *Bradyrhizobium japonicum* strains that possess high copy numbers of the repeated sequence RS₁. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.1845-1851, 1998.
- MOAWAD, H.; BOHLOOL, B.B. Characterization of rhizobia from *Leucaena*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.8, p.387-392, 1992.
- MONTEALEGRE, C.; KIPE-NOLT, J. Ability of selected accessions of *Phaseolus vulgaris* L. to restrict nodulation by particular rhizobia. **Archives of Microbiology**, New York, v.162, p.352-356, 1994.
- MOREIRA, F.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.16, p.135-146, 1993.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, New York, n.4, p.56-65, 1990.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.155, p.355-350, 1987.
- MUNÉVAR, F.; WOLLUM II, A.G. Effect of high root temperature and *Rhizobium* strain on nodulation, nitrogen fixation and growth of soybeans. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.45, p.1113-1120, 1981.
- MUNNS, D.N.; FOGLE, V.W.; HALLOCK, B.G. Alfalfa root nodule distribution and inhibition of nitrogen fixation by heat. **Agronomy Journal**, Madison, v.69, p.377-380, 1977.
- 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.
- MURRAY, R.G.E.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; De VOS, P.; COODFELLOW, M.; GRIMONT, P.A.D.; PFENING, N.; STACKEBRANDT, E.; ZAVARSIN, G.A. Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.40, p.213-215, 1990.

- NIEMANN, S.; PÜHLER, A.; TICHY, H.-T.; SIMON, R.; SELBITSCHKA, W. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. **Journal of Applied Microbiology**, Danvers, v.82, p.477-484, 1997.
- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. 2. Development of an RFLP-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.85, p.513-520, 1993a.
- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, Maryland, v.134, p.341-350, 1993b.
- NORRIS, D.O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**, Nairobi, v. 29, p. 214-235, 1964.
- NOUR, S.M.; CLEYET-MAREL, J.-C.; BECK, D.; EFFOSSE, A.; FERNANDEZ, M.P. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.40, p.345-354, 1994.
- OGAWA, J.; LONG, S. The *Rhizobium meliloti* *groELc* locus is required for regulation of early *nod* genes by the transcription activator NodD. **Genes and Development**, New York, v.9, p.714-729, 1995.
- OLIVEIRA, L.A.; GRAHAM, P.H. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli using a *nod⁺fix⁻* mutant. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.153, p.305-310, 1990.
- OLSEN, G.J.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1-6, 1994.
- PACOVSKY, R.S.; BAYNE, H.G.; BETHLENFALVAY, G.J. Symbiotic interactions between strains of *Rhizobium phaseoli* and cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. **Crop Science**, Madison, v.24, p.101-105, 1984.
- PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2279-2285, 1996.
- PANKHURST, C.E.; SPRENT, J.I. Effects of temperature and oxygen tension on the nitrogenase and respiratory activities of turgid and water-stressed soybeans and

- French bean root nodules. **Journal of Experimental Botany**, London, v.27, p.1-9, 1976.
- PARK, S.J.; BUTTERY, B.R. Inheritance of nitrate tolerant supernodulation in SEM-induced mutants in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Heredity**, Washington, v.80, p.486-488, 1989.
- PEREIRA, E.G.; LACERDA, A.M.; LIMA, A.S.; MOREIRA, F.M.S.; CARVALHO, D.; SIQUEIRA, J.O. Genotypic, phenotypic and symbiotic diversity amongst rhizobia isolates from *Phaseolus vulgaris* L. growing in the amazon region. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 12., 1999, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: UFPR, 1999. p.199.
- PEREIRA, P.A.A.; BURRIS, R.H.; BLISS, F.A. ¹⁵N-determined dinitrogen fixation potential of genetically diverse bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.120, p.171-179, 1989.
- PEREIRA, P.A.A.; MIRANDA, B.D.; ATTEWELL, J.R.; KMIECIK, K. A.; BLISS, F.A.. Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.148, p.203-209, 1993.
- PIHA, M.I.; MUNNS, D.N. Nitrogen fixation potential of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) compared with other grain legumes under controlled conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.98, p.169-182, 1987a.
- PIHA, M.I.; MUNNS, D.N. Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbiosis to high soil temperature. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.98, p.183-194, 1987b.
- PIÑERO, D.; MARTÍNEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.2825-2832, 1988.
- PRAKASH, R.K.; ATHERLY, A.G. Plasmids of *Rhizobium* and their role in symbiotic nitrogen fixation. **International Review of Cytology**, New York, v.104, p.1-24, 1986.
- PRIETO, M.; GARCÍA-ARMESTO, M.R.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; OTERO, A.; MORENO, B. Numerical taxonomy of gram-negative, nonmotile, nonfermentative bacteria isolated during chilled storage of lamb carcasses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2245-2249, 1992.
- PUGASHETTI, B.K.; ANLE, J.S.; WAGNER, G.H. Soil microorganisms antagonistic towards *Rhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.14, p.45-49, 1982.

- QUINTO, C.; de la VEJA, H.; FLORES, M.; FERNANDÉZ, L.; BALLADO, T.; SOBERÓN, G.; PALÁCIOS, R. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. **Nature**, London, v.299, p.724-726, 1982.
- RAGHUWANSHI, A.; DUDEJA, S.S.; KHURANA, A.L. Effect of temperature on flavonoid production in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) in relation to nodulation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.17, p.314-316, 1994.
- RAMIREZ, M.E.; ISRAEL, D.W.; WOLLUM II, A.G. Phenotypic and genotypic diversity of similar serotypes of soybean bradyrhizobia from two soil populations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.1539-1545, 1997a.
- RAMIREZ, M.E.; ISRAEL, D.W.; WOLLUM II, A.G. Phenotypic characterization of soybean bradyrhizobia in two soils of North Carolina. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.1547-1555, 1997b.
- RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. N₂ fixation in field beans quantified by ¹⁵N isotope dilution. I. Effect of strains of *Rhizobium phaseoli*. **Agronomy Journal**, Madison, v.75, p.640-644, 1983a.
- RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. N₂ fixation in field beans quantified by ¹⁵N isotope dilution. II. Effect of cultivars of beans. **Agronomy Journal**, Madison, v.75, p.645-649, 1983b.
- RICHARDSON, A.E.; VICCARS, L.A.; WATSON, J.M.; GIBSON, A.H. Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. **Soil and Biology Biochemistry**, Oxford, v.27, p.515-524, 1995.
- RIEDEL, K.H.J.; BRITZ, T.J. *Propionibacterium* species diversity in anaerobic digesters. **Biodiversity and Conservation**, London, v.2, p.400-411, 1993.
- ROBERTS, G.P.; LEPS, W.T.; SILVER, L.E.; BRILL, W.J. Use of two dimensional polyacrilamide gel eletrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.39, p.414-422, 1980.
- ROHLF, F.J. **NT-SYS: Numerical Taxonomy System using Multivariate Analysis System**. New York: Applied Bioestistics, 1992. n.p.
- ROME, S.; FERNANDEZ, M.P.; BRUNEL, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p.972-980, 1996.
- ROMERO, D.; SINGLETON, P.W.; SEGOVIA, L.; MORETT, E.; BOHLOOL, B.B.; PALACIOS, R.; DÁVILA, G. Effect of naturally occurring *nif* reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.848-850, 1988.

- ROSADO, A.; DUARTE, G.; L. SELDIN, L.; VAN ELSAS. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.135-147, 1997.
- ROSSBACH, S.; RASUL, G.; SCHNEIDER, M.; EARDLEY, B.; de BRUIJN, F.J. Structural and functional conservation of the Rhizopine catabolism (*moc*) locus limited to selected *Rhizobium meliloti* strains and unrelated to their geographical origin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.8, p.549-559, 1995.
- SADOWSKI, M.J.; CREGAN, P.B.; KEYSER, H.H. Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1907-1910, 1988.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. V.3.
- SAXENA, A.K.; REWARI, R.B. Differential response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) – *Rhizobium* combinations to saline soil conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.13, p.31-34, 1992.
- SCHAAD, N.W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1990. 68p.
- SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.12, p.163-174, 1996.
- SEGOVIA, L.; PIÑERO, D.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.426-433, 1991.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTÍNEZ-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, p.374-377, 1993.
- SELANDER, R.K.; CAUGANT, D.A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N.; WHITTAM, T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, p.873-884, 1986.
- SELENSKA-POBELL, S.; DÖRING, H.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E. Unusual organization of the 23S rRNA genes in *Rhizobiaceae*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.905-909, 1997.

- SELENSKA-POBELL, S.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E. Fragmentation of the large subunit rRNA in the family *Rhizobiaceae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, p.6993-6998, 1995.
- SELENSKA-POBELL, S.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; RADEVA, G.; SQUARTINI, A. Characterization of *Rhizobium 'hedysari'* by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. **Journal of Applied Bacteriology**, Danvers, v.80, p.517-528, 1996.
- SELENSKA-POBELL, S.; GIGOVA, L.; PETROVA, N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. **Journal of Applied Bacteriology**, Danvers, v.79, p.425-431, 1995.
- SERRAJ, R.; VASQUEZ-DIAZ, H.; DREVON, J.J. Effects of salt stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion, and ion distribution in soybean, common bean and alfalfa. **Journal of Plant Nutrition**, Tokyo, v.21, p.475-488, 1998.
- SESSITSCH, A.; RAMÍREZ-SAAD, H.; HARDARSON, G.; AKKERMANS, A.D.L.; de VOS, W.M. Classification of Austrian rhizobia and the mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium gallicum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.1097-1101, 1997.
- SHARIFI, E. Parasitic origins of nitrogen-fixing *Rhizobium*-legume symbioses. A review of evidence. **Biosystems**, Ireland, v.16, p.269-289, 1984.
- SHISSHIDO, M.; PEPPER, I.L. Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.11-16, 1990.
- SINGH, S.P. Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, New York, v.43, p.39-57, 1989.
- SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, FABACEAE). **Economic Botany**, New York, v.45, p.379-396, 1991a.
- SINGH, S.P.; GUTIÉRREZ, J.A.; MOLINA, A.; URREA, C.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated *Phaseolus vulgaris*. II. Marker-based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, Madison, v.31, p.23-29, 1991b.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. The principle and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.
- SOBERÓN-CHAVES, G.; NAJERA, R. Isolation from soil of *Rhizobium leguminosarum* lacking symbiotic information. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.35, p.464-468, 1989.

- SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **Kansas University Science Bulletin**, Augusta, v.38, p.1408-1438, 1958.
- SOUZA, V.; EGUIARTE, L.; AVILA, G.; CAPPELLO, R.; CALLARDO, C.; MONTOYA, J.; PIÑERO, D. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultured bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1260-1268, 1994.
- SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume – *Rhizobium* symbiosis symbiosis: chaos or theory? **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.
- St CLAIR, D.A.; WOLYN, D.J.; DuBOIS, J.; BURRIS, R.H.; BLISS, F.A. Field comparison of dinitrogen fixation determined with nitrogen-15-depleted and nitrogen-15-enriched ammonium sulphate in selected inbred backcross lines of common bean. **Crop Science**, Madison, v.28, p.773-778, 1988.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.846-849, 1994.
- STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W.; WITT, D. Ribosomal RNA and rRNA sequence analysis. **Gene**, Amsterdam, v.115, p.255-260, 1992.
- STRALIOTTO, R.; FRANCO, A.A. Competitividade entre estirpes de *Rhizobium tropici* e *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* e uso de mutantes glucuronidase positivos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 24., 1993, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1993. p..
- STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. de O.; MERCANTE, F.M.M.; FRANCO, A.A.; RUMJANEK, N.G. Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from brazilian tropical soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.71, p.531-543, 1999.
- 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 stress térmico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 19., 1997, Rio de Janeiro. **Abstracts...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. Abstract MS-069.

- STRALIOTTO, R.; CUNHA, C.O.; MERCANTE, F.M.; RUMJANEK, N.G.; FRANCO, A.A. Genotypic diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS: THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts...** Rio de Janeiro: Embrapa-CNPAB, 1995. p.185-186.
- STRALIOTTO, R.; MERCANTE, F.M.; JAMES, E.K.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A. Tolerance of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis with *Rhizobium tropici* to heat shock. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., eds. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer, 1992. p.745.
- STRALIOTTO, R.; YUNDA, A.L.; FRANCO, A.A.; BALDANI, J.I. Estirpes de rizóbio do tipo II tolerantes a altas temperaturas e competitivas para inoculação do feijoeiro. In: FEIRA NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA, 2., 1991, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Associação Brasileira de Empresas de Biotecnologia, 1991. p.17.
- SWELIM, D.M.; HASHEM, F.M.; KUYKENDALL, L.D.; HEGAZI, N.I.; ABDEL-WAHAB, S.M. Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.25, p.224-232, 1997.
- TAN, Z.Y.; XU, X.D.; WANG, E.T.; GAO, J.L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CHEN, W.X. Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.874-879, 1997.
- TESFAYE, M.; PETERSEN, D.J.; HOLL, F.B. Comparison of partial 23S rDNA sequences from *Rhizobium* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p. 526-533, 1997.
- THOMAS, P.M.; GOLLY, K.F.; ZYSKIND, J.W.; VIRGINIA, R.A. Variation of clonal, mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1146-1153, 1994.
- TORO, N.; OLIVARES, J. Analysis of *Rhizobium meliloti* sym mutants obtained by heat treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, p.1148-1150, 1986.

- TREVORS, J.T. Plasmid curing in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.32, p.149-157, 1986.
- TRINICK, M.J. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. **Journal of Applied Bacteriology**, Danvers, v.49, p.39-53, 1980.
- TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.131-138, 1993.
- TURK, D.; KEYSER, H.H. Rhizobia that nodulate tree legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.451-460, 1992.
- Van BERKUM, P.; BEYENE, D.; EARDLY, B.D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p.240-244, 1996.
- Van BERKUM, P.; BEYENE, D.; VERA, F.T.; KEYSER, H.H. Variability among *Rhizobium* strains originating from nodules of *Vicia faba*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.2649-2653, 1995.
- Van BERKUM, P.; NAVARRO, R.B.; VARGAS, A.A.T. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup⁺) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.554-561, 1994.
- Van RHIJN, P.; DESAIR, J.; VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J. The Nod D proteins of *Rhizobium* sp strain BR 816 differ in their interactions with coinducers and their activities for nodulation of different host plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.315-3623, 1994.
- Van ROSSUM, D.; SCHUURMANS, F.P.; GILLIS, M.; MUYOTCHA, A.; VANVERSEVELD, H.W.; STOUTHAMER, A.H.; BOOGERD, F.C. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaeae* L.) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1599-1609, 1995.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v.60, p.407-438, 1996.

- VARGAS, A.A.T.; GRAHAM, P.H. *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acidic conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.19, p.91-101, 1988.
- VARGAS, C.L.; MARTÍNEZ, M.; MEGIAS, M.; QUINTO, C. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host-range *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli strain CIAT 899. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.4, p.1899-1910, 1990.
- VÁZQUEZ, M.; DAVALOS, A.; De Las PENAS, A.; SANCHEZ, F.; QUINTO, C. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.1250-1258, 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular Cell Biology**, San Diego, v.5, p.25-40, 1994.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p. (IBM Handbook, n° 15).
- VINUESA, P.; RADEMAKER, J.L.W.; de BRUIJN, F.J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding a 16S rRNA and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.2096-2104, 1998.
- VLASSAK, K.; MERCANTE, F.; STRALIOTTO, R.; FRANCO, A.A.; VUYLSTEKE, M.; VANDERLEYDEN, J. Evaluation of the intrinsic competitiveness and saprophytic competence of *Rhizobium tropici* IIB strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.24, p.274-282, 1997.
- VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in a tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p.61-68, 1996.
- WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A.C. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v.21, p.4153-4154, 1993.

- WARD, D.M.; WLLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, London, v.345, p.63-65, 1990.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v.19, p.303-306, 1991.
- WILLEMS, A.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.305-313, 1993.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIC, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WILSON, E.O. Time to revive systematics. **Science**, Washington, v.230, p.1227-1229, 1985.
- WILSON, J.K. Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. **Soil Science**, Madison, v.58, p.61-69, 1944.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v.51, p.221-271, 1987.
- WOOD, M.; COOPER, J.E.; BJOURSON, A.J. Response of *Lotus* rhizobia to acidity and aluminum in liquid culture and in soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.107, p.227-231, 1988.
- XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.27, p.386-392, 1998.
- YOKOYAMA, L.P.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J., eds. **Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (POTAFOS), 1996. p.1-21.
- YOUNG, J.P.W. *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans and lucerne grown at the same site. **Journal of General and Microbiology**, London, v.131, p.2399-2408, 1985.
- YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTai1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.2271-2277, 1991.

- YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, Oxford, v.133, p.87-94, 1996.
- YOUNG, J.P.W.; WEXLER, M. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General and Microbiology**, London, v.134, p.2731-2739, 1988.
- YURA, T.; NAGAI, H.; MORI, H. Regulation of the heat shock response in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.47, p.321-350, 1993.
- ZEVENHUIZEN, L.P.T.M.; BERTOCCHI, C. Polysaccharide production by *Rhizobium phaseoli* and the typing of their excreted anionic polysaccharides. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.65, p.211-218, 1989.
- ZHANG, X.; HARPER, R.; KARSISTO, M.; LINDSTRÖM, K. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.104-113, 1991.
- ZURKOWSKI, W. Molecular mechanisms for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.150, p.999-1007, 1982.

ANEXO

Quadros de análise de variância referentes aos experimentos 1 e 2 do capítulo III.

1. Experimento 1:

Tabela 1: Análise de variância dos dados de matéria seca dos nódulos:

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F	Significância
Tratamento	1	220858,9	51,636	0,00002
Estirpe	18	21727,87	5,080	0,00000
Repetição	3	3285,107	0,768	*****
Trat X Estirpe	18	7612,212	1,780	0,3647
Resíduo	111	4277,246		

Coeficiente de variação: 32,200

Tabela 2: Análise de variância dos dados de atividade de redução de acetileno:

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F	Significância
Tratamento	1	3825,695	34,007	0,00002
Estirpe	18	701,9602	6,240	0,00000
Repetição	3	521,0159	4,631	0,00434
Trat X Estirpe	18	396,7136	3,526	0,00003
Resíduo	111	112,4977		

Coeficiente de variação: 47,495

Tabela 3: Análise de variância dos dados de matéria seca da parte aérea:

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F	Significância
Tratamento	1	4,298116	12,60	0,00059
Estirpe	18	3,236895	9,489	0,00000
Repetição	3	0,262184	0,810	*****
Trat X Estirpe	18	0,7998822	2,345	0,00360
Resíduo	111	0,3411282		

Coeficiente de variação: 19,680

2. Experimento 2:**Tabela 4:** Análise de variância dos dados de matéria seca dos nódulos:

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F	Significância
Tratamento	1	0,03697608	3,981	0,04861
Estirpe	17	0,03758915	4,047	0,00001
Repetição	3	0,00486894	0,524	*****
Trat X Estirpe	17	0,02333890	2,513	0,00225
Resíduo	105	0,09288030		

Coeficiente de variação: 27,663

Tabela 5: Análise de variância dos dados de matéria seca das vagens:

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F	Significância
Tratamento	1	0,0184620	1,220	0,27181
Estirpe	17	0,0786145	5,197	0,00000
Repetição	3	0,0527474	3,487	0,01841
Trat X Estirpe	17	0,1233932	8,157	0,00000
Resíduo	105	0,01512772		

Coeficiente de variação: 36,172

Tabela 6: Análise de variância dos dados de nitrogênio total das vagens:

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F	Significância
Tratamento	1	0,8025159	0,050	*****
Estirpe	17	60,11575	3,755	0,00002
Repetição	3	47,28299	2,954	0,03596
Trat X Estirpe	17	116,9058	7,303	0,00000
Resíduo	105	16,00771		

Coeficiente de variação: 38,098

Tabela 7: Análise de variância dos dados de matéria seca total da parte aérea:

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F	Significância
Tratamento	1	1,672387	4,256	0,04157
Estirpe	17	1,193705	3,038	0,00026
Repetição	3	0,3738764	0,952	*****
Trat X Estirpe	17	1,553823	3,955	0,00001
Resíduo	105	0,3929206		

Coeficiente de variação: 14,120

Tabela 8: Análise de variância dos dados de nitrogênio total da parte aérea:

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F	Significância
Tratamento	1	2451,078	4,893	0,02914
Estirpe	17	1198,878	2,393	0,00365
Repetição	3	121,7613	0,243	*****
Trat X Estirpe	17	651,1616	1,300	0,20710
Resíduo	105	500,9711		

Coeficiente de variação: 21,552